



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CLONES DA CEPA
COLOMBIANA DO *Trypanosoma cruzi*, ISOLADOS NA
FASE AGUDA, PRECOCE E AVANÇADA DA INFECÇÃO.
INVESTIGAÇÃO DA RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA

ÉDSON LUIZ PAES CAMANDAROBA

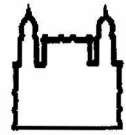
Salvador - Bahia - Brasil
2005



001652



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**



Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CLONES DA CEPA
COLOMBIANA DO *Trypanosoma cruzi*, ISOLADOS NA FASE AGUDA,
PRECOCE E AVANÇADA DA INFECÇÃO. INVESTIGAÇÃO DA
RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA**

ÉDSON LUIZ PAES CAMANDAROBA

SALVADOR - BAHIA - BRASIL

2005

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**ANÁLISE FENOTÍPICA E GENOTÍPICA DE CLONES DA CEPA
COLOMBIANA DO *Trypanosoma cruzi*, ISOLADOS NA FASE AGUDA,
PRECOCE E AVANÇADA DA INFECÇÃO. INVESTIGAÇÃO DA
RESPOSTA À QUIMIOTERAPIA**

ÉDSON LUIZ PAES CAMANDAROBA

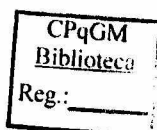
Professor-orientador: Dra. Sonia Gumes Andrade

Professor co-orientador: Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

**Tese apresentada para obtenção do
grau de Doutor em Patologia, área de
concentração em Patologia
Experimental.**

Salvador – Bahia – Brasil

2005



Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do Centro de Pesquisas
Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Camandaroba, Edson Luiz Paes

C172c Análise fenotípica e genotípica de clones da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, isolados na fase aguda, precoce e avançada da infecção. Investigação da resposta à quimioterapia[manuscrito]. / Edson Luiz Paes Camandaroba. - 2005.

174 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Tese (doutorado) – Universidade Federal da Bahia, Faculdade de Medicina.
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2004.

Orientadora: Profa. Dra. Sonia Gumes Andrade. Laboratório de Chagas
Experimental. Autoimunidade e Imunologia Celular.

1. Genética. 2. Clones. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Quimioterapia. I. Título.

CDU 575:593.161: 615.28

De manhã escureço

De dia tarδο

De tarde anoiteço

De noite ardo.

A oeste, a morte

Contra quem vivo

Do sul cativo

O este é meu norte.

Outros que contem

Passo por passo:

Eu morro ontem

Nasço amanhã

Ando onde há espaço:

-Meu tempo é quando

Vinicius de Moraes

***Dedico esta tese ao meu filho Herberg, a Soraya e a minha mãe
Cleonice que estiveram sempre comigo nessa longa jornada.***

AGRADECIMENTOS AOS ÓRGÃOS E INSTITUIÇÕES:

À Faculdade de Medicina da Universidade Federal da Bahia (FAMED-UFBA) e ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) que em parceria vêm mantendo com nível de excelência o Curso de Pós-Graduação em Patologia;

À Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) e ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) pela concessão da minha bolsa de doutorado durante todo o curso e, Especialmente, a **Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ)** que tem contribuído para a formação de incontáveis gerações de médicos e biólogos sanitaristas preocupados em pesquisar e resolver as doenças tropicais;

À Coordenação do Curso de Pós-graduação em Patologia, que sempre procurou resolver as questões acadêmicas com grande competência;

Laboratório de Patologia e Biologia Molecular (LPBM) pelo fornecimento de alguns reagentes e os equipamentos para a caracterização molecular dos clones estudados;

Laboratório de Imunoparasitologia (LIP) e Laboratório Avançado de Saúde Pública (LASP) que, gentilmente, cederam o termociclador para PCR das amostras de DNA;

À biblioteca Eurydice Santana, do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) pelo fornecimento dos serviços de xerox, livros e artigos científicos;

Ao **Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX)** do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (CPqGM) que sempre colocou a nossa disposição os reagentes e equipamentos do laboratório;

AGRADECIMENTOS PESSOAIS:

À Profa.Dra. Sonia Gumes Andrade, que dedicou parte da sua vida para pesquisar a doença de Chagas no nosso meio, tendo como aliados neste trabalho os jovens pesquisadores em busca de solucionar o problema da doença de Chagas;

À Eliana Galvão dos Reis e ao Dr. Mitermayer Galvão dos Reis, Chefe do Laboratório de Biologia Celular e Molecular (LPBM) pelo auxílio na técnica da Biologia molecular e na análise dos resultados obtidos;

Ao Profº. Dr. Zilton Andrade, seus estagiários e funcionários que sempre colocaram o LAPEX sempre a nossa disposição para qualquer necessidade;

Ao Profº.Dr. Luis Antonio Rodrigues de Freitas, Coordenador do Curso Pós-graduação em Patologia;

À Profa. Dra. Rozália Figueira Campos, pela sua conduta científica e didática ensinando-me a melhor maneira de resolver as dificuldades inerentes ao trabalho científico;

À Juracy Barbosa Magalhães e Maria de Fátima Magalhães que me auxiliaram nas normas de procedimento do laboratório de doença de Chagas Experimental;

À técnica Dinalva França de Jesus pelos procedimentos laboratoriais de manutenção dos clones em meio de cultura e a Preciano da Silva Correia pelo acompanhamento e manutenção dos camundongos no biotério;

Às Biólogas Ariane Pimentel e Rita de Cássia P. Lima responsáveis pelas técnicas de imunohistoquímica e imunofluorescência.

Às Dra. Márcia Maria Souza, Dra. Ísis Fernandes Magalhães, aos biólogos Karina de S. C Sobral e a Torricelli Souza Thé que me auxiliaram na diagramação final dos gráficos e nas imagens incluídas na tese;

À Dra Fabíola Cardillo pela revisão do manuscrito e a Dr.José Orivaldo Mengelle Júnior que sempre estiveram disponíveis para qualquer orientação e colaboração científica;

À Dra Marilda Gonçalves e ao Dr. Albert Ko pelo fornecimento do sistema de eletroforese vertical e dos reagentes necessários para a caracterização molecular dos clones estudados;

Às estagiárias do (LPBM) Joelma Menezes, Elisângela Vitória Adorno, Soraia Machado Cordeiro, Josilene Lima, Itatiane Rodart e Gisele Lopes pelo fornecimento de alguns dos reagentes e auxílio na utilização dos equipamentos da PCR;

Aos bolsistas e estagiários do LACEI Renata Siqueira Portella, Daniel Huber Pessina, Marcos Lázaro da S. Guerreiro que participaram direta ou indiretamente nas técnicas laboratoriais;

Às bibliotecárias, Ana Christina C. de Campos, Ana Maria Fiscina Sampaio, Adelvani Boa Morte pelo auxílio na revisão das referências bibliográficas e às funcionárias Evany de Araújo e Edite Silva Santos;

Ao Dr. Eduardo Ramos, chefe do laboratório de Histopatologia e os funcionários pelo fornecimento das lâminas histológicas;

À Fabienne Petitinga de Paiva e os demais funcionários do biotério do CPqGM pelo fornecimento dos camundongos suíços utilizados no presente trabalho;

Às secretarias do curso de Pós-graduação Rozália Meires Oliveira da Silva, Yumara Oliveira Evangelista e a Roberta Lopes pelo auxílio nas questões acadêmicas e a funcionária Fabíola da Conceição pela revisão do inglês dos manuscritos incluídos nesta tese;

Os funcionários do CDVC (Comunicação, Documentação Visual e Científica) Mário Coelho Cordeiro Neto, Hugo Vasconcelos e Gustavo Levi Tourinho Fernandez pela estruturação e organização das imagens incluídas nos manuscritos.

Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS	9
RESUMO	10
ABSTRACT	11
1 INTRODUÇÃO	12
1.1 Considerações gerais	14
1.2 A doença de Chagas	15
1.2.1 <u>Dados epidemiológicos</u>	15
1.2.2 Aspectos clínicos	18
1.2.3 Métodos diagnósticos na doença de chagas	19
1.2.4 Taxonomia do <i>Trypanosoma cruzi</i>	21
1.2.5 Variações intraespecíficas do <i>T. cruzi</i>	23
1.2.6 Cepas do <i>T. cruzi</i>	25
1.2.7 Caracterização biológica de cepas do <i>T. cruzi</i> (biodemas)	25
1.2.8 Inclusão dos biodemas nos taxos <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i>	27
1.2.9 Comportamento de cepas no modelo murino	29
1.2.9.1 Virulência e patogenicidade	29
1.2.9.2 Histotropismo	32
1.2.9.2.1 Mecanismo de invasão do parasito	32
1.2.9.2.2 Histotropismo de cepas e clones do <i>T. cruzi</i>	36
1.2.10 Caracterização clonal de cepas do <i>T. cruzi</i>	38
1.2.10.1 Evolução clonal do <i>T. cruzi</i>	38
1.2.11 Estrutura clonal das cepas do <i>T. cruzi</i>	40
1.2.12 Diversidade genética do <i>T. cruzi</i>	43
1.2.12.1 Zimodemas	43
1.2.12.2 Genoma do <i>T. cruzi</i>	46
1.2.12.3 Esquizodemas	47
1.2.13 Outras técnicas moleculares para o estudo do <i>T. cruzi</i>	51
1.2.14 Suscetibilidade de cepas e clones do <i>T. cruzi</i> aos quimioterápicos	54
1.2.14.1 Aspectos gerais	54
1.2.14.2 Resposta aos quimioterápicos de diferentes cepas e clones do <i>T. cruzi</i>	57
1.2.14.3 Testes de cura: parasitológico, sorológico e molecular	59
1.2.15 Hipóteses de investigação	62
2 OBJETIVO GERAL	63
2.1 Objetivos específicos	63
3 JUSTIFICATIVAS	64
MANUSCRITO 1	67
MANUSCRITO 2	93
ARTIGO 1	106
4 DISCUSSÃO	115
5 CONCLUSÕES	128
6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	129
7 APÊNDICE A	157
APÊNDICE B	165

LISTA DE ABREVIATURAS

- (CA)_nRY- Iniciador de citosina (C), adenina (A), purina (R) e pirimidina (Y)
- ALAT- Alanina aminotransferase
- ASAT-Aspartato aminotransferase
- DTU'S- unidades típicas distintas
- G6PDH- Glicose 6 fosfato desidrogenase
- GPI- Glicose fosfato isomerase
- IL-12- Interleucina 12
- kDNA- Acido desoxirribonucléico do cinetoplasto
- LSSP-PCR: Low-stringency single specific primer PCR (PCR de baixa
estringência com um único iniciador)
- nDNA- Acido desoxirribonucléico nuclear
- PCR- Polymerase chain reaction (reação em cadeia da polimerase)
- PFGE (Eletroforese em campo pulsado)
- PGM- Fosfoglucomutase
- RAPD- Randomly amplified polymorphic DNA (amplificação randômica do DNA
polimórfico)
- RFLP- Restriction fragment length polymorfism (polimorfismo de tamanho dos
fragmentos de restrição)
- RGDS- Aminoácidos: R- Arginina, G- Glicina, D- Ácido aspártico, S- Serina
- SSP-PCR- Simple sequence repeat anchored primer (PCR ancorado em
seqüência simples repetida)
- TESA-ELISA- Immunosorbent assay with *T. cruzi* excreted-secreted antigens
(teste ELISA com antígenos excretados e secretados por *T. cruzi*)

RESUMO

Análise Fenotípica e Genotípica de Clones da Cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, Isolados na Fase Aguda, Precoce e Avançada da Infecção. Investigação da Resposta à Quimioterapia.

As cepas do *Trypanosoma cruzi* são constituídas por populações multiclonais, heterogêneas, diplóides e apresentam polimorfismo nos fragmentos de restrição no minicírculo do kDNA e nos cromossomos do nDNA. Esta variabilidade genética intraespecífica das cepas é correlacionada ao seu comportamento biológico, tropismo tissular e à resposta aos quimioterápicos. A cepa Colombiana do *T. cruzi*, protótipo do Biodema Tipo III, Zimodema Z1, classificada como *T. cruzi* I é altamente resistente ao benzonidazol e ao nifurtimox. No presente estudo, investigou-se a composição clonal desta cepa. Foram estudadas em camundongos o comportamento biológico, o histotropismo, caracteres bioquímicos e genéticos e a resposta ao benzonidazol de 12 clones. Foram isolados sete clones no 30º dia de infecção, no pico da parasitemia (fase aguda avançada) e cinco clones no 10º dia de infecção (fase aguda precoce). Os clones isolados foram submetidos a passagens sucessivas em camundongos albinos Suíços para a obtenção do inóculo de 1×10^5 tripomastigotas, para infecção dos animais dos grupos experimentais. O comportamento biológico foi avaliado pela parasitemia, estudo morfológico dos parasitos e mortalidade dos animais infectados. Os padrões isoenzimáticos para os diversos clones foram obtidos pelas enzimas ALAT, ASAT, PGM e GPI. Os animais infectados com cada clone e com a cepa parental foram submetidos ao tratamento com benzonidazol durante 90 dias na dose de 100 mg/kg/dia. O estudo genético foi realizado pela amplificação por PCR de fragmentos de 330 pares de bases das porções variáveis do minicírculo do kDNA e por RFLP. Os fragmentos foram digeridos com as enzimas de restrição *Rsa* I, *Eco* RI e *Hinf* I. No geral o estudo biológico mostrou homogeneidade entre os clones e entre os clones e a cepa parental. Houve variação na parasitemia sendo que foi mais elevada em quatro dos sete clones isolados no 30º dia da infecção e em três dos cinco clones isolados no 10º dia. A caracterização isoenzimática incluiu os clones no mesmo Zimodema Z1, idêntico à cepa Colombiana parental. O estudo genético mostrou que os clones e a cepa parental apresentaram idêntico padrão de bandas nos fragmentos de restrição gerados pelas enzimas de restrição. O histotropismo dos clones foi ubiqüitário e não restritivo, foram mais encontrados no músculo esquelético e miocárdio, seguido pela presença de parasitos na parede intestinal, células de Kupffer e macrófagos do baço, plexo de Auerbach e adipócitos. Todos os clones apresentaram-se altamente resistente ao benzonidazol com índices de cura de 0% a 16,7% (para os clones isolados no 30º dia) e de 0% a 36,3% (para os clones isolados no 10º dia). A cepa Colombiana do *T. cruzi* apresenta uma grande homogeneidade populacional, sugerindo a predominância de um clone principal responsável pelas características da cepa.

PALAVRAS CHAVE: Genética. Clones. *Trypanosoma cruzi*. Quimioterapia.

ABSTRACT

Phenotypic and Genotypic Analysis of Clones of the Colombian Strain of *Trypanosoma Cruzi* Isolated in the Early and Late Phases of Acute Infection. Investigation on the Response to Chemotherapy.

Strains of *T. cruzi* are heterogeneous multiclonal, diploid populations, presenting high polymorphic restriction fragments of the kDNA minicircles and nDNA chromosomes. This intra-specific genetic variability is correlated with the biological behavior, tissue tropism and responses to chemotherapy. The Colombian strain of *T. cruzi*, prototype of Type III biodeme and Z1 zimodeme, classified as *T. cruzi* I, is highly resistant to benznidazole and nifurtimox. In the present study it was investigated the clonal composition of this strain to identify whether there are an homogeneity or heterogeneity of the isolated clones, considering different aspects: biological, biochemical and genetic, and the clonal histotropism, as well as the susceptibility to chemotherapy with benznidazole. The Clones have been isolated in two different phases of the acute infection in mice: seven clones on the 30th day of infection, corresponding to the parasitemic peaks (advanced acute phase) and five clones on the 10th day of infection (early acute phase) and inoculated into new-born mice. Successive passages into Swiss albino mice were done, to obtain the inoculum of 1×10^5 trypomastigotes for the infection of the experimental groups of mice. Biological behavior was evaluated by the parasitemic profiles, morphology of parasites in the blood and mortality indices. Isoenzymic profiles of ALAT, ASAT, PGM and GPI were established for the several clones. Treatment with Benznidazole was performed in experimental groups infected with each clone and the parental strain, in the dose of 250mg/kg/day, during 90 days. Genetic characterization was performed by the analyses of the kinetoplast DNA (kDNA) of parental strain and the clones. Schizodeme was established by comparative study of the 330-bp fragments amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the variable regions of the minicircles and by RFLP. Fragments have been digested by restriction endonucleases *Rsa* I, *Hinf* I and *Eco* RI. In general, biological characterization showed an homogeneity of the several clones and amongst the clones and the parental strain, although with variations in the parasitemia that was higher for four of the seven clones isolated in the 30th day and for three of five clones isolated in the 10th day. Isoenzymic characterization, confirms the clones into the zymodeme Z1, identical to the Colombian parental strain. Genetic characterization demonstrated an homology of the bands profiles of the restriction fragments from the minicircles of kDNA (RFLP) between the parental strain and the 12 clones. Histotropism of the several clones was ubiquitous and not restrictive, predominant for the skeletal muscles and myocardium also present in the intestinal wall, Kupffer cells, macrophages of the spleen, cells of the Auerbach' plexus and adipocytes. All the clones were highly resistant to chemotherapy with benznidazole with cure indices of 0% to 16% (for the isolated in the 30th day) and 0% to 36,3% (for the isolated in the 10th day). The overall analyses of the several parameters (genetic, biological, biochemical and response to chemotherapy) have shown phenotypic and genotypic homogeneity, of the Colombian strain and its clones, suggesting the predominance of a "principal clone" responsible for these characteristics.

KEY WORDS – Genetic. Clones. *Trypanosoma cruzi*. Chemotherapy.

1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas é considerada como um problema de Saúde Pública na América Latina. É uma doença causada pelo parasito heteroxênico, o *Trypanosoma cruzi*, um hemoflagelado tripanosomatídeo que envolve no seu ciclo de vida dois hospedeiros: os insetos hemipteros (triatomíneos reduvídeos) e vários grupos de mamíferos incluindo o homem. Cepas do *T. cruzi* isoladas dos vetores, dos reservatórios silvestres e de indivíduos humanos e estudadas no modelo murino experimental foram classificadas em diferentes biotipos (Tipo I, II e III) (ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), tendo sido determinados os perfis isoenzimáticos dos mesmos (ANDRADE et al., 1983) e a resposta aos quimioterápicos (ANDRADE et al., 1975, ANDRADE et al., 1985b). As cepas isoladas de diferentes áreas endêmicas foram caracterizadas pelos perfis de isoenzimas em diferentes zimodemas (MILES et al. 1980).

Foi demonstrado que as cepas são constituídas de populações multiclonais (TIBAYRENC & AYALA, 2002), são heterogêneas, diplóides com ausência de sexualidade mendeliana e grande variabilidade intraespecífica (TIBAYRENC & AYALA, 1991; RUIZ-GARCIA et al., 2001, BUSCAGLIA & NOIA, 2003) e com o genoma altamente polimórfico (HENRIKSSON et al., 1996, 2002).

As cepas do *T. cruzi* podem apresentar clones com características biológicas homogêneas (MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988; CAMPOS & ANDRADE, 1996; CAMANDAROBA et al., 2001) ou heterogêneas (POSTAN et al., 1986; MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988; LAURIA-PIRES & TEIXEIRA, 1994). As

cepas podem ser classificadas de acordo com suas características genéticas em diferentes esquizodemas (MOREL et al., 1980; MOREL & SIMPSON, 1980; ÁVILA et al., 1990; CAMPOS et al., 1999). O estudo de populações clonais contribui para determinar a homogeneidade clonal das cepas protótipos dos diferentes biodemas, quanto ao seu comportamento biológico, fenotípico, genotípico e resposta quimioterápica dos clones isolados. Neste sentido, CAMANDARоба et al., (2001) analisando sete clones isolados da cepa Colombiana do *T. cruzi* (protótipo do biodema Tipo III), na fase aguda avançada da infecção, verificaram uma homogeneidade fenotípica da cepa e dos seus clones isolados, sugerindo a predominância de um clone principal responsável pelo comportamento biológico da cepa e dos clones.

A homogeneidade clonal também foi demonstrada por CAMPOS et al. (1996, 1999), analisando clones e subclones isolados da cepa 21SF, protótipo do biodema Tipo II, quanto ao comportamento biológico e isoenzimático e por meio da análise do esquizodema. Isto sugere que há um clone principal circulando na área endêmica do Recôncavo Bahiano, responsável pelas características das cepas isoladas desta área endêmica (CAMPOS et al., 1999).

Os estudos desenvolvidos no presente trabalho visam contribuir para o conhecimento da estrutura clonal da cepa Colombiana, levando em conta diferentes aspectos ligados ao parasito (biológicos, bioquímicos e genéticos) e aspectos da relação parasito/ hospedeiro, como o histotropismo clonal e aspectos ligados à suscetibilidade dos clones *in vivo* aos quimioterápicos.

1.1 Considerações gerais

O *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico da tripanosomíase americana, foi descoberto por Carlos Chagas em 1909 isolado do triatomíneo *Conorhinus megistus*, hoje conhecido como *Panstrongylus megistus*, durante a campanha anti-palúdica em Lassance, Minas Gerais (CHAGAS, 1909a,b). No laboratório, examinando o conteúdo do intestino posterior de exemplares de conorrhinos coletados em Minas Gerais, pôde verificar a presença de numerosos flagelados com caracteres morfológicos de critídias (epimastigotas). A infecção experimental foi inicialmente realizada em macacos da espécie *Callithrix penicillata* pelo Dr. Oswaldo Cruz que, após 20 a 30 dias, observou no sangue do primata, número elevado de tripanosomas, de morfologia inteiramente diversa de qualquer das espécies conhecidas do gênero *Trypanosoma*. Outras infecções, por inoculações, foram realizadas em diversos animais de laboratório como os cães, cobaias, coelhos e outros macacos, inclusive alimentando os triatomíneos com sangue desses animais infectados e realizando expansões parasitárias em culturas axênicas. Aos peculiares tripanosomas que foram observados no sangue, no conteúdo estomacal de triatomíneos e em meios de cultura axênicas, Carlos CHAGAS nomeou como *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909a).

Entretanto, Carlos Chagas, ao observar formas esquizogônicas no pulmão de cobaias infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, passou a descrevê-lo como sendo um novo gênero: *Schizotrypanum*, denominando o parasito de *Schizotrypanum cruzi*. Isto não foi, entretanto confirmado tendo sido verificado que se tratava do protozoário *Pneumocystis carini* (CHAGAS, 1913). Foi corrigido o nome da

espécie para *Trypanosoma cruzi* do subgênero *Schizotrypanum*, em homenagem a Oswaldo Cruz (SOUSA,1999). Carlos Chagas (1909b) identificou, na mesma época, que o flagelado era parasito do homem e o agente etiológico de doença bem caracterizada por ele à qual nomeou como “Uma nova Tripanozomíase Humana”. Descreveu também o primeiro caso de forma aguda da doença em criança de dois meses de idade. A doença foi posteriormente designada por ele como “Tripanozomíase Americana”. Os seus contemporâneos a designaram como “Mal de Chagas”.

1.2 A doença de Chagas

1.2.1 Dados epidemiológicos

A doença de Chagas é uma zoonose causada pelo *Trypanosoma cruzi*, de larga distribuição geográfica na América do Sul, Central e no sul da América do Norte, atingindo 18 a 24,7 milhões de indivíduos, sendo que 90 milhões estão expostos à infecção. Considerando o peso relativo da doença de Chagas, comparada com outras enfermidades transmissíveis na América Latina e Caribe, e medida por “Anos de Vida Ajustados à Incapacidade (AVAI)”, a doença de Chagas ocupa o quarto lugar após as doenças respiratórias, diarréicas e AIDS. Em relação às enfermidades transmitidas por vetores, a doença ocupa o primeiro lugar, seguida da malária, esquistossomose e leishmanioses (SILVEIRA, 2002).

Embora o controle de triatomíneos reduziu a transmissão vetorial da espécie *Triatoma infestans* no continente americano e no Brasil (DIAS,

2002), a transmissão transfusional tem sofrido aumento em alguns países do Pacto Andino, Cone Sul, América Central e, particularmente, no sul dos Estados Unidos por intermédio de doadores de sangue e de imigrantes de países da América Latina (BARNABÉ et al., 2001b; SILVEIRA, 2002; LEIBY et al., 2002).

O programa de controle da doença de Chagas no Brasil (PCDCh) teve início em 1975, nas principais áreas endêmicas do país, Rio Grande do Sul, Paraná, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Mato Grosso, Bahia, Piauí e Pernambuco, infestados pelo *Triatoma infestans* com um índice de triatomíneos positivos para o *T. cruzi* de 31,8%. Três anos após a implantação do programa, este índice foi reduzido para 8,3% e de 1,77% até o ano 2000 (SILVEIRA, 2002). Os resíduos de transmissão ainda se encontram nos estados da Bahia, Minas Gerais, Pernambuco, Rio Grande do Sul e no Tocantins (SILVEIRA, 2002). A implantação do programa de eliminação do *T. infestans* (PETI) teve início em 1992 e visava eliminar os triatomíneos do domicílio humano por meio de borrição pelo DDT para redução dos triatomíneos e possibilidade de eliminação da espécie (DIAS, 2002).

Nos países que compõem o Pacto Andino, como Equador, Venezuela e Peru, o índice de transmissão por transfusão de sangue corresponde a 4,8% em uma população de soropositivos de 3.900.000, incluindo a Colômbia. O índice de doadores de sangue nos países do Cone Sul (Argentina, Uruguai, Chile e Brasil), infectados com o *T. cruzi*, atinge 7,3% com uma população de soropositivos de 5.997.000. O Chile, embora tenha ainda doadores de sangue infectado, é o único país que se encontra livre da transmissão vetorial da doença de Chagas (SCHOFIELD & DUJARDIN, 1997; FELICIANGELI et al., 2003).

Na Colômbia, estima-se que 5% da população esteja infectada, sendo que 20% dos indivíduos vivem em áreas de risco com uma taxa de prevalência nos bancos de sangue de 2,1 a 2,3% (SCHOFIELD & DUJARDIN, 1997; WHO, 2002). No Brasil, estima-se que 10 a 40% da população de indivíduos infectados desenvolvam clinicamente a doença, com 4,8 a 5,4 milhões de indivíduos que apresentam alterações clínicas atribuídas à doença de Chagas, com uma taxa de prevalência nos bancos de sangue de 0,73% (WHO, 2002).

Nos países da América Central como Honduras, México, Guatemala, Costa Rica e Belize, os doadores de sangue, infectados pelo *T. cruzi*, somam 13,45%, com uma população de soropositivos de 4.167.000, índice considerado elevado no continente americano. No Panamá, não há programa de controle de vetores triatomíneos (SCHOFIELD & DUJARDIN, 1997; GUZMÁN-BRACHO, 2001).

Nos Estados Unidos, a doença de Chagas é rara. A infecção com o *T. cruzi* tem sido observada em mamíferos peri-domésticos (cães, tatus, coatis e marsupiais). Menos freqüentemente, as cepas têm sido isoladas de triatomíneos. As principais espécies silvestres de triatomíneos *T. sanguissuga* e *T. protacta* encontram-se distribuídas, respectivamente, no sul e norte do país. Os casos positivos de soroprevalência (0,067%), em Los Angeles e Miami, são registrados como sendo de doadores de sangue, imigrantes de países nos quais a doença de CHAGAS é endêmica (LEIBY et al., 2002).

1.2.2 Aspectos clínicos

A doença de Chagas evolui clinicamente em duas fases: a fase aguda e a fase crônica, sendo que esta inclui as formas indeterminada, cardíaca e digestiva. A fase aguda começa quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva ocular, pele causando uma reação local ou por via oral e transfusão sangüínea. Estas portas de entrada podem ser diagnosticadas pela presença do chagoma de inoculação (na pele), e pelo sinal de Romaña (no olho), que é representado por um edema bipalpebral unilateral. Outros sintomas mais gerais ocorrem como febre, polilinfadenopatia e miocardite. Após a regressão dos sintomas da fase aguda, o paciente passa a uma fase assintomática que representa a forma crônica indeterminada que pode evoluir para uma forma crônica sintomática, cardíaca ou digestiva em cerca de 30% dos casos. Na fase crônica, os parasitos apresentam-se subpatentes, detectáveis após os testes parasitológicos e pela positividade do soro, para anticorpos anti-*T. cruzi*. A forma indeterminada é identificada por meio de critérios diagnósticos, como a positividade sorológica e/ou parasitológica, ausência de sintomas, com eletrocardiograma normal, e estudo radiológico do coração, esôfago e cólon normais (RIBEIRO & ROCHA, 2000). A forma crônica digestiva caracteriza-se por alterações do sistema nervoso parassimpático (plexos de Meissner e Auerbach) na parede intestinal e presença das síndromes de megaesôfago e megacólon (REZENDE & MOREIRA, 2000). A cardiopatia chagásica crônica resulta de dano miocárdico progressivo; 30% das manifestações clínicas são significativas, associando-se à morbidade e à mortalidade dos pacientes (MARIN-NETO et al., 2000).

1.2.3 Métodos diagnósticos na doença de Chagas

Os diferentes métodos diagnósticos atualmente utilizados têm sido amplamente testados e avaliados, por diferentes pesquisadores, como foi extensamente revisto por GOMES (1996) e por LUQUETTI & RASSI (2000).

Os testes diagnósticos na doença de Chagas humana são de muita importância, não só para o esclarecimento de casos clínicos individuais, como na identificação da forma indeterminada, na confirmação etiológica das miocardiopatias e nas pesquisas epidemiológicas em áreas endêmicas. São também indispensáveis para a avaliação de cura após a quimioterapia, permitindo assim avaliar a eficácia dos medicamentos em uso clínico.

De acordo com os autores GOMES (1996) e LUQUETTI & RASSI (2000), os métodos mais utilizados no diagnóstico da doença de Chagas são os testes parasitológicos (diretos e indiretos) e os testes sorológicos convencionais (fixação de complemento, hemaglutinação e imunofluorescência indireta e ELISA). Os testes sorológicos não convencionais são utilizados para a detecção de complexos imunes, antígenos circulantes do *T. cruzi*, antígenos liberados na fase aguda da infecção (SAPA) (FRASH & REYES, 1990), antígenos repetitivos do citoplasma (CRA) e do flagelo (FRA) (KRIEGER et al., 1992) e excretados e secretados pelos tripomastigotas (TESA-ELISA) (UMEZAWA et al., 1999, 2001, 2004).

A PCR também tem sido utilizada por diferentes autores como teste complementar aos testes parasitológicos e sorológicos, em pacientes humanos com doença de Chagas, submetidos ou não ao tratamento quimioterápico (WINCKER et al., 1994; BRITTO et al., 2001). Embora a PCR apresente uma alta

sensibilidade, os resultados obtidos por diferentes autores nem sempre têm sido concordantes. WINCKER et al. (1994) em amostras de sangue de pacientes humanos na fase crônica da infecção, demonstraram que a PCR apresenta altos índices de positividade (96,5%). Os altos índices de positividade foram obtidos por ÁVILA et al. (1990) em 56 amostras obtidas de vários hospedeiros e de pacientes humanos de várias áreas geográficas. BRITTO et al. (1995), verificaram que nove dos 32 pacientes humanos submetidos a tratamento com Benzonidazol, atendidos no Hospital Evandro Chagas (Rio de Janeiro), apresentaram PCR positiva os quais permaneceram reativos com a sorologia clássica. Em outros estudos para avaliar a PCR em pacientes de Mambaí (Goías) e de São Felipe (Bahia) que foram submetidos ao tratamento com Benzonidazol foi verificado PCR positiva em 25 dos 76 pacientes (33%) em única reação da PCR o que revelou a eliminação dos parasitos em 67% (BRITTO et al., 1999b).

BRITTO et al. (2001) puderam demonstrar em amostras de sangue de 85 pacientes submetidos ao tratamento com Benzonidazol e nifurtimox (37 na fase aguda e 48 na fase crônica indeterminada) a PCR positiva em 27% (10/37) e 35% (17/48) respectivamente. A baixa sensibilidade da PCR foi detectada no grupo de pacientes crônicos assintomáticos (grupo não tratado) com positividade de 53% confirmando a escassez de parasitemia na fase crônica da infecção.

Várias discrepâncias nos resultados da PCR foram observadas por Solari et al. (2001) em amostras de sangue de crianças e adultos com doença de Chagas do Chile e que foram submetidos ao tratamento com Nifurtimox. A PCR mostrou positividade entre 69 a 100% em crianças e adultos, sendo atribuídos os vários

resultados negativos da PCR nos pacientes adultos, ao pequeno volume de sangue utilizado para a extração do DNA (1mL).

Os métodos diagnósticos também podem ser adaptados para os animais de laboratório, não só para a confirmação da infecção na fase crônica como para a confirmação de cura parasitológica e de negatificação sorológica.

Ressalta-se a importância destes testes no presente trabalho (parasitemia direta, xenodiagnóstico, hemocultura, PCR e imunofluorescência indireta) que tem como um dos objetivos a investigação da suscetibilidade ao tratamento quimioterápico de clones isolados de uma cepa do *T. cruzi* altamente resistente. Os testes de cura usados em humanos podem ser adaptados para o uso nos animais experimentais.

1.2.4 Taxonomia do *Trypanosoma cruzi*

O gênero *Trypanosoma* foi identificado, primeiramente, por GRUBY em 1843 (*Apud* PESSOA; MARTINS, 1977) no sangue de rã e posteriormente nos répteis, pássaros e mamíferos. O seu ciclo de vida envolve fases evolutivas diferentes (esferomastigotas, epimastigotas e tripomastigotas) no trato intestinal e glândula salivar dos seus hospedeiros invertebrados. Os principais hospedeiros invertebrados são as lesmas (Veronicellidae), as sanguessugas (Hirudinea), as moscas ciclorrhafas, os sifonápteros pulicídeos, os insetos tabanídeos e os triatomíneos reduvídeos. Os hospedeiros vertebrados incluem uma grande diversidade de animais e o homem.

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário sangüíneo, pertencente ao reino Protista ou Protoctista e sub-reino Protozoa. Incluídos no filo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, são protozoários flagelados, multiplicando-se por divisão binária. Os tripanosomatídeos pertencem à ordem Kinetoplastida, possuem o cinetoplasto, uma estrutura do citoplasma que contém milhares de moléculas circulares de DNA (kDNA) que codificam os RNA ribossômicos e as enzimas envolvidas na respiração celular (FRANCO DA SILVEIRA, 2000) e uma única mitocôndria associada ao cinetoplasto. Os estágios evolutivos da espécie se desenvolvem no trato intestinal dos insetos hemípteros reduvídeos. Nesta ordem, estão agrupadas, além da espécie citada, as espécies dos complexos *Leishmania* (LEVINE et al., 1980).

HOARE (1964 *apud* PESSOA; MARTINS, 1977) subdividiu os tripanosomas em duas seções: Salivaria e Stercoraria. O gênero *Schizotrypanum* está incluído na seção Stercoraria, porque o parasito se desenvolve na região posterior do transmissor (trato digestivo anterior, médio e ampola retal). A forma tripomastigota apresenta 17 a 20µm de comprimento por 4 µm de largura e a forma tipicamente recurvada em forma das letras C ou U nos esfregaços sangüíneos. O cinetoplasto é terminal ou subterminal com a extremidade pontiaguda permitindo a diferenciação em formas largas e delgadas além do formato do corpo celular.

As análises moleculares e filogenéticas do RNA ribossomal têm sugerido modificações na classificação tradicional, reunindo a ordem Kinetoplastida (*Trypanosoma* e *Leishmania*) no grupo Euglenozoa ao lado de Euglenophyta, um fitoflagelado de vida livre (MEEÛS & RENAUD, 2002).

As análises filogenéticas, através da expressão de genes do RNA ribossomal mitocondrial que compõem as subunidades 9S e 12S, os genes do fator 1 alfa, trypanothione redutase, α -tubulina e fosfoglicerato cinase usando mais de cinco espécies de tripanosomas também indicam que o gênero pode ser monofilético (STEVENS et al., 1998; STEVENS & GIBSON, 1999 a,b). As relações filogenéticas dos tripanosomas baseando nestas subunidades do RNA ribossomal não apresentaram evidências de co-evolução entre os parasitos e seus hospedeiros vertebrados e invertebrados tendo sido acompanhada de aquisições secundárias de seus hospedeiros e de habitats (MASLOV et al., 1996).

1.2.5. Variações intraespecíficas do *T. cruzi*

A diferença do comportamento de amostras do *T. cruzi* de diferentes procedências foi registrada desde os estudos iniciais de BRUMPT & SILVA (1912), pela inoculação em cobaios de amostra isolada em Minas Gerais por Carlos Chagas e outra da Bahia, isolada por Pirajá da Silva, tendo observado diferenças na virulência das mesmas. Desde então, os parasitos provenientes de diferentes áreas endêmicas e que foram isolados de pacientes humanos, de triatomíneos, ou provenientes dos reservatórios silvestres e mantidos no laboratório em culturas axênicas e passagens sucessivas em camundongos, foram designados pelos diferentes pesquisadores como cepas, estoques ou isolados do *T. cruzi*. Os diversos estudos posteriores investigaram o comportamento de diferentes amostras, assinalando as variações de comportamento das mesmas. Os trabalhos mais significativos foram os de BRENER (1965,1969); BRENER & CHIARI (1963);

MELO; BRENER (1978) que chamaram a atenção para o significado das variações morfológicas e do tropismo tissular. Foram então designadas cepas Y e CL como cepas polares (BRENER, 1977). Os estudos de ANDRADE et al. (1970b); ANDRADE (1974) representam a primeira tentativa de classificação de cepas do *T. cruzi*, utilizando parâmetros morfológicos e histopatológicos (MOMEN, 1999).

Os estudos de TIBAYRENC & AYALA (1987); TIBAYRENC et al. (1990) descreveram que a variabilidade intraespecífica é revelada pelos padrões de isoenzimas, sugerindo que o *T. cruzi* é diplóide, heterogêneo, geneticamente polimórfico e constituído de uma estrutura clonal manifestada com a perda da sexualidade. Deve-se ressaltar que caso houvessem combinações ao acaso, os padrões de isoenzimas seriam diferentes dos apresentados pelas cepas. A presença de genes alelos heterozigotos reflete a variabilidade dentro dos indivíduos de uma mesma espécie. Esta variabilidade intraespecífica foi consolidada pela caracterização do kDNA obtendo-se os fragmentos de DNA do cinetoplasto por enzimas de restrição os quais permitiram a classificação das cepas em esquizodemas (MOREL et al., 1980; ÁVILA et al., 1990).

A interpretação fenética dos zimodemas e a análise dos esquizodemas permitem supor que os clones analisados são na realidade clones naturais compondo a população de uma cepa (TIBAYRENC & AYALA, 1987; 1988).

1.2.6 Cepas do *T. cruzi*

O conceito de cepas do *T. cruzi* foi consolidado por LUMSDEN (1977) como uma população derivada de um isolado, mantidas em laboratórios, em reprodução contínua por passagens sucessivas seriadas, quer mecânica ou cíclica, em cultura ou em animais de laboratório.

1.2.7 Caracterização biológica de cepas do *T. cruzi* (Biodemas)

ANDRADE et al. (1970b) estudando os caracteres parasitológicos, morfológicos e as lesões histopatológicas produzidas por cepas procedentes de diferentes áreas geográficas (cepa Peruana, São Felipe e Colombiana) demonstraram que as mesmas, além de diferirem no seu comportamento no animal experimental quanto à patogenicidade, às curvas de mortalidade e de parasitemia, também mostravam padrões morfológicos diversos. Foi verificado também que produziam diferentes lesões tissulares. Esses caracteres, analisados em conjunto, definiram padrões para as cepas existentes, permitindo classificá-las em Tipos morfológicos e histopatológicos (Tipos I, II e III). Esta classificação foi recomendada pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 1986), como referência para a classificação de cepas do *T. cruzi*.

O estudo de 23 cepas isoladas do Recôncavo Bahiano, por ANDRADE (1974), consolidou a classificação proposta em Tipos biológicos (Tipo I, II e III) e permitiu demonstrar a presença exclusiva de um mesmo tipo de cepa na referida área endêmica, o Tipo II.

As cepas protótipos do Tipo I (cepas Y e Peruana) apresentam multiplicação rápida com picos parasitêmicos muito elevados entre 9 e 10 dias de infecção; mortalidade de 100% entre 10 e 12 dias; predominância de formas delgadas e acentuado macrofagotropismo no início da infecção; predominância de formas largas e miotropismo na infecção avançada. As cepas protótipos do Tipo II (cepas 12SF, 21SF) apresentam multiplicação relativamente lenta com picos de parasitemias irregulares entre 12 e 20 dias de infecção; virulência muito variável com mortalidade média entre 20 e 25 dias; pequeno número de formas delgadas, e discreto macrofagotropismo no início da infecção; predominância de formas largas em todo o curso da infecção. Tropismo predominante para o miocárdio. A cepa protótipo do Tipo III (cepa Colombiana), apresenta multiplicação mais lenta atingindo picos parasitêmicos muito elevados entre 20 e 30 dias; de início, quando foi primeiro submetida à caracterização morfobiológica (ANDRADE et al., 1970b), esta cepa se apresentou com baixa virulência, com mortalidade nula até 50 dias e predominância de formas largas em todo o curso da infecção. Entretanto, ao se adaptar ao camundongo por passagens sucessivas, a virulência desta cepa se tornou mais elevada, com mortalidade a partir do 30º dia e apresentou formas delgadas no início da infecção. As cepas do Tipo III são miótropicas, apresentando lesões em maior grau no músculo esquelético e em menor grau no miocárdio.

Segundo ANDRADE (1974), há uma nítida correlação entre os diversos caracteres de uma mesma cepa, observando-se coincidência entre rápida multiplicação parasitária, macrofagotropismo, e presença predominante de formas

delgadas no início da infecção, por um lado e, por outro, multiplicação parasitária lenta, miotropismo e predominância de formas largas.

ANDRADE et al. (1983) correlacionaram os padrões de isoenzimas, propostos por MILES et al. (1980) para as enzimas PGM, GPI, ALAT e ASAT, aos Tipos biológicos ou biodemas. Foi demonstrado por estes autores que a caracterização biológica tem correspondência com os perfis isoenzimáticos sendo que as cepas 12SF, 21SF (Tipo II) pertencem ao zimodema Z2, a cepa Colombiana (Tipo III) pertence ao zimodema Z1. As cepas do Tipo I não foram enquadradas dentro da classificação proposta por MILES (1980), sendo posteriormente agrupadas dentro do zimodema Z2b.

A nomenclatura biodema foi posteriormente proposta para designar os Tipos biológicos das cepas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), em extenso estudo de 138 cepas isoladas de pacientes, ou de vertebrados naturalmente infectados de distintas áreas geográficas do Brasil e da América do Sul e Central. Foram classificadas nos diferentes biodemas: biodema Tipo I, cepas de São Paulo, Santa Catarina, Rio Grande do Sul e Argentina; biodema Tipo II, cepas de São Felipe -BA , Mambai - GO; Montalvânia – MG; biodema Tipo III, cepas do Norte e Nordeste do Brasil, Honduras, Guatemala e Bolívia (ANDRADE et al., 1985b; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

1.2.8 Inclusão dos biodemas nos taxa *T. cruzi* I e *T. cruzi* II

Os diversos estudos biológicos (biodemas) (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), bioquímicos (zimodemas) (MILES et al., 1980), moleculares

(esquizodemas) (MOREL et al., 1980), visando uma classificação das cepas do *T. cruzi* demonstraram que não seria possível estabelecer uma classificação geral para cepas. Uma classificação consensual somente foi possível, após a realização do *Simposio Internacional sobre Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 Anos Após a Sua Descoberta* (ANONYMOUS, 1999).

Os representantes de diferentes grupos de pesquisa propuseram uma nova classificação para o *T. cruzi*, o qual foi agrupado em dois taxos: *T. cruzi* I e II, procurando incluir os parâmetros já citados e mais as classificações filogenéticas baseadas na análise de multiloci enzimáticos (MLEE) (TIBAYRENC & AYALA, 1988) e as classificações em diferentes linhagens baseadas no DNA ribossomal (SOUTO et al., 1996) e nos genes de mini-exon (FERNANDES et al., 1999a,b).

A classificação proposta em *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999) baseou-se nas classes da nomenclatura de Lineu que agrupa em:

“uma nova nomenclatura para designar diferentes categorias subespecíficas novas que são descobertas por novos métodos de caracterização de acordo com a multiplicidade de populações funcionalmente diferentes que existam dentro de uma mesma espécie morfológica” (MOMEN, 1999. p.182).

De acordo com esta classificação (ANONYMOUS, 1999), as cepas do biotopo Tipo II foram incluídas no Taxo *T. cruzi* II e as do biotopo Tipo III foram incluídas no Taxo *T. cruzi* I. Não foi possível enquadrar nos novos taxos o biotopo do Tipo I (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997) e as cepas do ziotopo Z3 (MILES et al., 1980).

1.2.9 Comportamento de cepas no modelo murino

1.2.9.1 Virulência e patogenicidade

As cepas, após isoladas e inoculadas em camundongos, podem apresentar diferentes graus de virulência e patogenicidade. ANDRADE (1974), estudando cepas do Recôncavo Baiano e de outras procedências do continente americano, que apresentavam diferentes comportamentos biológicos, sugeriu que a virulência está ligada à maior ou menor capacidade de multiplicação do parasito. De acordo com ANDRADE (1974), a virulência é própria para uma determinada cepa, mas pode variar dentro de certos limites, de acordo com inúmeras variáveis, podendo ser atenuada ou exaltada. A patogenicidade representaria a capacidade de determinar lesões tissulares que podem levar os animais à morte em diversas fases da infecção, a depender dos setores atingidos. Portanto, a patogenicidade seria um caráter constante enquanto que a virulência seria um caráter flutuante.

As cepas classificadas no biodema Tipo I são altamente virulentas e muito patogênicas, levando-se em conta a sua ampla distribuição pelo organismo, levando a altos níveis precoces de parasitemia e alta mortalidade.

As cepas classificadas no biodema Tipo II variam quanto ao seu grau de virulência, considerando-se os níveis parasitêmicos e os índices de mortalidade, porém são muito patogênicas determinando intensa miocardite na fase aguda da infecção experimental do camundongo. Desde os estudos iniciais, das cepas isoladas no Recôncavo Bahiano (ANDRADE, 1974) as mesmas foram

classificadas como de baixa, média e alta virulência, considerando-se os parâmetros mortalidade dos animais infectados, níveis parasitêmicos e intensidade das lesões.

A cepa Colombiana classificada no Tipo III pode ser considerada de baixa virulência, apresentando uma evolução lenta da parasitemia na fase inicial da infecção, porém, ao mesmo tempo, são altamente patogênicas, determinando nos animais experimentais, lesões intensas no miocárdio e, em maior intensidade, em músculo esquelético, com parasitismo e infiltrados inflamatórios mononucleares.

Tem sido demonstrada, em diferentes estudos, a manutenção dos caracteres biológicos e isoenzimáticos das cepas protótipos, mantidas em laboratório por vários anos por passagens sucessivas em camundongos, em meio de cultura axênico ou por criopreservação. Um estudo da cepa 21SF (isolada em São Felipe-Bahia) e de seus clones permitiu demonstrar, a manutenção dos caracteres da cepa parental, muitos anos após o seu isolamento e a homologia de seus clones em relação à cepa original (CAMPOS & ANDRADE, 1996; CAMPOS et al., 1999).

MAGALHÃES et al. (1996); MAGALHÃES & ANDRADE (1991) estudaram o comportamento biológico e isoenzimático de três cepas procedentes do Recôncavo Bahiano (19SF, 21SF e 22SF) pertencentes ao biodema Tipo II, após passagem em espécies de triatomíneos autóctones ou oriundos de outras áreas (*Triatoma infestans* e *Panstrongylus megistus*). Após reisoladas e inoculadas em camundongos, as cepas mantiveram o mesmo comportamento biológico e o mesmo perfil das isoenzimas, idênticos aos padrões de cepas dos biodemas Tipo II, zimodema II. Porém, foi observado um aumento da virulência, com as cepas

após passagens em triatomíneos isoladas de *Pastronylus megistus* e *Triatoma infestans*.

Entretanto, outros estudos demonstram que as passagens em camundongos podem selecionar populações, seja devido a uma heterogeneidade de seus clones ou por uma infecção concomitante com diferentes cepas. Os estudos de DEVERA et al. (2002, 2003) investigando o comportamento biológico, bioquímico e molecular de 13 cepas do *T. cruzi* de Minas Gerais antes e após passagens em camundongos e em meio de cultura mostraram que nove cepas apresentaram comportamento similar ao das cepas do biotopo II e cinco foram caracterizadas como biotopo III. Segundo os autores em pelo menos oito cepas houve algum tipo de seleção de parasitos por parte do camundongo e/ou cultura apresentando um perfil distinto entre a cepa original e após a manutenção. As técnicas moleculares (RAPD e RFLP-ITS rDNA) apresentaram maior índice de diversidade entre as cepas originais e suas correspondentes após a manutenção.

GÁRZON et al. (2003) em estudos desenvolvidos com camundongos infectados com clone TcY7 com deleção do gene Tc52 ^{+/-} em comparação com a cepa Y demonstraram que os animais infectados com clone TcY7 apresentaram baixa virulência *in vitro* e *in vivo* traduzida por baixas parasitemias.

1.2.9.2 Histotropismo

1.2.9.1.1 Mecanismos de invasão do parasito

Os mecanismos de invasão do *T. cruzi* envolvem uma fase inicial de adesão celular, a invasão e o escape do vacúolo parasitóforo (TAN & ANDREWS, 2002). Os estágios iniciais são: 1) os tripomastigotas se ligam na superfície celular; 2) os lisossomas da célula do hospedeiro são recrutados para os sítios de união e se inicia a fusão com a membrana plasmática; 3) formação do vacúolo parasitóforo intracelular (HALL, 1993; TAN & ANDREWS, 2002).

O *T. cruzi* invade as células do hospedeiro por duas vias: por meio dos macrófagos ativados ou das células não fagocíticas. As formas tripomastigotas quando são fagocitadas pelos macrófagos transformam-se em amastigotas dentro de vacúolo parasitóforo podendo sofrer a ação dos produtos metabólicos dos macrófagos como H_2O_2 e OH^- e NO com destruição dos parasitos intracelulares. A fagocitose envolve a polimerização de actina e formação de pseudópodos enquanto que nas células não fagocíticas o processo se realiza na ausência de microfilamentos de actina, com formação de projeções da membrana plasmática da célula do hospedeiro (DE SOUZA, 2000). Os estudos de ANDRADE & GRIMAUD (1984), investigando as células cardíacas de camundongos infectados pelo *T. cruzi* por meio de estudo com platina goniométrica a 0° de inclinação e a um ângulo de $+60^\circ$, verificaram que o parasito após a penetração no miócito não se encontra dentro do vacúolo fagocítico, mas em contato íntimo com as miofibrilas e organelas citoplasmáticas; esta observação feita *in vivo* não pode,

entretanto, excluir a possibilidade de que tenha se formado um vacúolo parasitóforo que tenha se desfeito rapidamente.

Durante o processo de invasão, os tripomastigotas expressam atividade de trans-sialidase transferindo a-2,3-sialyllactose ligada ao ácido siálico por âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI) para epítomos específicos de tripomastigotas denominado de Ssp-3 (SCHENKMAN et al., 1991; SCHENKMAN et al., 1993; SCHENKMAN et al., 1994)) e antígenos de superfície dos tripomastigotas (TSSA) altamente antigênica durante a infecção experimental (DI NOIA et al., 2002). Foi verificado por SCHENKMAN et al (1992) que as atividades de trans-sialidase e neuraminidase podem ser mediadas pela mesma enzima do *T. cruzi* tendo sido correlacionada à expressão dos genes que codificam glicoproteínas de 85-kDa (ABUIN et al., 1999). As glicoproteínas são mucinas (TcMUC) glicosiladas e proteínas ancoradas pela GPI, ricas em resíduos de Thr (Treonina), Ser (Serina) e Pro (Prolina) ligadas por O-glicanos e resíduos de Nacetilglucosamina como foi demonstrado por ACOSTA-SERRANO et al. (2001). CHUENKOVA & PEREIRA (1995) associaram o papel da trans-sialidase com a virulência em camundongos BALB/c os quais apresentaram altas parasitemias e mortalidade elevada. A expressão do gene vp85.1 da trans-sialidase tem sido correlacionada em clones virulentos, sugerindo a participação da trans-sialidase vp85 na virulência do parasito (WESTON et al., 1999).

PEREIRA & HOFF (1986), estudando a atividade da neuraminidase (trans-sialidase) de várias cepas do *T. cruzi*, mostraram que existe alta atividade da mesma na cepa Colombiana quando comparada com a cepa Y e 12SF, o que

pode estar associado com a maior capacidade de penetração dos parasitos principalmente em músculo esquelético, da cepa Colombiana.

As formas tripomastigotas aderem à superfície celular com a participação dos componentes da matriz extracelular (ECM). A fibronectina e RGDS* (Arg-Gly-Asp-Ser) participam como moléculas ponte para facilitar a união do parasito com a célula alvo (OUAISSI, 1988). Assim, os parasitos entram na célula alinhados preferencialmente ao longo da membrana basal onde a fibronectina e os receptores da célula hospedeira estão concentrados (NOISIN & VILLALTA, 1989).

Estudos *in vivo* e *in vitro* sobre a interação do *T. cruzi* e os cardiomiócitos têm demonstrado a participação da fibronectina e de aminoácidos. CALVET et al. (2004) verificaram que a interação de cardiomiócitos e tripomastigotas do clone Dm28c do *T. cruzi* com fibronectina (FN) e os peptídeos sintéticos MRGDS (Met-Arg-Gly-Asp-Ser) reduzem a infecção em comparação com o controle, demonstrando o papel da fibronectina e dos aminoácidos no processo de invasão do parasito.

As cisteínas proteases (CP) presentes em tripomastigotas tem sido associadas à invasão do parasito. Estudos desenvolvidos por APARÍCIO et al. (2004) com cruzipaina dos clones DM28c, Sylvio X10/6 e do isolado G demonstraram que os altos níveis de cruzipaina foram apresentados pelos clones Dm28 e Sylvio X10/6.

A participação do cálcio, proteínas de membrana e enzimas tem sido associados com a invasão do parasito dependente da proteína cinase, fosfolipase C e IP3 (inositol-4,5-trifosfato), do aumento na concentração do Ca^{2+} citossosólico. A cascata de sinalização é iniciada com a participação da glicoproteína gp82 da superfície celular dos parasitos (YOSHIDA et al., 2000; NEIRA et al, 2002) das

formas tripomastigotas metacíclicas e mobilização intracelular do Ca^{2+} (MANQUE et al., 2003).

Os fatores de virulência estão correlacionados com a expressão das glicoproteínas de membrana e com a penetração do parasito na célula hospedeira. A redução da expressão da glicoproteína gp82 e as atividades da cruzipaina e trans-sialidase das formas tripomastigotas metacíclicas do clone CL-14, tem sido associada com sua baixa virulência que seria devida à sua baixa capacidade de invasão (ATAYDE et al., 2004). Foram demonstrados através dos estudos de CORTEZ et al. (2003); NEIRA et al., (2003) que camundongos infectados pelo *T. cruzi* por via oral com tripomastigotas metacíclicas e deficientes em gp82 que os animais desenvolveram baixas parasitemias em relação aos controles infectados pelos parasitos que expressavam gp82. BASOMBRÌO et al. (2002) verificaram que a deleção do gene gp72 clone do *T. cruzi* diminui a infectividade em camundongos e insetos vetores. Entretanto, os estudos de MÁLAGA & YOSHIDA, (2001) demonstram que gp90 não está associada com a invasão do parasito.

Recentemente, MORTARA et al. (2005) demonstraram *in vitro* que o processo de invasão em células HeLa e Vero difere entre as formas amastigotas e tripomastigotas das cepas G (*T. cruzi* I) e CL (*T. cruzi* II). Os autores verificaram que as projeções de actina e o recrutamento de Ca^{2+} dos acidocalcisomas dependente do fosfatidil inositol (IP) também diferem entre as formas infectivas de diferentes cepas classificadas nos taxos *T. cruzi* I e II.

Após entrar na célula, em pH ácido, os parasitos escapam para o citosol e são encontrados livres no citosol e a membrana do vacúolo aparece gradualmente destruída em pH ácido. O *T. cruzi* secreta uma proteína relacionada ao

componente C9 do complemento e mostrou ter uma atividade formadora de poros. Estes achados levam a uma proposta de que a dilaceração do vacúolo pelo *T. cruzi* pode ser mediado por secreção de proteína formadora de poro (HALL, 1993; ANDREWS, 1994). O escape do compartimento fagolissomal se dá através da lise das membranas dos fagossomos por uma proteína TcTOX derivada do *T. cruzi* facilitando o escape do parasita do vacúolo parasitóforo, permitindo que o parasito penetre no citoplasma antes que possa ocorrer a fusão com os lisossomas (HALL & JOINER, 1993). A demonstração de que a formação de novos vacúolos intracelulares circundando o *T. cruzi* contenha glicoproteína lisossomal IGP abriu novas perspectivas no processo de dilaceração vacuolar. IGPs A e B são as mais abundantes, contém proteínas sializadas que forram o lado luminal dos lisossomas dos mamíferos (ANDREWS, 1994). As formas tripomastigotas quando saem da célula contém ácido siálico e rapidamente entram na corrente sangüínea expressando atividade de trans-sialidase (SCHENKMAN et al., 1991).

1.2.9.1.2 Histotropismo de cepas e clones do *T. cruzi*

O histotropismo de cepas do *T. cruzi* dos diferentes biotopos, na fase aguda da infecção é um caráter intrínseco das mesmas, tendo sido observado, desde os estudos iniciais comparativos entre cepas Y e Colombiana (ANDRADE & ANDRADE, 1966), no modelo do camundongo Suiço. Foram descritas marcantes diferenças entre as referidas cepas, quanto ao tropismo tissular, à virulência e à patogenicidade, sendo a cepa Y predominantemente macrofagotrópica. O macrofagotropismo da cepa Y foi também confirmado por MELLO & BRENER

(1978). Quanto às cepas dos biodemas Tipo II e III há nítida predominância de miotropismo.

Como já referido, as cepas dos biodemas Tipo II e III são caracteristicamente miotrópicas, com predominância do parasitismo do miocárdio e do músculo esquelético, e comprometimento da musculatura lisa do trato digestivo. Neste caso, a capacidade de invasão e de multiplicação intracelular das formas metacíclicas do *T. cruzi*, está na dependência de suas glicoproteínas de superfície. As glicoproteínas de superfície têm importante papel porque estão envolvidas na interação do parasito com as células do hospedeiro e são alvo da resposta imune do hospedeiro vertebrado. Segundo PEREIRA & HOFF (1986) há diferenças na atividade da neuraminidase nas cepas do *T. cruzi*, sendo que a cepa Colombina apresentou atividade mais elevada da neuraminidase em comparação com a cepa Y e 12SF, o que pode estar associado com o miotropismo dessa cepa (PEREIRA & HOFF, 1986). Em estudo de clone não virulento da cepa CL (clone CL-14), ATAYDE et al. (2004) verificaram que o clone CL-14 (de baixa virulência), difere da cepa CL (com elevada capacidade de penetrar ns células e se multiplicar) devido à significativa redução da expressão da glicoproteína de superfície gp82.

O tropismo de clones do *T. cruzi* foi estudado por MACEDO & PENA (1998) e por ANDRADE L. et al. (1999), que têm mostrado, por meio de técnicas moleculares, que um clone apresenta um tropismo preferencial para um determinado órgão ou tecido o que, segundo estes autores representaria um "modelo clonal histotrópico". No estudo de necrópsias de pacientes cronicamente infectados com o *T. cruzi*, VAGO et al. (1996 a,b, 2000) demonstraram a possibilidade de identificar as assinaturas do DNA do *T. cruzi* de clones

geneticamente diferentes no coração e trato digestivo, o que poderia explicar as diferentes manifestações clínico-patológicas da doença de Chagas. Porém, os autores não puderam descartar, nestes casos, que os pacientes tenham sido infectados com cepas diferentes na área endêmica de origem.

Os estudos dos clones da cepa 21SF, protótipo do biodema Tipo II (CAMPOS & ANDRADE, 1996), bem como dos clones isolados previamente da Cepa Colombiana (CAMANDAROBÁ et al., 2001) mostraram, entretanto a capacidade de um mesmo clone parasitar diferentes órgãos e tecidos, não tendo sido observado o tropismo restrito de um clone para um mesmo tecido.

1.2.10 Caracterização clonal de cepas do *Trypanosoma cruzi*

1.2.10. 1 Evolução clonal do *T. cruzi*

De acordo com TIBAYRENC & AYALA (1987) há três hipóteses sobre a origem e evolução clonal do *T. cruzi*: 1) divergência ancestral e independente para vários clones; 2) divergência ancestral de três espécies biológicas com alguma heterogeneidade entre os clones de cada espécie; 3) a origem dos clones é recente, derivada da reprodução sexual.

Dentre as hipóteses, a primeira é a mais aceita considerando que a evolução clonal do *T. cruzi* foi ancestral e que numerosos clones associaram-se ao longo do tempo. Isto foi confirmado, mais tarde, pelo estudo das isoenzimas, que demonstrou que os clones apresentam heterozigotos fixos, há ausências de combinações diplóides corroborada pelo equilíbrio de Hardy-Weinberg

(TIBAYRENC & AYALA, 1998). As cepas do *T. cruzi* são constituídas de populações multiclonais, as quais representam populações independentes da cepa original e evoluíram com características próprias, biológicas e filogenéticas.

Os estudos genéticos, baseando-se nos *loci* isoenzimático de cepas do *T. cruzi* e de outras espécies de Protozoa, demonstraram que são constituídas de uma estrutura complexa multiclonal (TIBAYRENC et al., 1986; TIBAYRENC & AYALA, 1987; TIBAYRENC et al., 1990; TIBAYRENC & AYALA, 1991; WALLIKER, 1991; JOHNSON, 1997; MORGAN et al., 1997; MAGESA et al., 2002; TIBAYRENC & AYALA, 2002).

Estes estudos vieram consolidar a relevância da reprodução clonal nos protozoários de importância médica, demonstrando a estabilidade das suas características biológicas, fenotípicas e genéticas devido à ausência de cruzamentos entre os conjugantes. É evidente que não se podem descartar as pressões seletivas do meio ambiente e as mutações que possam vir a ocorrer pressionando os parasitos a se adaptarem a novas situações ambientais.

TIBAYRENC et al. (1986), analisando 15 *loci* gênicos de enzimas de 121 cepas do *T. cruzi* dos Estados Unidos, México e Chile e do sul do Brasil, demonstraram que as cepas são diplóides, com reprodução clonal. Os autores mostraram também que o mesmo genótipo clonal é encontrado em áreas geográficas distantes, em diversos hospedeiros. Nos seus vários *loci* gênicos, apresentam heterozigotos fixos, os quais permanecem constantes de geração em geração com ausência da sexualidade mendeliana e de recombinações genéticas (TIBAYRENC & AYALA, 1987).

Esta clonalidade não é restrita à ordem Trypanosomatida (*Trypanosoma* e *Leishmania*), com exceção dos tripanosomos africanos em que há recombinação genética nas espécies *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma congolense* (TIBAYRENC & AYALA, 1991). Essa clonalidade abrange outros Protozoa pertencentes às ordens Diplomonadida (*Giardia*), Tricomonadida (*Trichomonas*) e do subfilo Sarcodina da ordem Amoebida (*Entamoeba*) (TIBAYRENC et al., 1990).

A estrutura clonal tem sido proposta para o filo Apicomplexa na subclasse Coccidia e subordens Eimeriina (*Toxoplasma gondii* e *Cryptosporidium parvum*) por meio das análises de genes do DNA ribossomal das suas subunidades (SSU) e pelo estudo da RAPD (amplificação randômica do DNA polimórfico) de 18 cepas dos parasitos (MORGAN et al., 1997).

1.2.11 Estrutura clonal das cepas do *T. cruzi*

Os clones, ao serem isolados de cepas do *T. cruzi*, podem ser semelhantes ou diferentes em relação à cepa parental que lhes deu origem. Estudos biológicos, bioquímicos e moleculares, realizados por diferentes autores, caracterizaram as diferenças entre subpopulações de uma mesma cepa (ENGEL et al., 1982; TANURI et al., 1985; MOREL et al., 1986; GOLDBERG & SILVA PEREIRA, 1983; MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988).

DVORAK (1980), analisando o DNA total de epimastigotas e tripomastigotas de cinco clones (CA-1/72, CA-1/73, Miranda/78, Miranda/80, Sylvio-X 10/5 e CANIII), demonstrou que há diferenças no conteúdo do DNA dos clones Sylvio-X10/5 e CANIII os quais foram marcados por mitramicina. Isto é

indicativo de que os marcadores genéticos de cada população clonal podem diferir entre si.

A constituição antigênica de diferentes cepas e de clones, também pode apresentar diferenças marcantes. BONGERTZ & DVORAK (1983), analisando os antígenos de duas cepas, Tulahúen e Y, e de seis clones WA-250/1, WA-250/2, Esmeraldo/2, CANIII/1 e CAN-III/2, por imunoeletroforese, demonstraram que cada cepa contém antígenos cepa-específicos e cinco dos seis clones contém antígenos clone-específicos.

POSTAN et al. (1983, 1984, 1986) estudando os clones Sylvio-X 10/7 e Sylvio-X10/4 em camundongos isogênicos C3H/He e C3H/HEN, demonstraram diferenças nos índices parasitêmicos e na mortalidade dos animais infectados. Esses mesmos clones e os clones Miranda/78 e Miranda/80, quando inoculados nos ratos da linhagem Lewis, apresentaram diferenças nos índices parasitêmicos e de mortalidade (POSTAN et al., 1987).

MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI (1988) demonstraram que os clones isolados da cepa Y e CL são heterogêneos enquanto que os clones isolados da cepa MR apresentam um comportamento homogêneo.

A diferença de virulência de clones isolados de uma mesma cepa foi registrada para a cepa CL por LIMA et al. (1990, 1995). Demonstraram estes autores que o clone CL-14 isolado da cepa CL, quando inoculado em camundongos BALBC/c não determinou parasitemia e mortalidade e não produziu lesões histopatológicas. Camundongos BALB/c inoculados com o clone CL-14 desenvolveram alta resistência contra a cepa Y, altamente virulenta, traduzida pela sobrevivência dos animais e persistência da parasitemia negativa. Estes

resultados indicaram que o clone CL-14 pode ser utilizado para estudo de imunidade adquirida na infecção pelo *T. cruzi* e em pesquisas vacinais contra o *T. cruzi* (LIMA et al., 1990).

CAMPOS et al. (1996), analisando 5 clones e 14 subclones isolados da cepa 21 SF do Recôncavo Baiano, demonstraram homogeneidade no comportamento biológico entre os clones e subclones e a cepa parental. O estudo bioquímico (isoenzimático) e o perfil genômico, pela análise do esquizodema, confirmaram a similaridade entre a cepa parental, os clones e subclones. Estes achados sugeriram a predominância de um “clone principal” que circula em uma mesma área endêmica (ANDRADE, 1999).

TOLEDO et al. (2002) em 20 cepas, demonstraram que os genótipos clonais 19 vs 20; 32 vs 39, descritos por TIBAYRENC & AYALA (1988); TIBAYRENC et al. (1996), baseando-se na variabilidade isoenzimática, apresentaram poucas diferenças genéticas em relação aos genótipos mais distantes (19 vs 32, 19 vs 39; 20 vs 32; 20 vs 39).

As lesões histopatológicas em camundongos Suiços também diferem na infecção por clones com diferentes genótipos clonais. Os genótipos designados por TIBAYRENC & AYALA (1988) como 19,20 e 39 mostraram diferenças no grau de parasitismo no miocárdio. Todos os clones apresentaram tropismo para músculo esquelético com parasitismo intenso enquanto o baço e o fígado apresentaram parasitismo predominante, pelo genótipo clonal 39. Estes dados indicam diferenças no comportamento biológico de clones com diferentes padrões genéticos (DIEGO et al., 1998).

Considerando todos os aspectos supracitados, a evolução clonal do *T. cruzi*, através do acúmulo de mutações ao acaso, em diferentes linhagens clonais, podem levar a divergências nas características biológicas, incluindo relevantes propriedades médicas como a virulência ou resistência às drogas anti chagásicas (TIBAYRENC et al., 1986), nos aspectos epidemiológicos e na apresentação das formas clínicas da doença de Chagas (LAURENT et al., 1997; REVOLLO et al., 1998; TOLEDO et al., 2002).

Portanto, estes clones naturais são geneticamente diversificados e exibem contínuas distâncias genéticas, com agrupamentos arbitrários definidos como “*major clones*” (clones principais) por TIBAYRENC & BRENIÈRE (1988).

Para os nossos estudos, utilizamos o conceito de “clone principal”, o qual foi empregado para identificar clones isolados das cepas protótipo dos diferentes biodemas que apresentaram uma homogeneidade clonal quando analisadas do ponto de vista biológico, fenotípico e genotípico.

1.2.12 Diversidade genética do *T. cruzi*

1.2.12.1 Zimodemas

Os zimodemas são padrões isoenzimáticos que, em conjunto, caracterizam o fenótipo das cepas, pela análise genética da mobilidade eletroforética de enzimas multilocus em gel de amido.

Os trabalhos pioneiros de caracterização dos zimodemas foram realizados por MILES et al (1980, 1985, 1986 a, b) e BARRETT et al. (1980) os quais

determinaram diferentes padrões de isoenzimas das cepas de várias regiões do Brasil e do continente americano. A caracterização isoenzimática foi também realizada por ROMANHA et al. (1979) e ROMANHA (1982), determinando os padrões eletroforéticos de seis loci isoenzimáticos para as enzimas G6PD, ASAT, PGM, ALAT e GPI. ROMANHA et al. (1979), estudaram sete cepas do *T. cruzi* de variadas origens, identificando quatro padrões distintos (I, II, III, IV), aos quais designou posteriormente (ROMANHA, 1982) como zimodemas ZA, ZB, ZC e ZD, tendo procurado estabelecer correlações entre os mesmos e os descritos por MILES et al (1980).

A variabilidade isoenzimática de 524 cepas, procedentes dos Estados Unidos da América até o sul do continente americano, foi determinada por TIBAYRENC & AYALA (1988). Foi possível demonstrar que todas as cepas analisadas, além de apresentarem uma alta variabilidade genética, estrutura diplóide e multiclonalidade, foram agrupadas em diferentes genótipos, sendo os mais representativos, no continente americano, os genótipos 19, 20, 32 e 39.

As análises isoenzimáticas de cepas do *T. cruzi* procedentes da Colômbia indicaram a ausência do equilíbrio de Hardy-Weinberg e a existência de desequilíbrio de ligação (RUIZ-GARCIA et al., 2001) confirmando a sua multiclonalidade. O estudo de autocorrelação espacial com as cepas procedentes deste país não permitiu o agrupamento das cepas originárias de Ricaurte, Durania, Tibú e Sabalalarga, evidenciando que não há a presença de um mesmo genótipos nas diferentes áreas geográficas da Colômbia. Mudanças no nível das enzimas de cepas originárias deste país já haviam sido detectadas por Rodrigues et al. (1998) analisando os *loci* enzimáticos da cepa BM Lopes e a presença de

polimorfismo em oito enzimas, sugerindo heterogeneidade para as cepas da Colômbia, não ocorrendo segregação e recombinação gênica (MÁRQUEZ et al., 1998).

Embora ocorram diferenças genéticas entre as cepas da Colômbia, os índices das distâncias genéticas que as separam das cepas brasileiras são de 0,25 a 0,46, com uma identidade de 76% das enzimas de cepas silvestres de ambos os países, classificadas como Zimodema Z1 (BOGLIOLO et al., 1985; EBERT, 1985).

CAMANDARROBA et al, (2001), analisando as enzimas ALAT e ASAT dos clones C1 e C3 isolados da Cepa Colombiana, identificaram três bandas eletroforéticas para ALAT e duas bandas para ASAT, respectivamente, sugerindo uma situação de heterozigose para essas enzimas. A reversibilidade nos padrões de isoenzimas foi observada por ALVES et al. (1993) nos clones e subclones da cepa Y de acordo com os padrões de isoenzimas propostos por ROMANHA (1982) e nos padrões de kDNA por CARNEIRO et al (1990). No entanto, as mudanças não foram observada em clones da cepa Y isolados por micromanipulação tendo sido considerados os resultados discrepantes aos diferentes métodos de isolamento dos clones (plaqueamento e diluição) (BARNABÉ & TIBAYRENC, 2004).

Embora os estudos dos Zimodemas indiquem que o *T. cruzi* seja diplóide, que a sexualidade mendeliana esteja ausente ou muito rara (TIBAYRENC et al., 1986), não se pode descartar alguma recombinação genética nos genes glicolíticos (BOGLIOLO et al., 1996). As variações genotípicas observadas entre as cepas da América Central e América do Sul seriam explicadas por diferenças

na história evolutiva e/ ou mudanças genéticas nas cepas (HIGO et al., 2004); e por clones híbridos do *T. cruzi* com capacidade de fusão de genótipos parentais, perda de alelos, recombinações homólogas e herança uniparental de maxicírculos do kDNA (GAUNT et al., 2003).

Portanto, os estudos genéticos baseando-se nos perfis das isoenzimas têm demonstrado que as cepas do *T. cruzi* são heterogêneas, formam heterozigotos fixos, diplóides, com ausência de sexualidade mendeliana e grande variabilidade intraespecífica (MILES & CIBULSKS, 1986b; TIBAYRENC et al., 1986; HIGO et al., 1997, 199; ÁVILA et al., 1990; TIBAYRENC & AYALA, 1991; BRENIERE et al., 2003).

1.2.12. 2 Genoma do *T. cruzi*

O genoma dos tripanosomas é composto de DNA nuclear e kDNA (DNA mitocondrial). A organização do genoma nuclear difere dos eucariotos mais evoluídos; o envelope nuclear persiste durante a divisão celular, os fusos mitóticos encontram-se dentro membrana nuclear e os cromossomos não são visualizados (HECKER et al., 1995).

Todavia, cariótipos têm sido mapeados através da PFGE (eletroforese em campo pulsado) permitindo separar os cromossomos intactos, revelando polimorfismo genético com variações entre diferentes cepas e clones. Por essa técnica tem se estimado 20 a 35 bandas cromossomais divididas em três classes para o *Trypanosoma brucei* (MELVILLE, 1997; GULL, 2001).

As cepas e clones do *T. cruzi* apresentam aproximadamente 20 bandas dos cromossomos os quais foram identificadas no clone CL Brener (CANO et al., 1985) nos clones CAI/72 e Sylvio X/10/7 (HENRIKSSON et al., 1996; ZINGALES et al., 1997). HENRIKSSON et al. (2002) analisando 26 isolados e clones do *T. cruzi* e hibridizados com sete marcadores diferentes verificaram polimorfismo no tamanho dos cromossomos. Este número de cromossomos tem sido estimado considerando a possibilidade da fusão de bandas e aneuploidias como foi verificado por ZINGALES et al. (1997).

1.2.12. 3 Esquizodemas

Os trabalhos pioneiros de caracterização genética molecular, de clones do *T. cruzi*, isolados da cepa CL foram desenvolvidos por MOREL et al. (1980), obtendo-se fragmentos de DNA, gerados pelas enzimas de restrição *Hinf I*, *Eco RI* do DNA do cinetoplasto, designados como esquizodemas. Estes padrões eletroforéticos conhecidos como "fingerprinting" (impressão do DNA), permitem identificar cepas e clones do *T. cruzi* e de outros tripanosomatídeos em grupos, isto é, populações que têm a seqüência similar de kDNA. (MOREL e SIMPSON, 1980; GONÇALVES e MOREL, 1984; GONÇALVES et al., 1990, 1991). Os clones isolados da cepa CL designados de clone 10, 14, 18 e 20 exibiram idênticos esquizodemas, enquanto que clones 11, 12 e 16 apresentaram diferentes padrões de restrição (MOREL et al., 1980).

O DNA do cinetoplasto ou mitocondrial do *T. cruzi* corresponde a 20-25% do DNA da célula. Esta organizado em duas classes de moléculas: os minicírculos

formam uma rede concatenada de tamanho pequeno (0,45 μm) correspondendo a 10 a 20% do total do DNA da célula (LEON et al., 1980); e os maxicírculos que é o genoma mitocondrial propriamente dito.

Os minicírculos estão presentes em número de $5-20 \times 10^3$ minicírculos de 1,42 Kb. Cada minicírculo é organizado em quatro regiões conservadas e pequenas repetições de 120 pares de bases (Pb) situado no intervalo de 90° e quatro regiões variáveis não repetidas (STURM et al., 1989). Os iniciadores (*primers*) P35 e P36 anelam na região conservada do minicírculo amplificando aproximadamente 330 pares de bases correspondentes à região variável (ÁVILA et al., 1990). Cada minicírculo linearizado, apresenta uma região espécie-específica, intercalada pela região variável e região conservada (ROGERS; WIRTH, 1987). ÁVILA & SIMPSON (1996) identificaram nas regiões variáveis do minicírculo do kDNA de duas cepas do *T. cruzi* Sylvio X10/CL1 e CANIII/CL1 um gene que codifica RNA guia (gRNA). As moléculas de gRNA provê a informação genética para o RNA *editing* dos transcritos mitocondriais (SHLOMAI (2004). Em tripanosomas, o RNA *editing* envolve a adição e deleção de uridina para produzir estrutura de leitura aberta traduzíveis (KENDREW, 1994). Os estudos de ZAVALA-CASTRO et al. (2000) têm demonstrado proteínas ligadas ao kDNA sugerindo uma possível função na organização do DNA mitocondrial.

Os maxicírculos são moléculas de tamanho grande (6 a 11 μm), produzindo pequeno número de cópias de 10-50 cópias de 36 Kb com peso molecular linearizado de 26×10^6 (LEON et al., 1980). Correspondem ao DNA mitocondrial responsável pelos genes mitocondriais, codificam a síntese de RNA ribossomal e

as subunidades de algumas proteínas mitocondriais envolvidas no transporte de elétrons e na síntese de ATP (LEON et al., 1980; MARR & DOCAMPO, 1986; SHLOMAI, 2004).

A análise por RFLP (polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição) foi a primeira técnica desenvolvida para avaliação dos fragmentos dos minicírculos do kDNA do *T. cruzi*, amplificados pela PCR. Permite analisar a variabilidade genética na seqüência nucleotídica da região correspondente a 330 pares de bases do minicírculo revelando diferenças entre as cepas e clones e os clones do *T. cruzi* entre si (STURM et al., 1989).

Os estudos de MOREL et al. (1980) mostraram que os fragmentos de restrição do DNA do cinetoplasto, das cepas polares Y e CL gerados pela enzima de restrição *Eco* RI, *Hinf* I apresentam padrões de bandas diferentes (MOREL et al., 1980; MOREL & SIMPSON, 1980). O estudo de isolados do *T. cruzi* de diferentes origens (MOREL et al., 1980), demonstraram populações heterogêneas isoladas de pacientes chagásicos, representando misturas de cepas. A possibilidade de seleção de subpopulações foi também observada por MOREL et al. (1986) em camundongos inoculados com diferentes cepas, tendo revelado diferentes perfis eletroforéticos, dos parasitos colhidos após diferentes passagens. Outras cepas representam populações homogêneas, mostrando clones com perfis idênticos, mesmo após diferentes esquemas de passagem. Entretanto, não foi possível estabelecer padrões de cepas pela caracterização dos esquizodemas (MOMEN, 1999).

ÁVILA et al., (1990), estudando os fragmentos de kDNA gerados por enzimas de restrição *Eco* RI, *Rsa* I, *Taq* I e *Hinf* I de 56 cepas de diferentes áreas

geográficas da América do Sul e Central, classificaram estas cepas em diferentes grupos, de acordo com o seu perfil esquizodêmico.

VENEGAS et al. (1997), analisando os fragmentos de DNA gerados pelas enzimas de restrição *Msp* I e *Eco* RI, de cepas procedentes do Chile e isoladas de triatomíneos, classificaram as mesmas em quatro grupos (I, II, III, IV), incluindo no grupo I as cepas do zimodema Z1. Na região Andina, GONZALEZ et al. (1995) identificaram dois grupos (A e B) de esquizodemos por meio das enzimas *Eco* RI e *Msp* I.

MACEDO et al. (1992) observaram diferenças entre a cepa Y e o clone YP13 nos fragmentos gerados pelas enzimas de restrição, porém nenhuma diferença foi verificada entre a cepa CL e o clone CL-14 isolado dessa mesma cepa.

Foi demonstrado, por meio da RFLP, que os clones e subclones da cepa 21SF isolados na área endêmica de São Felipe (Recôncavo Bahiano) apresentam uma homologia clonal (CAMPOS et al., 1996). Sugere-se, com esses resultados, que há a predominância de um clone principal responsável pelas características biológicas, isoenzimáticas e moleculares das cepas isoladas desta área.

Em estudos de caracterização molecular de 14 cepas de Minas Gerais verificou que as cepas originais (Ig 523-Cam, Ig 192-1, B84) apresentaram um perfil de kDNA diferente após a manutenção no camundongo demonstrando a heterogeneidade do genoma mitocondrial não sendo possível estabelecer uma relação entre esquizodemas e isoenzimas (DEVERA, 2002).

1.2.13 Outras técnicas moleculares para o estudo do *T. cruzi*

Numerosas técnicas moleculares têm sido aplicadas no estudo do DNA total, kDNA e nuclear do *T. cruzi*, como a tipagem por microssatélites, tipagem pelo gene de mini-exon, LSSP-PCR, SSP-PCR, RAPD, RFLP-ITS rDNA :

O DNA satélite localiza-se no cromossomo, constituindo aproximadamente 9% do DNA nuclear e organizado em repetições em série ou consecutivas (repetições em *tandem*). É um importante marcador genético para distinguir as espécies do gênero *Trypanosoma* e caracterizar cepas e clones do *T. cruzi* (OLIVEIRA et al., 1999; BASTRENTA et al., 1999). Os fragmentos de DNA satélite obtidos por intermédio da RFLP, gerados pelas enzimas de restrição *Eco* RI, *Hae* III e *Hinf* I e hibridizados com as sondas TCZ1 e TCZ2 de 24 cepas e clones da América do Sul, confirmaram a existência de duas linhagens do *T. cruzi* (linhagens 1 e 2) (BASTRENTA et al., 1999).

Os microssatélites são uma classe de DNA repetitivo com um a seis pares de bases presente no genoma dos eucariotos, também conhecido como seqüência simples repetitiva, são seqüências genômicas que consistem de mono, di, tri e tetranucleotídeos. Contém combinações de dímeros de nucleotídeos (CA)_n, (GT)_n. A técnica foi designada de SSR-PCR com resultados excelentes sob condições de baixa estringência usando o iniciador (CA)₈ RY, isto é, oito repetições citosina (C), Adenina (A) e purina-pirimidina (OLIVEIRA et al., 1997).

Os iniciadores de seqüência simples repetida (CA)_nRY amplificam regiões inter-microssatélites permitindo detectar as bandas hipervariáveis do DNA nuclear de diferentes cepas do *T. cruzi* por meio da técnica SSR-PCR (MACEDO & PENA

1998). A determinação de oito microsátélites polimórficos, citosina e adenina, do DNA nuclear, de 54 cepas e clones isolados de uma ampla variedade de vetores e mamíferos, confirmaram a diploidia e a multiclonalidade do *T. cruzi*.

A presença do *T. cruzi* pode ser detectada diretamente nos tecidos e órgãos do animal experimental e paciente na fase crônica da doença de Chagas, através da LSSP-PCR, utilizando um iniciador único de baixa estringência (OLIVEIRA et al., 1997). A caracterização da assinatura do DNA de diferentes cepas e clones do *T. cruzi* pode ser determinada nos diferentes tecidos e identificada às vezes, por um tropismo preferencial para determinados setores do organismo (VAGO et al., 1996b, 2000), tendo sido proposto por MACEDO & PENA (1988) o "Modelo Histotrópico Clonal".

A RAPD é uma técnica mais sensível do que a do DNA *fingerprinting*, no entanto não é capaz de fornecer a mesma resolução nos perfis de bandas eletroforéticas quando comparada com essa última. A RAPD tem sido correlacionada com os zimodemas e com os estudos do gene do mini-exon e do RNA ribossomal (MACEDO & PENA, 1998).

DEVERA (2002) através da RAPD verificou que das 14 cepas originais de Minas Gerais, duas delas demonstraram heterogeneidade e polimorfismo após a manutenção no camundongo (cepas Be-25 e Ig 192-1) e duas, após manutenção no meio LIT (P23-1 e BE-25).

Rodrigues et al. (2002) investigaram as distâncias genéticas de seis cepas da Colômbia utilizando as técnicas da RAPD e RFLP e dos 13 loci enzimáticos, obtiveram os seguintes resultados: 0,61 a 0,99 (RAPD); 0 a 0,81 (RFLP); 0.10 a 0.55 (isoenzimas). Estes resultados indicam um elevado grau de variabilidade

genética, nas cepas colombianas. É possível que esta variabilidade genética entre as seis cepas possa estar relacionada a diferentes formas clínicas da doença de CHAGAS na Colômbia (RODRIGUES et al., 2002).

O gene do mini-exon está presente no genoma nuclear dos Kinetoplastida em aproximadamente 200 cópias arranjadas em seqüências repetitivas Tipo *tandem*, constituído por três regiões distintas: exon, intron e região intergênica. O exon é uma seqüência de 39 nucleotídeos altamente conservada dentro da ordem e é adicionada pós-transcrição a todos os RNAs mensageiros nucleares. O intron é moderadamente conservado dentro do gênero ou sub-gênero e a região intergênica é muito divergente entre as espécies (DEVERA, 2002).

Os estudos moleculares têm demonstrado que as cepas são polimórficas, porém as análises dos genes do mini-exon e do RNA ribossomal mostraram que as mesmas podem ser incluídas em duas linhagens do *T. cruzi* (FERNANDES et al., 1998; 1999 a, b; NUNES et al, 1997; ZINGALES et al., 1999) e em seis unidades típicas distintas (DTU's) (BRISSE et al., 2000 a, b).

RFLP-ITS-rDNA é uma técnica de tipagem da região intergênica dos genes ribossômicos. O rDNA é encontrado como seqüências repetitivas codificando para uma subunidade maior e outra menor separada por espaçadores não transcritos (NTS-non-transcribed spacer) e por regiões não codificadoras, chamadas de espaçadores internos transcritos (*ITS-internal transcribed spacers*) se caracterizando por serem pequenas seqüências de grande variabilidade, flanqueados por segmentos altamente conservados (DEVERA, 2002).

1.2.14 Suscetibilidade de cepas e clones do *T. cruzi* aos quimioterápicos

1.2.14.1 Aspectos gerais

Desde a década de 70, as duas principais drogas em uso clínico no tratamento da doença de Chagas são o nifurtimox (nitrofurânico) e o benzonidazol (nitroimidazólico). Existe uma variação nos índices de cura, quando se consideram casos de indivíduos humanos de diferentes áreas geográficas, ou a infecção experimental com diferentes cepas.

O nifurtimox (3-metil-4-(5') nitrofurfurilideno-amino tetrahidro 4H-1,4-tiazine 1,1 dióxido, envolve a produção de nitroânion por nitroredutases. Esta reação na presença do oxigênio produz radicais livres como peróxidos de hidrogênio e ânion superperóxidos que destroem o *T. cruzi*. Este parasito é parcialmente deficiente em mecanismos de desintoxicação de radicais livres como as catalases e glutaciona peroxidase. Os hidroperóxidos, ao reagirem com o glutaciona reduzido, formam o glutaciona oxidado e produtos reduzidos de hidroperóxidos: superóxido dismutase, que catalisa o ânion superóxido para formar H_2O_2 e O_2 está presente no *T. cruzi*. (MARR & DOCAMPO, 1986; COURA & CASTRO; 2002)).

A redução metabólica do grupo nitro tem um papel central na toxicidade do nifurtimox. A primeira reação se dá por meio da redução do grupo nitro formando o radical ânion nitro ($R-NO_2^-$). A toxicidade desse radical pode ser por intermédio da reação entre os próprios radicais entre si ou produzindo derivados nitrosos. A segunda possibilidade de reação seria a ligação covalente dos radicais livres com as macromoléculas em condições aeróbicas causando a quebra do DNA, inibindo

a síntese de proteínas e ácidos nucléicos, alterações estruturais e inibição do crescimento. A terceira reação de oxidação do radical nitroânion, na presença de O_2 , resulta na regeneração do grupo nitro, na produção do ânion peróxido, radicais hidroxilas, peróxido de hidrogênio, superperóxido dismutase (MARR & DOCAMPO, 1986). O estresse oxidativo sobre o *T. cruzi*, portanto, se dá pela produção de radicais livres, peroxidação de tecidos, depleção de moléculas anti - radicais livres (MARR & DOCAMPO, 1986).

Embora existam similaridades no modo de ação dos nitrofurânicos e nitroimidazólicos, o nifurtimox e o benzonidazol diferem nos seus mecanismos de toxicidade.

O benzonidazol (N-benzil-2-nitroimidazol-1-acetamida) inibe o processo respiratório causando no parasito picnose nuclear, fragmentação e lise. A destruição do parasito ocorre através da redução do grupo nitro que se liga às macromoléculas: (proteínas, lipídeos, RNA, DNA), inibindo o seu crescimento, diminuindo a sua síntese e aumentando a sua degradação. Por outro lado, não há formação de H_2O_2 e O_2 na incubação do benzonidazol com NADP(P)H e frações subcelulares do parasito, nas mesmas condições experimentais para o nifurtimox. Os danos oxidativos sobre o *T. cruzi* não são a principal ação do Benzonidazol, no entanto a produção de radicais livres somente ocorre em concentrações muito elevadas do quimioterápico atuando sobre o parasito (MARR & DOCAMPO, 1986).

O mecanismo de ação foi estudado por POLAK & RICHLER (1978), por intermédio da marcação das bases nitrogenadas por hidrogênio e carbono radioativos, demonstrando que o benzonidazol inibe a síntese de proteínas e do

RNA e em menor intensidade no DNA. Diaz de Toranzo et al. (1988) observaram que em epimastigotas da cepa Tulahúen do *T. cruzi* ocorre uma biotransformação na presença do benzonidazol em metabólitos altamente reativos, formando ligações covalentes no nDNA, kDNA, proteínas e lipídeos. O benzonidazol também inibe a síntese de DNA, quebrando a fita de DNA do cinetoplasto e nuclear formando ligações covalentes com kDNA diminuindo a síntese de macromoléculas e causando a morte do parasito. (GOIJMAN & STOPPANI, 1985). A quebra nas fitas de DNA nuclear e do cinetoplasto pela droga é reversível após a incubação em meio de cultura na ausência da droga (GOIJMAN et al., 1985).

Assim, a toxicidade do benzonidazol se dá pela redução do grupo nitro, através de nitroredutases dependentes de O_2 , com produção de radical nitro ânion que cataliza a transferência de dois elétrons na reação. O ciclo do redox é a via predominante da produção do radical nitro ânion e representa a reação de desintoxicação decorrente do benzonidazol. As ligações covalentes entre o grupo nitro e as macromoléculas aumentam a sua degradação inibindo a síntese de proteínas, RNA e DNA.

Embora os tripanosomatídeos sejam parcialmente deficientes em enzimas antioxidantes e, portanto, vulneráveis ao estresse oxidativo, Müller et al. (2003) demonstraram que o sistema redox tiol tem papel importante no sucesso e sobrevivência dos protozoários parasitas. O sistema tripanotiona é baseado nos conjugados bis-glutationil espermidina, tripanotiona e tripanotiona redutase associados as flavoenzimas, semelhantes ao glutatona/glutationa redutase (GR) os quais protegem os parasitos do oxigênio reativo (ROS) tendo sido considerada

a sua biossíntese como um alvo para drogas anti-*T. cruzi* (COWMAN; CRABB, 2003).

1.2.14.2 Resposta aos quimioterápicos de diferentes cepas e clones do *T. cruzi*

As cepas do *T. cruzi* respondem de modo diferente à ação dos quimioterápicos. ANDRADE et al. (1975); ANDRADE & FIGUEIRA (1977) investigando a suscetibilidade de diferentes cepas ao quimioterápico nifurtimox (Bay, 2502), demonstraram diferenças na resposta de cepas de diferentes biotopos e a alta resistência das cepas do Tipo III. Estudos de BRENER et al., (1976) e de FILARDI & BRENER (1982) confirmaram diferentes graus de susceptibilidade de cepas do *T. cruzi* ao tratamento quimioterápico. O estudo comparativo da resposta de diferentes cepas classificadas nos biotopos Tipo I, II, III (ANDRADE et al., 1985) consolidou os estudos anteriores, demonstrando alta susceptibilidade para as cepas do Tipo I, média susceptibilidade para as cepas do Tipo II e alta resistência para as cepas do Tipo III.

O tratamento quimioterápico continua ainda sendo um desafio em áreas geográficas onde predominam as cepas altamente resistentes aos quimioterápicos de uso clínico, como as cepas do biotopo Tipo III, zimodema Z1.

Veloso et al. (2001), analisando o resultado da quimioterapia de isolados da cepa Colombiana obtidos de cães infectados, também obtiveram 0% de cura, ao contrário dos isolados obtidos da cepa Berenice que apresentaram diferentes graus de susceptibilidade ao benzonidazol.

Segundo MURTA et al. (1998), a cepa Colombiana do *T. cruzi* apresenta um padrão monomórfico para os marcadores moleculares TcPGP (P-glicoproteína), HGPRT (Hipoxantina-guanina fosforibosiltransferase, rDNA (codificador do RNA ribossomal) e mini-exon (MEX).

Foi demonstrado que o efeito do tratamento combinado (Benzonidazol+IL-12) nos camundongos infectados com a cepa Colombiana aumenta, *in vivo*, o efeito anti-*T. cruzi* (MICHAILOWSKY, 1998). Estudos posteriores de FERRAZ et al. (2005a) confirmaram que atividade terapêutica do Posoconazol e Benzonidazol é reduzida (com índice de cura de 38 e 35%) em camundongos deficientes de IL-12 e infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Os autores verificaram que o Benzonidazol foi mais eficiente no tratamento de camundongos deficientes em LT CD8⁺ apresentando 67% de cura em comparação com os controles normais tratados (86% de cura) (FERRAZ et al., 2005b).

A investigação sobre a suscetibilidade à quimioterapia com o benzonidazol foi feita em cinco clones isolados da cepa 21SF (biótipo Tipo II, *T. cruzi* II) (CAMPOS et al., 2004). Esta cepa foi previamente classificada como de média suscetibilidade (ANDRADE et al., 1985). Os índices de cura variaram de 30% a 100% para os cinco clones sendo de 25% para a cepa parental. Os resultados sugerem que a variabilidade de resposta ao tratamento das populações clonais das cepas do biótipo Tipo II (*T. cruzi* II) é responsável pela grande variação na resposta à quimioterapia com benzonidazol e nifurtimox e pelo insucesso da quimioterapia em uma percentagem de pacientes nas áreas endêmicas, mesmo quando infectados com cepas do *T. cruzi* foram consideradas como de média a alta suscetibilidade. Os resultados obtidos indicam a importância da investigação

da resposta ao tratamento de populações clonais das cepas dos demais biodemas. No presente trabalho, o problema implícito na resistência de cepas do Biodema Tipo III (*T. cruzi I*), as quais se encontram amplamente disseminadas nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, além de outros países da América do Sul e Central (MILES & CIBULSKIS, 1986 a,b; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), será investigado nos clones obtidos da cepa Colombiana, protótipo do biodema Tipo III.

1.2.14.3 Testes de cura: parasitológico, sorológico e molecular

A quimioterapia experimental utilizando o camundongo como modelo, tem sido utilizada por inúmeros pesquisadores, no sentido de avaliar a eficácia de drogas já existentes ou novos compostos, sendo importante à utilização de boas normas técnicas para a obtenção de resultados consistentes e válidos.

A avaliação da resposta aos quimioterápicos, depende do estabelecimento de rigorosos critérios de cura. As técnicas utilizadas no presente estudo têm sido validadas em numerosos trabalhos do grupo (ANDRADE et al., 1985; ANDRADE et al., 1987; ANDRADE et al., 1992; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

Desta experiência ficou a certeza de que múltiplos testes individuais devem ser realizados, no sentido de detectar o parasito (testes parasitológicos), e de avaliar a resposta sorológica específica. Estes testes são feitos em conjunto, permitindo maior chance de detectar o parasito remanescente, mesmo que a parasitemia seja subpatente. Recentemente a técnica da PCR com o objetivo de detectar fragmentos do DNA do cinetoplasto tem sido também testada. Em estudo prévio, foi avaliada a sensibilidade desta técnica em alíquotas conhecidas de

parasitos, colocadas em pequeno volume de sangue, comparável ao obtido de cada camundongo submetido aos testes (CAMPOS et al. 2002). O teste parasitológico direto mais utilizado no modelo murino é o exame do sangue periférico com ou sem o uso de ciclofosfamida em dose elevada (250 mg/kg/peso), para reativar a parasitemia. Como métodos indiretos são usada a hemocultura, o xenodiagnóstico e a subinoculação. Como teste sorológico tem sido usada a imunofluorescência indireta. A PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) foi também utilizada. No animal experimental são empregados os vários testes, analisando os resultados de modo combinado, levando-se em consideração a sensibilidade dos testes que é muito variável.

A parasitemia direta consiste na pesquisa dos parasitos em 5 μ L de sangue a fresco com um anticoagulante. Outro método parasitológico é o de Strout o qual consiste na concentração dos parasitos no sangue coletado por punção venosa após centrifugação realizando-se a pesquisa dos parasitos no sedimento.

Os testes parasitológicos indiretos (hemocultura, xenodiagnóstico e subinoculação) são realizados após tratamento de longa duração sendo realizados isoladamente ou de forma combinada, cujos resultados são mais precisos e seguros.

Freqüentemente tem-se utilizado a prática da hemocultura semeando sangue dos animais tratados e com parasitemia negativa ou subpatente, em meio de cultura Warren, avaliando-se o resultado pelo exame microscópico das culturas.

O xenodiagnóstico utiliza ninfas de hemípteros (triatomíneos reduvídeos) as quais realizam o repasto sangüíneo no camundongo testado. O conteúdo intestinal dos triatomíneos é analisado entre 30 e 60 dias para a pesquisa dos parasitos.

Os métodos imunológicos se baseiam na detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* e são realizados por diferentes sistemas para visualização das reações. No modelo murino experimental tem sido verificado que a imunofluorescência indireta (IFI) desenvolvida para teste sorológico em humanos (CAMARGO, 1966), apresenta excelentes resultados. É uma técnica na qual os anticorpos presentes no soro, quando colocados sobre uma lâmina contendo antígeno de *T. cruzi*, são revelados por meio de imunoglobulina anti-IgG produzida em coelho, conjugada com o isotiocianato de fluoresceína (FITC).

A amplificação dos fragmentos de DNA do núcleo e do cinetoplasto pela reação em cadeia da polimerase (PCR) tem sido usada como importante ferramenta no diagnóstico da doença de Chagas. Contudo, o número de parasitos circulantes é crucial para a positividade da PCR diminuindo a sua sensibilidade em amostras com escasso número de parasitos ou em amostras de pacientes submetidos ao tratamento quimioterápico (JUNQUEIRA et al., 1996; BRITTO et al., 2001; SOLARI et al., 2001). Esta diminuição na sensibilidade da PCR foi também verificada por Vargas et al. (1996) em amostras de sangue de ratos infectados com a cepa Tulahuén em diluições decrescentes dos parasitos/mL (1×10^6 a 1×10^{-2}) observando-se uma notória diminuição dos fragmentos de 330 pares de bases nas maiores diluições.

A baixa sensibilidade na PCR foi observada por Araújo et al. (2002) quando realizou apenas uma reação da PCR em amostras de sangue de cães infectados

com a cepa Berenice *T. cruzi* (5-12 anos) após a infecção. Estes achados sugerem que a PCR não pode ser usada isoladamente como teste de cura, havendo a necessidade da realização da PCR em amostras sangue em série, com testes repetidos.

A aplicação do teste da PCR no presente trabalho poderá contribuir para uma melhor avaliação deste método como teste de cura em camundongo submetido à quimioterapia e compará-lo com a eficácia dos demais testes parasitológicos.

1.2.15 Hipóteses de investigação

Considerando os diversos elementos apresentados na presente introdução foram desenvolvidos nesta tese diferentes linhas de investigação que se constituíram em hipótese de trabalho a seguir: 1) A hipótese de que as cepas que apresentam caracteres estáveis após longo período de manutenção em laboratório apresentem uma composição clonal homogênea ou um alto índice de similaridade clonal; 2) A hipótese de que esta “homogeneidade” represente a predominância de um “clone principal”; 3) A hipótese de que existe uma correlação entre o comportamento biológico de uma cepa e seu padrão isoenzimático e genético; 4) A hipótese de que a resposta aos quimioterápicos está correlacionado ao padrão genético da cepa; 5) A hipótese de que uma mesma cepa pode determinar o parasitismo de diferentes células e tecidos, embora com graus variáveis; 6) A hipótese de que clones homogêneos de uma mesma cepa podem reproduzir o histotropismo da cepa parental.

2 OBJETIVO GERAL

Fazer a caracterização molecular de clones da cepa Colombiana do *T. cruzi* obtidos no 10^o e 30^o dias da fase aguda da infecção e correlacionar com as propriedades biológicas, com o histotropismo e em especial com a resposta ao Benzonidazol.

2.1 Objetivos específicos

2.1.1 Investigar os caracteres biológicos e moleculares de clones isolados na fase aguda precoce da infecção com a cepa Colombiana (10^o dia) e compará-los com os clones isolados na fase aguda avançada (30^o dia) de infecção.

2.2.2 Investigar o histotropismo clonal da cepa Colombiana, comparando os clones isolados nas duas fases (10^o e 30^o dias) e a cepa parental.

2.2.3 Avaliar a resposta ao benzonidazol de clones isolados em duas fases da infecção pela cepa Colombiana em comparação com a cepa parental.

2.2.4 Determinar os caracteres moleculares dos clones isolados nas duas fases da infecção, através da RFLP da região variável do minicírculo do k-DNA do *T. cruzi* amplificado pela PCR.

3 JUSTIFICATIVAS

As cepas do *T. cruzi* apresentam diferenças de comportamento o que permitiu classificá-las de acordo com caracteres biológicos, bioquímicos e genéticos, dando origem a múltiplas classificações hoje consolidadas em *T. cruzi I* e *T. cruzi II*, embora com algumas exceções, ainda não incluídas.

A fim de melhor compreender as referidas diferenças, torna-se de grande importância o estudo da composição clonal das cepas. Estas têm sido classificadas quanto ao seu comportamento biológico, em biodemas quanto ao seu padrão isoenzimático em zimodemas e quanto ao padrão do kDNA em esquizodemas. Dados da literatura demonstram que existem cepas mantidas por longo tempo em laboratório, por passagens em animais experimentais ou em outros meios, que apresentam uma estabilidade de seus caracteres, enquanto outras apresentam nítidas alterações quando mantidas em laboratório.

É de interesse investigar as características dos clones isolados das cepas protótipo, estáveis, com o objetivo de verificar se os mesmos reproduzem os caracteres da cepa original e apresentam homogeneidade ou se há uma diversidade nas características dos mesmos.

A homogeneidade clonal poderia indicar a presença de um "clone principal", responsável pelo comportamento biológico, e molecular da cepa. Do mesmo modo, a heterogeneidade dos clones poderia explicar a instabilidade de uma cepa e as mudanças de comportamento em laboratório, sendo então uma

demonstração da co-existência de diferentes populações clonais ou mesmo indicação de infecção por diferentes cepas.

As características de uma cepa podem ser melhor avaliadas pelo conhecimento de sua estrutura clonal. É conhecida a diferença de virulência entre clones de uma mesma cepa, podendo-se atribuir à presença de clones mais virulentos, um maior grau de mortalidade dos animais infectados e/ou o aparecimento de casos agudos graves em áreas endêmicas onde, predomina um mesmo tipo de cepa.

No presente estudo a estrutura clonal da cepa Colombiana, incluída no grupo *T. cruzi* I, caracterizada biologicamente no Biodema Tipo III e isoenzimaticamente no Zimodema I, será investigada. A caracterização dos clones, obtidos através do isolamento de uma única forma sangüínea do parasito, por micromanipulação, permitirá o estudo detalhado desta cepa quanto aos seus caracteres genômicos, pela caracterização do kDNA e sua correlação com os caracteres biológicos e bioquímicos.

A cepa Colombiana, do mesmo modo que outras cepas do biodema Tipo III, apresenta aspectos de muito interesse para investigação, sendo um deles a sua extrema resistência aos quimioterápicos em uso clínico (nifurtimox e benzonidazol) (ANDRADE et al., 1975, 1985a). Desde os estudos iniciais feitos sobre a sua resposta aos quimioterápicos, tem sido observada a manutenção desta resistência, o que sugere uma constância deste caráter, ao lado de outras características desta cepa. O isolamento dos clones da cepa Colombiana permitirá investigar a resposta de cada clone aos quimioterápicos e confirmar ou não, a existência na sua estrutura clonal, de populações que respondam ao

quimioterápico, o que é importante para o tratamento. Além disto esta cepa tem alta patogenicidade para o animal experimental na fase aguda da infecção, com extensas lesões necrótico-inflamatórias em músculo esquelético e no miocárdio (FEDERICI et al., 1964 ; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

Na fase crônica a cepa Colombiana determina maior índice de lesões no miocárdio e maior incidência de alterações eletrocardiográficas quando comparada com cepas do biotema Tipo I e do Tipo II (ANDRADE, 1990).

A maior virulência e a predominância de formas delgadas, (como foi comprovado com as cepas protótipo do biotema Tipo I: Y e Peruana), correspondem a uma maior suscetibilidade aos quimioterápicos. Deste modo, é de interesse estudar o comportamento de clones da cepa Colombiana, isolados em duas fases da infecção aguda: no 10º dia (predominância ou presença de formas delgadas) e 30º dia (predominância de formas largas) no sentido de investigar, sua resposta à quimioterapia.

Fazendo-se a clonagem de uma cepa altamente resistente ao Benzonidazol em uma fase precoce da infecção, isto é, no 10º dia, onde há um número elevado de formas delgadas, poderia haver chances, ao acaso de isolar clones susceptíveis ao Benzonidazol. Esta constatação poderia imprimir uma abordagem diferente à quimioterapia da doença de Chagas humana.

MANUSCRITO 1

***Trypanosoma cruzi*: Clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism.**

EDSON CAMANDAROBA, TORRICELI S. THÉ, DANIEL HUBER PESSINA,
SONIA G. ANDRADE.

CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ-FIOCRUZ,
LABORATORY OF EXPERIMENTAL CHAGAS'DISEASE, AUTOIMMUNITY AND CELLULAR
IMMUNOLOGY.

Rua Valdemar Falcão, 121 (Brotas) 40295 – 001, Salvador, Bahia, Brazil.

Running title : *Trypanosoma cruzi* : clonal histotropism

Correspondence: Dr. Sonia G. Andrade (andradesg@cpqgm.fiocruz.br)

Laboratório de Doença de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia
Celular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz.

Address: Rua Waldemar Falcão, 121 (Brotas) 40295-001, Salvador, Bahia, Brazil

***Trypanosoma cruzi*: Clones isolated from the Colombian strain, reproduce the parental strain characteristics, with ubiquitous histotropism.**

EDSON CAMANDAROBA, TORRICELI THÉ, DANIEL HUBER PESSINA, SONIA G. ANDRADE.

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Laboratory of Experimental Chagas'disease, Autoimmunity and Cellular Immunology.

Summary

Clonal histotropism and biological characters of five clones isolated during the early acute phase of the infection of Swiss mice with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi* I), Biodeme Type III, were investigated. Five clones were isolated from mice at the 10th and two at the 30th day of infection with the Colombian strain. Isolation was performed by micromanipulation and injection of one trypomastigote blood form into newborn mice, followed by passages into suckling mice for obtaining the inocula for the experimental groups. Mice infected with parental strain were also studied. All the clones have shown the basic characteristics of Biodeme Type III, with the same patterns of parasitemia, tissue tropism, morphological characters and isoenzymic profiles, such as the parental strain. Histotropism was most intense to myocardium and skeletal muscles, with intense lesions found in the advanced phase (20th to 30th day of infection). Both parental strain and the clones, were seen to parasitize several organs and tissues; amastigote nests were identified in the cytoplasm of macrophages, adipose cells, smooth muscle of intestinal wall and Auerbach's neuronal plexus. The findings of the present study confirm the homology of the clones isolated from the Colombian strain, with predominance of a "major clone" and an ubiquitous tissue distribution of parasites belonging to a same clone.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Clonal histotropism, Colombian strain, Biodeme Type III, Clones of *T. cruzi*.

Correspondence: Dr. Sonia G. Andrade (andradesg@cpqgm.fiocruz.br,) Laboratory of Experimental Chagas'disease, Autoimmunity and Cellular Immunology. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz /Fiocruz. - Rua Valdemar Falcão, 121. CEP 40295001 – Salvador, Bahia -BRAZIL.

Strains of *Trypanosoma cruzi* are multiclonal populations that can be grouped into few discrete types, differing in pathogenicity and virulence, as well as in histotropism and response to chemotherapy. These characteristics are correlated with the grouping of *T. cruzi* strains into the different Biodemes Types I, II and III (Andrade, 1974, Andrade and Magalhães, 1997) and Zymodemes Z1, Z2 and Z3 (Miles et al. 1980), now included as groups: *T. cruzi I* and *T. cruzi II* (Momen, 1999). Tissue tropism is an intrinsic characteristic of strains of *T. cruzi* of the three biodemes and, probably, results from their clonal composition. Several studies on the clonal composition of *T. cruzi*, have been performed, based on biological and isoenzymic characteristics, showing either a clonal homogeneity (Dvorak et al. 1980, Goldberg and Silva Pereira, 1983, Gomes et al. 1991) or heterogeneity (Engel et al. 1982, Marques de Araújo and Chiari, 1988, Lima et al, 1990). In previous investigations (Camandaroba et al. 2001), it has been shown that clones isolated from the Colombian strain at the peak of parasitemia (30th day of infection) disclosed phenotypic homogeneity and high similarity with the parental strain, high resistance to chemotherapy (Camandaroba et al. 2003) as well as the same histotropism (Camandaroba et al. 2001). Also the genetic characterization of the clones, both isolated in the 10th and 30th day of infection by the restriction fragment length polymorphism (RFLP) (Camandaroba et al. submitted to publication), have disclosed genotypical homogeneity of these clones. The parasites originated from the multiplication of one clone in the vertebrate model, can be distributed through several organs and tissues. These observations are not in keeping with the recently proposed theory of a “clonal histotropic model” (Macedo and Pena, 1998), which suggested that each clone of one strain is destined to one specific tissue. These studies were based on the molecular characterization of the clones using the “low stringence single specific primer” (LSSP-PCR) method. The “excluding presence” of one genetic population, either in

the myocardium or in the digestive tract, was described in several studies (Vago et al. 1996 a,b, 2000). In the present investigation, a detailed study on the biological behavior and the histotropism of clones of the Colombian strain, isolated in the 10th day of infection, as well as of two clones isolated in the 30th day, has been performed, by direct search of intracellular amastigotes in several organs and tissues, by histopathological and immuno-histochemical methods. Results have indicated that cloned populations, isolated by micromanipulation (Dvorak, 1985), from one single trypomastigote blood form, showed a disseminated distribution, combined with a preferential tropism for skeletal muscles, reproducing the behavior of the parental strain, in which parasitism of multiple organs has also been described.

These results confirm the hypothesis of predominance of a "principal clone" (Andrade, 1999), in those strains that show a clonal homology at the phenotypic and genetic levels, as previously demonstrated with the clones isolated from the 21SF strain (Campos et al. 1996, 1999).

MATERIAL AND METHODS

Parental strains and Clones of T. cruzi strains

For the present investigation, five clones of the Colombian strain, isolated in the 10th day of infection (Cl-Col-C8, Cl-Col-C10, Cl-Col-C13, Cl-Col-C14, Cl-Col-C15), and two clones previously isolated (Camandaroba 2001) in the 30th day of infection (Cl-Col-C1 and Cl-Col-C5), have been used. The clones were obtained by micromanipulation (Dvorak 1985), by isolating one single parasite, from peripheral blood of mice infected with the Colombian strain of *T. cruzi* (parental strain). Citrated blood, collected from infected mice was centrifuged in a refrigerated centrifuge at 900 g, for separation of erythrocytes and leucocytes; the supernatant was examined in a Neubauer chamber for evaluation of parasites concentration. Dilution was performed with PBS, pH7.2 and drops of 1 μ l were distributed in the wells of titration plaques and examined on an inverted microscope. By micromanipulation a single trypomastigote form was isolated with 1 ml syringe and

inoculated into one 8-day-old mouse. From positive animals, successive passages into suckling mice were performed for each clone. Clones were maintained by cryopreservation into liquid Nitrogen until re-inoculation into groups of suckling mice, for obtaining the inocula for the groups of study. The parental strain was maintained in laboratory, by successive passage into mice and inoculated into the study group.

The clones isolated by the 10th day of infection were submitted to biological characterization through the infection of mice, by the evolution of parasitemia on the 7th to 50th day after infection, by the cumulative mortality and isoenzymic profiles of parasites isolated through haemoculture.

Histotropism - was investigated by examination of several organs and tissues: heart, skeletal muscle, intestinal tract, liver, spleen, spinal cord and sympathetic ganglia.

As control, the parental Colombian strain was studied under the same methods.

Experimental groups: For the parental strain and each clone, one group of 25 Swiss mice weighing 10 to 15g were used, in a total of 8 experimental groups. One control group was inoculated with the parental strain: Col-Parental.

Inoculum- 1×10^5 trypomastigotes blood forms obtained from mice inoculated with each clone or the parental strain were inoculated intraperitoneally into the animals of each experimental group.

Biological parameters: parasitemic profiles, morphology of parasites in peripheral blood, in the early infection, and cumulative mortality were evaluated in the several groups inoculated with the clones isolated at the 10th day of infection. The clones isolated at the 30th day of infection, have been previously characterized under the same parameters (Camandaroba et al. 2001). *Parasitemia* was evaluated in five animals from the 7th to the 50th day of infection and expressed as the means obtained in five mice each day.

Cumulative mortality was evaluated from the 30 to 50th day of infection. *Morphology* – evaluation of the percentage of slender and broad forms of parasites in peripheral blood during the course of infection was performed in blood smears stained with May Grünwald-Giemsa staining method.

Isoenzymic characterization: was performed according to the method previously described (Miles et al, 1980, Andrade et al. 1983); briefly, parasites from culture in Warren medium were washed four times, with centrifugation at 2000g in buffer tris-KRT, pH 7.3, and enzymic extracts were prepared and stored into liquid Nitrogen as "pearls". The following isoenzymes were tested: alanine aminotransferase (ALAT-E.C.2.6.1.2); aspartate aminotransferase (ASAT-E.C.2.6.1.1); glucose-phosphate isomerase (GPI-E.C.5.3.1.9); phospho-glucomutase (PGM-E.C.2.7.5.1). Electrophoresis was performed according to the method of Miles et al (1980).

Statistical analysis- Means of parasitemia were evaluated between the parental strain and clones in the early phase (12th to 14th days), in the intermediary phase (17th to 19th days) and in the late phase of acute infection (25th day) by the comparative non parametric Mann-Witney test, using the Biostat program.

For comparative evaluation of the mortality of infected mice with parental strain and clones, a non-parametric Fisher test was applied, using the program *Epi info 6*.

Evaluation of the survival time was performed by the non-parametric Kaplan-Meier test.

The predominance of the different morphological parasite forms (broad and slender forms) in peripheral blood of mice infected with the parental strain (Colombian strain) and its clones was evaluated in the 14th and 20th days post-infection by the non parametric test (X^2 chi-square test), with the significance level of $p=0,005$.

Histotropism - From each experimental group, 03 mice were sacrificed in the 10th, 14th, 20th, 25th and 30th day post-infection. Complete necropsies were performed and fragments of the myocardium, skeletal muscle, esophagus, intestinal tract, spleen, and liver were formalin fixed, paraffin embedded and sections stained with hematoxylin and eosin. For the identification and study of the sympathetic ganglia and of the spinal cord, section of the vertebral column at the lombar region, was taken. For that, two longitudinal sections were made 0.5 cm away from the vertebral lateral apophyses on each side, and two horizontal cuts as previously described (Souza et al,1996). After fixation in 10% formalin, the tissues

having the vertebra with the spinal cord in its center were cut in two to three blocks, decalcified in 5% EDTA and then divided longitudinally, embedded in paraffin and sections stained with hematoxylin and eosin.

Immunohistochemistry for immunolabeling of T. cruzi forms: paraffin sections were treated with purified, specific anti-*T. cruzi* IgG produced in rabbits in the dilution of 1:300 overnight at 4° C. After three washes with PBS, the tissues were incubated with 1:20 dilution of goat normal serum, followed by incubation with peroxidase-conjugated goat anti-rabbit IgG antibody (DAKO P448) in the dilution of 1:800 during 30 minutes at 37° C. The color was developed with 0.6 mg/μl 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB)+ 0.012% DMSO and 0.001% H₂O₂ at room temperature. Sections were counterstained with 1% methyl-green for 15 minutes, dehydrated and mounted in Canadian balsam.

Results of histopathological and immunohistochemical evaluation of the tissues parasitism were expressed as (+) mild parasitism; (++) moderate parasitism; (+++) intense parasitism.

Results

Parasitemia , cumulative mortality and morphology of parasites - are expressed in the *Figures 1, 2a, 2b* for the parental strain and clones. Parasitemic peaks varied between the 27th to the 37th day for the parental strain and Clones CI-Col-C8, CI-Col-C10, CI-Col-C13 and CI-Col-C15. Earlier peaks occurred with the clones CI-Col-C13 (22th day) and CI-Col-C14 (17th day).

Comparative analysis of the parasitemic levels between the parental strain and its clones, by the Mann-Whitney non parametric test, did not reveal statistically significant differences, with the following exceptions: the clone CI-Col-14 in the early phase of infection and the clone CI-Col-5 in the intermediary and late phases (Table 1).

Morphological aspects – The majority of the clones showed a predominance of broad forms from the 14th day of infection. However, predominance of slender forms in the 14th day of infection (75%) was detected in the parental strain (Col-

Parental) and a significant number of slender forms were also seen at the 14th day for the clone CI-Col-C14 (48%).

Comparative analysis between the percentages of slender or broad forms in the parental strain and its clones in the 14th and 20th days of infection revealed significant differences by the X^2 chi-square non-parametric test.

Cumulative mortality – Varied between the several clones, from 40 to 100%.

Virulence of the several clones and parental strain varied, considering the parameters: cumulative mortality, survival time and levels of parasitemia; Col-Parental (parental strain), clones CI-Col-C13 and CI-Col-C14 showed higher virulence than the clones CI-Col-C8, CI-Col-C10 and CI-Col-C-15.

Clones CI-Col-C-1 and CI-Col-C5, isolated in the 30th day of infection, also differed in virulence, as previously demonstrated (Camandaroba et al. 2001). Clone CI-Col-C1 showed high virulence, determining high mortality rate (100%) of the infected mice, high parasitemia and presence of slender forms in the 14th day of infection.

The statistical analysis of the cumulative mortality, demonstrated significant difference between the Colombian strain and the clones CI-Col-C8, CI-Col-C10, CI-Col-C13 and Col-Col-C14 (Fischer exact Test).

Survival analysis- Survival analysis in mice infected with Colombian strain and clones demonstrated significant differences between Colombian strain and clone CI-Col-C8 as compared with clones CI-Col-C10, CI-Col-13, CI-Col-14, CI-Col-C14, CI-Col-C15 (Klapan-Meyer non parametric Test).

Isoenzymic profiles – The patterns of isoenzymes ALAT, ASAT, PGM and GPI reproduce the same profiles as seen previously for the Colombian strain and the clones isolated in the 30th day, with the profile of Zymodeme 1 (Camandaroba 2001).

Histopathological lesions (Figures 3, 4)

Parental strain and clones – The progressive histopathological study in mice inoculated either with the parental Colombian strain or with the clones isolated from early infection (10th day), showed variable aspects, considering the intensity of the

parasitism and degree of inflammation in the myocardium and skeletal muscle. These lesions were generally mild or absent at the 10th and 14th day of infection, increasing in severity from the 20th to 25th day and becoming very intense in the 30th day post-infection. The evolution of these lesions was similar to that observed in mice infected with the Colombian parental strain. An increasing severity of the lesions in the myocardium and skeletal muscles was observed, with the presence of nests of amastigotes in the myocytes, and inflammatory lesions, corresponding to the rupture of the parasitized cells. An intense diffuse infiltration of the myocardium and skeletal muscle with mononuclear cells, was seen in the advanced phase of infection (20th to 30th day) (*Figure 3*). Para-vertebral sympathetic ganglia and para-sympathetic peri-cardiac ganglia were involved by the inflammatory infiltrate present in the muscles and adipose tissue, but no parasites were found in these structures (*Figure 4 D*).

Histotropism – *Table 2* registers the presence of intracellular amastigotes in several tissues of mice infected either with the parental strain or the clones isolated in the 30th days of infection (*Cl-Col-C1* and *Cl-Col-C5*) or in the 10th day of infection. Parasites were seen in sections stained with hematoxylin and eosin (*Figure 3 and 4*) and in sections submitted to histochemistry for the identification of *T. cruzi* forms (*Figure 5*). Parasites were identified in the skeletal muscle and myocardium (*Figure 3 A-F*); macrophages in the spleen and liver (*Figures 4 E, F*); in adipocytes (*Figure 4 A*); in satellite and neuronal cells of nervous ganglia of the Auerbach plexus (*Figures 4 B, C and 5 A, D, E*); smooth muscle of the intestinal wall (*Figures 5 C, F*); interstitial cells of the intestinal submucosae (*Figure 5 B*). The intensity of the parasitism varied between the several organs, being consistently more intense in the heart and skeletal muscles.

Discussion

Classically, macrophages are the first barrier to *T. cruzi* invasion after infection, either in man or in the experimental animals. Parasites actively phagocytosed can be destroyed or can develop within the phagocyte cytoplasm.

This is followed by dissemination of parasites in the vertebrate organism, and their intracellular multiplication in different tissues. The histotropism is a hallmark of the different strains of *T. cruzi* and this means a predominance of parasite multiplication into one tissue, but not excluding its multiplication in other tissues. Macrophages, skeletal and cardiac muscles, or intestinal smooth muscles, are the preferential sites of parasite multiplication. Strains of *T. cruzi*, which were biologically and biochemically characterized and classified into three biotopes (Andrade & Magalhães, 1997), showed different histotropism during the acute infection in mice.

The predominant tropism of one biotope is preserved, independently of the mouse strain used as observed with the Colombian strain when inoculated into six different inbred mouse strains: DBA/1, C3H, B/10, BALB/c, AKR and A/J, always presenting a defined skeletal muscle tropism (Andrade et al. 1985). Concomitantly, parasites are present in low number, in several other tissues, as the spleen, liver, neuronal ganglia, smooth muscles and adipose tissue. In the present study, the same tropism of the parental strain has been observed with the isolated clones.

The clones isolated in the 10th day of infection varied in virulence, evaluated by the mortality indices, survival time and parasitemic levels. Considering these parameters, the parental strain as well as clones CI-Col-C13 and CI-Col-C14 were the most virulent, with high mortality and high levels of parasitemia. Predominance of slender forms in the early phase (14th days) indicates a rapid multiplication as has been seen with the parental strain and the clone CI-Col-C14. The statistical analysis of the parameters of virulence above, demonstrated what at exacerbation of the virulence of Colombian strain and clones are traduced by high parasitemias on different phases early, intermediate and late, exception on early phase between Colombian strain and clone CI-Col-C5. The virulence are traduced by significance difference ($p=0,005$) on slender and broad forms in different phases of infection (14^o and 20^o days) between Colombian strain and clones through χ^2 Chi-square Test. Significant difference ($p=0,05$) were verificated on mortality cumulative between Colombian strain and clones high virulence. Survival analysis confirm previous results of mortality what clone CI-Col-C8 presented high level

de survival considering Colombian strain and others clones through of the Kaplan-Meier Test non parametric.

This coincided with the presence of macrophagotropism in the spleen and liver. The parameters of infectivity, pathological lesions and histotropism demonstrate the similarity between the clones and respective parental strain. Previous studies from our laboratory have demonstrated the clonal homogeneity of the 21 SF strain, biodeme Type II both at phenotypic characterization (Campos and Andrade, 1996) and schizodeme analysis (Campos et al. 1999). The Colombian strain, biodeme Type III also demonstrated a clonal homology (Camandaroba et al. 2001), confirmed by the genetic characterization (Camandaroba et al. manuscript submitted to publication). These studies indicated that even considering the strains as discrete type unities (DTUs), as defined by Tibayrenc and Ayala (2002), they presented clear tropism for different types of cells.

In the present investigation, we could demonstrate that clones isolated from the Colombian strain, reproduced the pathological involvement of the heart and skeletal muscles as well as the histotropism for the cells of several tissues, as seen with the parental strain, either when isolated from an early phase of infection or at the peak of parasitemia. These data are not in accordance with the theory of the "clonal histotropic model" that has been described by Macedo and Pena (1998), followed by others (Andrade et al. 1999, 2002). In the pioneering studies by Vago et al (1996 a, 2000 b) they suggested that among the multiclonal population infecting an individual, there could be clones with specific tropism to different tissues. In the study of necropsy specimens, from *T. cruzi* chronically infected individuals, Vago et al (1996 a,b, 2000) have shown the possibility to directly identify in the heart and digestive tract tissues, the presence of genetically different parasites by the technique of LSSP-PCR. However, the possibility that these patients had been infected with different strains, has not been discharged by the authors. Franco et al.(2003) by inoculating rats with a mixture of two different *T. cruzi* populations: monoclonal JG strain and the CL-Brener clone have shown, at the end of acute phase, the presence in the heart of only JG strain kDNA, while skeletal muscle and rectum exhibited only CL-Brener kDNA. In the chronic

infection, JG appeared in the heart and other organs previously parasitized by CL-Brener strain. These results, seems to confirm that different strains or clones can present different tropism. However, the presence of the JG monoclonal strain, in several tissues is a demonstration that the same clone can parasitize different types of cells, as shown in the present study.

It is known that reinfection can occur in patients living in endemic areas; experimentally, parasites of double infection, have been re-isolated from mice infected with different strains of *T. cruzi* (Andrade et al. 1968, Deane et al. 1985). In endemic areas, domiciliary invasion by sylvatic triatominae is responsible for the presence of infections with different strains, as it has been shown in patients from Montalvania, MG (Luquetti et al. 1986, Andrade et al. 1992).

In the present study, we have demonstrated, by direct identification of parasites in the tissues, that clones derived from one single trypomastigote, isolated by micromanipulation and inoculated into mice, determine the parasitism of the cells of different organs and tissues, and disclosed the same distribution and histotropism as the parental strains. These findings suggest that the tissue distribution of one clone, similarly to the Colombian parental strain, is ubiquitous and not restrictive.

REFERENCES

- ANDRADE L.O., MACHADO C.R.S., CHIARI E., PENA S.D.J., MACEDO A.M.(1999) Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Bioch Parasitol.* **100**: 163-172.
- ANDRADE L.O., MACHADO C.R.S., CHIARI E., PENA S.D.J., MACEDO A.M. (2002) *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. *Exp Parasitol* **100**:269-275.
- ANDRADE S.G. (1974) Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Bahiano. *Rev Pat Trop* **3**: 65-121.
- ANDRADE S.G. (1999) *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Mem.Inst. Oswaldo Cruz* **94**: 185-187.

- ANDRADE S.G., FIGUEIRA R.M., ANDRADE Z.A. (1968) Influência de infecções repetidas no quadro histopatológico de doença de Chagas experimental. *Gaz Med Bahia* **68**: 115-123.
- ANDRADE S.G., MAGALHÃES J.B. (1997) Biodemes and zymodemes of *T. cruzi* strains: Correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop* **30**: 27-35.
- ANDRADE S.G., RASSI A., MAGALHÃES J.B., FERRIOLLI FILHO F., LUQUETTI A.O. (1992) Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strain. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg* **86**: 624-626.
- ANDRADE V., BARRAL-NETTO M., ANDRADE S.G. (1985) Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Brazilian J Med Biol Res* **18**:499-506.
- ANDRADE V., BRODSKYN C., ANDRADE S.G. (1983) Correlation between isoenzyme patterns and biological behavior of different strain of *Trypanosoma cruzi*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **77**:796-799.
- CAMANDAROBA E.L.P., CAMPOS R.F., MAGALHÃES J.B., ANDRADE S.G. (2001) Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Rev Soc Bras Med Trop* **34**:151-157.
- CAMANDAROBA E.L.P., REIS E.A.G., GONÇALVES M.S., REIS M.G., ANDRADE S.G. (2003) *Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop* **36**: 201-209.
- CAMPOS R.M.F., ANDRADE S.G. (1996) Characterization of subpopulations (Clones and Subclones) of the 21 SF Strain of *Trypanosoma cruzi* after Long Lasting Maintenance in the Laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **91**(6): 795-800.
- CAMPOS R.M.F., GONÇALVES M.S., REIS E.A.G., REIS M.G., ANDRADE S.G. (1999) Comparative Analysis by Polymerase Chain Reaction Amplified Minicircles of Kinetoplast DNA of a Stable Strain of *Trypanosoma cruzi* from

São Felipe, Bahia, its Clones and Subclones: Possibility of predominance of a Principal Clone in this Area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **94**: 23-29.

DEANE M.P., SOUSA M.A., PEREIRA N.M., GONÇALVES A.M., MOMEM H., MOREL C. (1984) *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analysis. *J Protozool* **31**(2): 276-280.

DVORAK J.A. (1985) Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and why? *Rev Soc Med Trop* **18**: 29-38.

DVORAK J.A., HARTMAN D.L., MILES M.A. (1980). *Trypanosoma cruzi*: Correlation of growth kinetics to zymodeme type in clones derived from various sources. *J Protozool* **27**: 472-474.

ENGEL J.C., DVORAK J.A., SEGURA E.L., CRANE M.J., (1982). *Trypanosoma cruzi*: Biological characterization of 19 clones derived from two chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. *J Protozool* **29**: 555-560.

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

GOLDBERG S.S., SILVA P.A.A. (1983). Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. *J Protozool* **69**: 91-96.

GOMES M.L., ROMANHA A.J., GONÇALVES A.M., CHIARI. E. (1991). Stability of isoenzyme and kinetoplast DNA (k-DNA) patterns in sucessively cloned *Trypanosoma cruzi* populations. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **86**: 379-385.

LIMA M.T., JANSEN A.M., RONDINELLI E., GATTASS C.R. (1990) *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. *Parasitol Res* **77**: 77-81.

LUQUETTI A.O., MILES M.A., RASSI A., RESENDE J.M., DE SOUZA A.A., POVOA M.M. & RODRIGUES I. (1986) *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas disease in central Brazil. *Trans Roy Soc Trop Med and Hyg* **80**: 462-470.

MACEDO A.M., PENA S.D.J.(1998) Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today* **14**(3): 119-124.

- MARQUES A. S., CHIARI E. (1988). Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C3H isogênicos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **83**: 175-181.
- MILES M.A., LANHAM S.M., SOUZA A.A., POVOA M.(1980) Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transaction of the Roval Society of Tropical Medicine and Hygiene* **74**: 221-237.
- MOMEM H. (1999) Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and Nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **94**:181-184.
- REVOLLO S., OURY B., LAURENT J.P., BARNABÉ C., QUESNEY V., CARRIÈRE V., NOEL S., TIBAYRENC M. (1998)*Trypanosoma cruzi*: Impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Exp Parasitol* **89**:30-39.
- SOUZA M.M., ANDRADE S.G., BARBOSA JR A.A., SANTOS R.T.M., ALVES V.A.F., ANDRADE Z.A. (1996) *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system Pathology in experimental Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **91**(2): 217-224.
- TIBAYRENC M., AYALA F.J. (2002) The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *TRENDS in Parasitol.* **18**: 405-410.
- VAGO A.R., ANDRADE L.O., LEITE A.A., REIS D.D., MACEDO A.M., ADAD S.J., TOSTES JR S., MOREIRA M.C.V., BRASILEIRO FILHO G., PENA S.D.J. (2000) Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. *Amer J of Pathol* **156**: 1805-1809.
- VAGO A.R., MACEDO A.M., ADAD S.J., REIS D.D., OLIVEIRA R.C. (1996^a) PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas'disease . *The Lancet* **348**:891-892.
- VAGO A.R., MACEDO A.M., OLIVEIRA R.P., ANDRADE L.O., CHIARI E., GALVÃO L.M.C., REIS D.D., PEREIRA M.E.S., SIMPSON A.J.G., TOSTES S., PENA S.D.J. (1996^a) Kinetoplast DNA Signatures of *Trypanosoma cruzi* Strains Obtained Directly from Infected Tissues. *Amer J Pathol* **149**: 2153-2159.

LEGENDS

Figures 1 and 2 a, b– Profiles of parasitemia, cumulative mortality and morphology of parasites in peripheral blood from mice infected with the parental strain Colombian or and clone CI-Col-C1 (Fig. 1); clones CI-Col-C5 and CI-Col-C8 (**Fig. 2a**) and clones CI-Col-C10 and CI-Col-C13 (**Fig. 2b**). *Peaks of parasitemia*: occurred at the 27th to 37th day post infection. Earlier peaks were seen in the infection with the CI-Col-C13 (22th day) and CI-Col-C14 (17th day) (data not shown). *Morphological aspects*: slender forms were predominant in the 14th day (75%) of infection with the parental strain (Col-Parental) and had a significant number of slender forms (48%) in the animals infected with clone CI-Col-C14. The other clones showed predominance of broad forms since the 14th day. Mortality was high (100%) for the parental strain (Col-Parental) and clones CI-Col-C13 and CI-Col-C14.

Figure 3–Histopathological lesions of myocardium and skeletal muscle from mice infected with the Colombian strain and clones: **A**– P-Col (Parental strain)– Skeletal muscle showing focal destruction of parasitized myocell and focal infiltration with polymorphonuclear neutrophils, corresponding to destroyed amastigotes. H & E 400X. **B**–Clone CI-Col-C10–Section of the heart with intracellular parasites, necrotic myocytes and mononuclear cells infiltrates in substitution of destroyed cardiac cells. H & E 400X. **C**- Clone CI-Col-C10– Skeletal muscle showing parasitized myocyte, cellular disintegration and mononuclear cells infiltration. H & E 400X. **D** – Clone CI-Col-C-14 – intense parasitism of skeletal muscle, necrosis of myocytes and mononuclear cells infiltration. H & E 400X. **E** – CI-Col-C10- Section of the myocardium with intracellular parasites and focal area of infiltration with polymorphonuclear neutrophils corresponding to intracellular parasite disintegration. H & E 400X. **F**– Clone CI-Col-C15– Myocardium with dense parasitism of cardiac myocell, and interstitial diffuse and focal infiltration with mononuclear cells. H & E 400X.

Figure 4 – Histotropism of clones of the Colombian strain: **A** – Clone CI-Col-C15 -- Adipocytes (*arrows*) in the pericardiac connective tissue, containing amastigotes of *T. cruzi*, H & E 400X. **B**-Clone CI-Col-C5- Neuronal cells of the para-sympathetic ganglion of the Auerbach plexus in the intestinal wall containing amastigote forms of *T. cruzi*. H & E 1000X. **C**-Clone CI-Col-C1- Satellite cell of the Auerbach plexus neuronal ganglion, containing intracellular amastigotes of *T. cruzi*. (*Arrows and insert*) H & E 400X. **D**-Clone CI-Co-C15- Sympathetic para-vertebral ganglion, showing dense interstitial infiltration with lymphocytes, and vacuolization of neuronal cells. H & E 400X. **E**-Clone CI-Col-C1- Section of the spleen showing vacuolized macrophage in the lymphoid follicle, containing parasites. H & E 400X. **F**-Clone CI-Col-C1– Macrophage in the hepatic sinusoid, containing amastigotes of *T. cruzi* H & E 1000X.

Figure 5 – *Immuno-histochemical labeling of T. cruzi amastigotes by peroxidase:*
A – Clone CI-Col-C5 – Section of intestine showing amastigote forms of *T. cruzi* in the Auerbach plexus. 400X. **B**-Clone CI-Col-C15 – Presence of parasites in the submucosa of the intestine. 100X. **C**- P-Col (Parental strain) – Amastigotes of *T. cruzi* in the smooth muscle of intestinal wall. 400X. **D** clone CI-Col-C15 and **E** (P-Col) – Presence of amastigotes in the Auerbach plexus of the intestine. 400X. **F** – Section of the intestine, showing amastigotes of *T. cruzi* in smooth fibers of the intestinal wall.100X.

Tab.1 The statistical analysis (Mann-Whitney Test non parametric) of the parasitemia means and standard error of early, intermediate and late phases in mice infected with Colombian strain and clones isolated on the 10th and 30th days of infection.

Parameter	CS vs Col-C1 X± SE	CS vs Col-C5 X± SE	CS vs Col-C8 X± SE	CS vs Col-C10 X± SE	CS vs Col-C13 X± SE	CS vs Col-C14 X± SE	CS vs Col-C15 X ± SE
Early phase	5.40 ± 1.96 7.40 ± 4.30	5.40±1.96 2.00 ±1.14	5.40±1.96 4.20±1.52	5.40±1.96 7.40±3.76	5.40±1.96 11.00±3.14	5.40±1.96 110.40±37.66	5.40±1.96 20.60±4.99
p value	p=0.7	p=0.1	p=0.6	p=0.9	p=0.1	p=0.009	p=0.09
Intermediate Phase	113.00±69.62 217.80±169.10	113.00±69.62 16.40±14.18	113.00±69.62 37.80±18.87	113.00±69.62 244.20±98.62	113.00 ± 69.62 114.20 ± 44.07	113.00±69.62 193.40±108.26	113.00±69.62 88.20±19.83
p value	p=0.9	p=0.04	p=0.3	p=0.3	p=0.4	p=0.9	p=0.4
Late Phase	329.80±104.18 333.75±215.60	329.80±104.18 158.40±59.72	329.80±104.18 59.60±26.44	329.80±104.18 543.20±467.70	329.80±104.18 415.80±91.54	329.80±104.18 61.50±22.62	329±104.18 387.40±118.29
p value	p=0.9	p=0.04	p=0.3	p=0.3	p=0.4	p=0.9	p=0.4

X-parasitemia mean; SE- standard error; CS- Colombian strain; Col-C: clones

Significant level $\alpha=0,05$

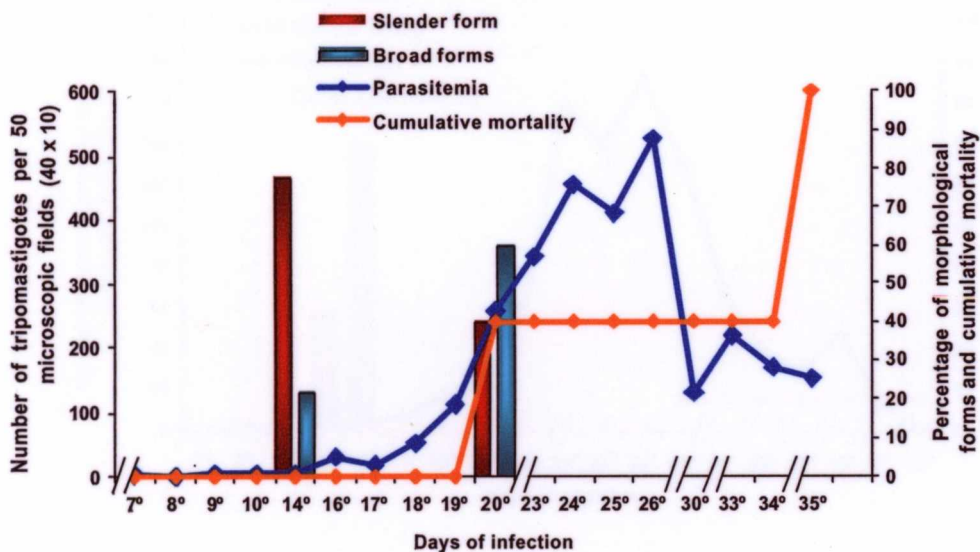
No of significant differences on the early , intermediate e late phases between Colombian strain and clones Cl-Col-C1, Cl-Col-C5, Cl-Col-C8, Cl-Col-C10, Cl-Col-C13 e Cl-Col-C15.

Significant difference on the early phase between colombian strain and clone Cl-Col-C15 and intermediate phase between Colombian strain and Cl-Col-C5

Evaluation of parasitemia, mortality and morphological aspects of clones isolated from the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*

Figure 1

Parental Strain Colombian



Clone CI-Col-C1

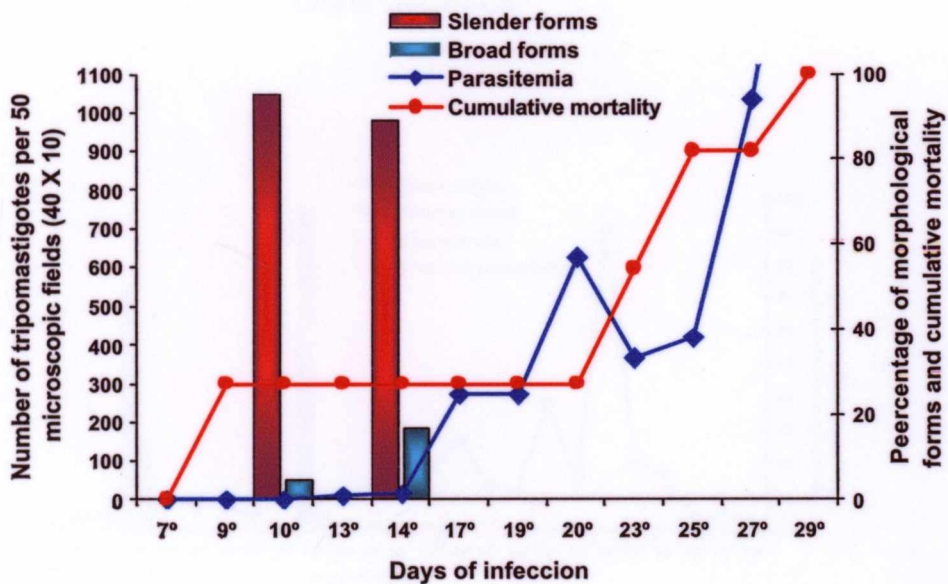
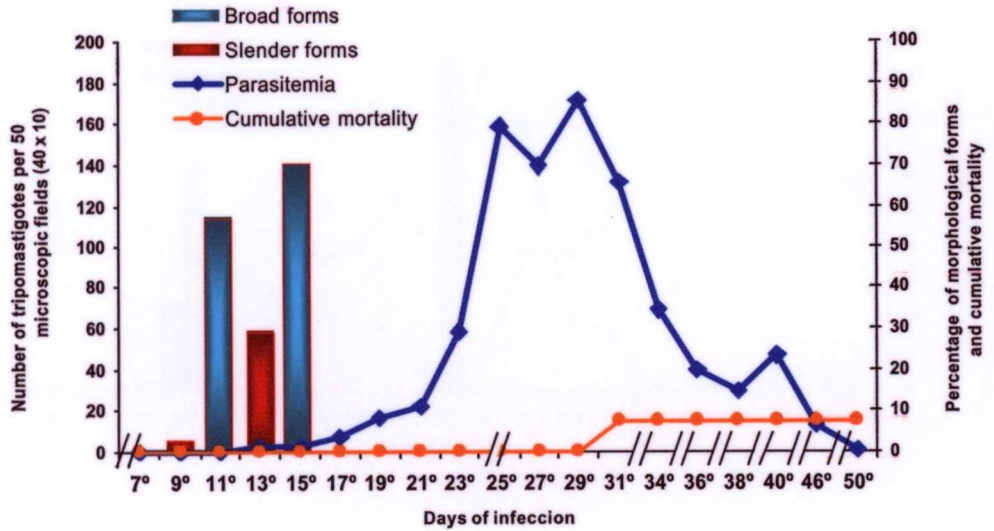
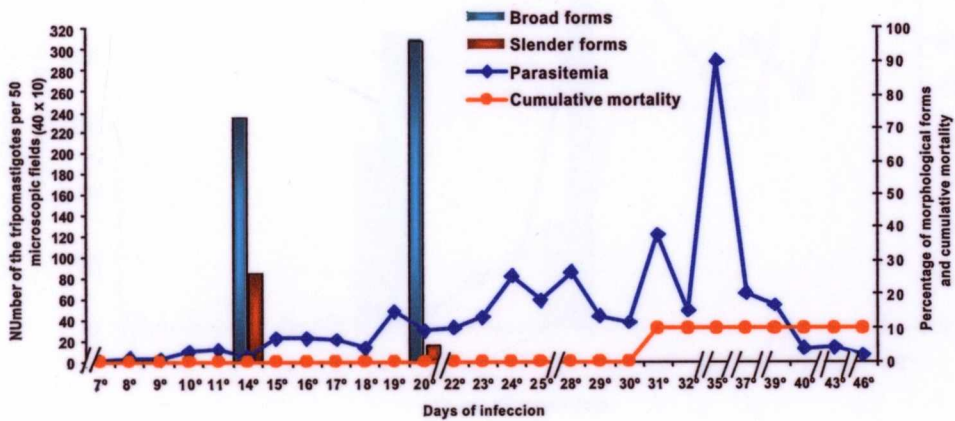


Figure 2a
Clone CI-Col-C5



Clone CI-Col-C8



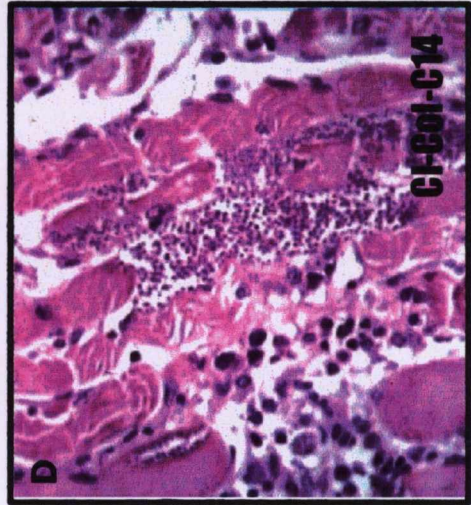
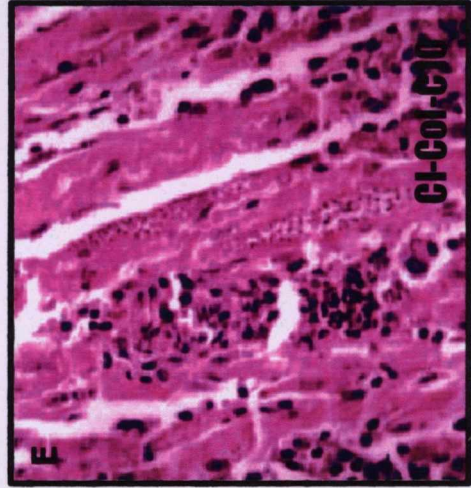
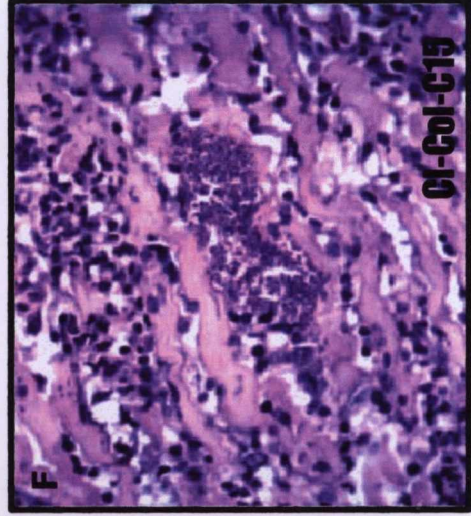
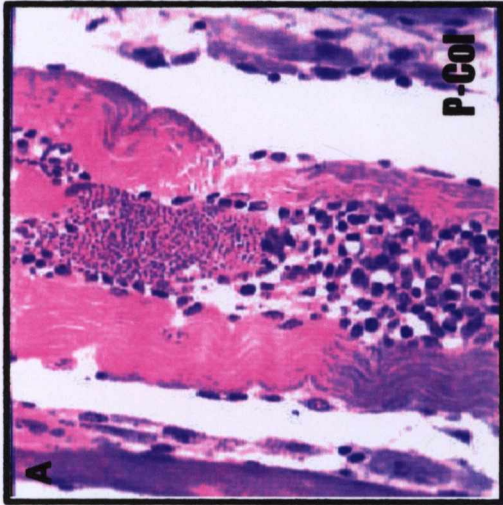
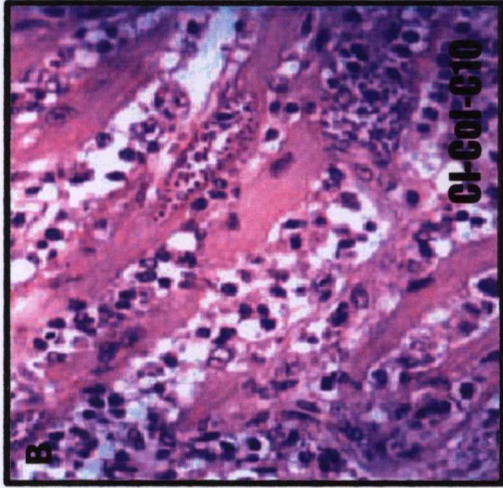


Figure 3

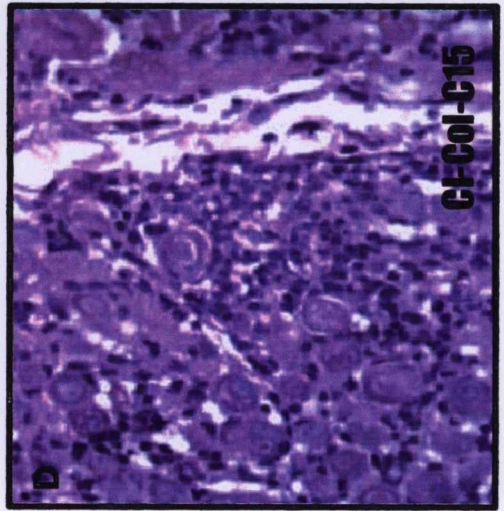
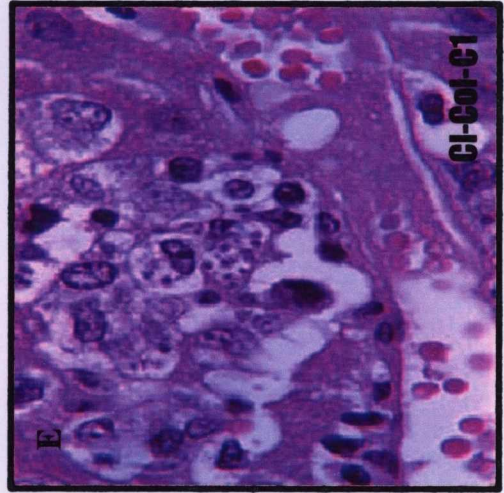
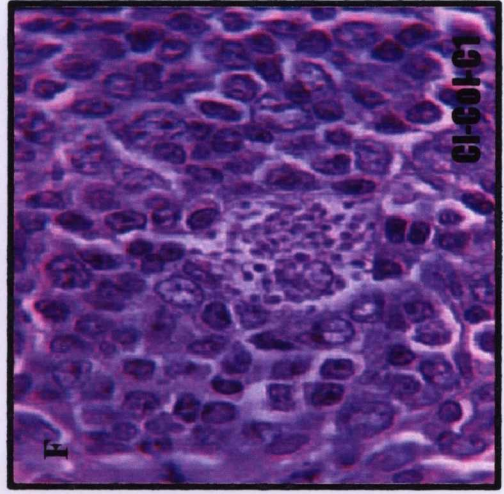
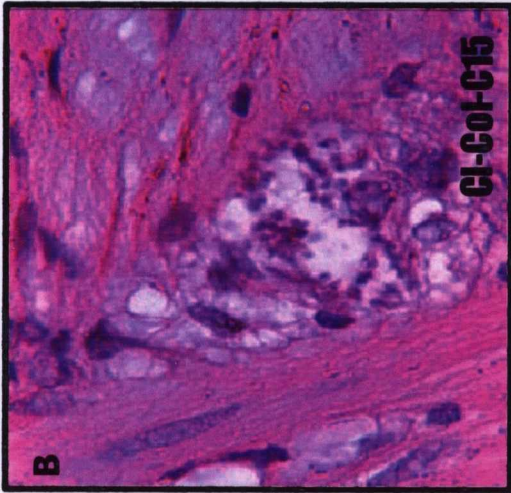
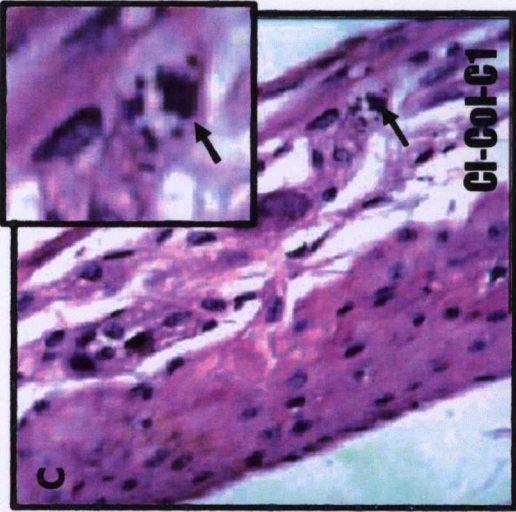


Figure 4

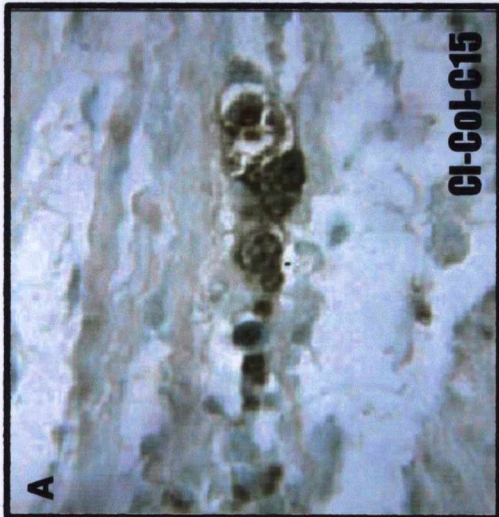
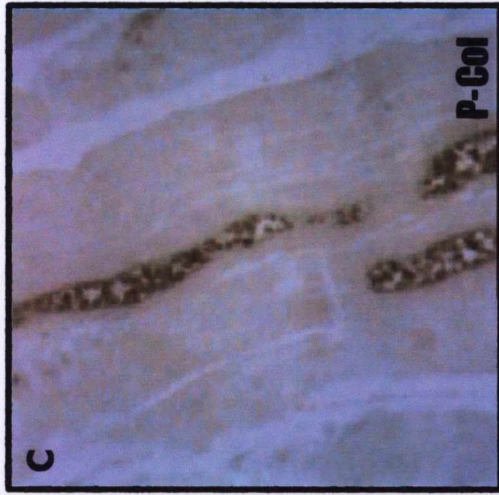


Figure 5

MANUSCRITO 2

Schizodeme analysis of clones of *T. cruzi* Colombian strain – Edson Camandaroba et al.

Schizodeme Analysis of Clones of the Colombian Strain of *Trypanosoma cruzi*, by Comparative Analysis of the PCR-Amplified Minicircles Variable Regions of Kinetoplast DNA.

Edson LP Camandaroba, Eliana AG dos Reis, Mitermayer G dos Reis, Sonia G Andrade+.

Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunidade Celular e Laboratório de Patologia e Biologia Molecular. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Fiocruz. Rua Valdemar Falcão, 121,40295-001.

The Colombian strain of Trypanosoma cruzi, prototype of biotome Type III and zymodeme 1 (T. cruzi I) has been cloned in two phases of acute infection: early phase (10 days of infection) and advanced acute phase (30 days). Twelve clones were obtained by micromanipulation and previously characterized according with its biological and biochemical characteristics and response to treatment with benznidazole showing an homology between the several clones and the parental strain. Molecular characterization was performed by the analyzes of the kinetoplast DNA (kDNA) of parental strain and the clones. Schizodeme was established by comparative study of the 330-bp fragments amplified by polymerase chain reaction (PCR) from the variable regions of the minicircles, and digested by restriction endonucleases Rsa I, Hinf I and Eco RI (restriction fragment length polymorphism-RFLP). In the parental strain and the 12 clones, the bands' profiles of the restriction fragments from the minicircles of kDNA (RFLP) were identical for the clones as compared with the parental strain and amongst the clones isolated in two different phases of infection. The present results indicate an homology between the clones and suggest the predominance of a "principal clone" in the composition of this strain, responsible for its biological and biochemical characteristics and the resistance to chemotherapy.

Key words: *Trypanosoma cruzi* – Colombian strain – clones – molecular characterization – schizodeme – clonal structure.

+Corresponding author. Fax:071 –356.4320. E. mail: sgandrade@cpqgm.fiocruz.br .

The characteristics of *Trypanosoma cruzi* populations, circulating in nature, has been investigated by different researchers, who defined several methods for the identification of their variations and diversities. The main classifications that emerged from these studies were based on several biological (Andrade, 1974), isoenzymic (Miles et al, 1980), or genetic (Morel et al, 1980) parameters. Other studies, using different methods also contributed to the classification of the populations of *T. cruzi*. The biological characteristics, including histotropism, responses to chemotherapy and correspondence with zymodeme characters (Andrade et al. 1983) leads to classification into three biological Types or Biodemes (Andrade, 1974, Andrade & Magalhães, 1997). Isoenzymic characterization included strains from different geographical areas into the zymodemes: Z1, Z2 and Z3 (Miles et al, 1980). The isoenzymic profiles (15 gene loci) studied by Tibayrenc & Ayala, (1988) demonstrated a high genetic variability of 645 *T. cruzi* samples. Combined studies on the isoenzymes profiles and randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) showed clear correlations between genetic structure and biological behavior (Revollo 1998); Souto et al (1996), based on ribosomal RNA and the mini-exon, have divided *T. cruzi* into two lineages. Tentative to systematize these classifications, has been developed in a "Satellite Meeting" (1999), during the International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. It gave origin to the recent classification into two groups: *T. cruzi I* and *T. cruzi II* ((Momen, 1999).

The molecular characterization of strains and clones of this parasite, was first performed by Morel et al, (1980) by means of the schizodeme analysis, based on the electrophoretic separation of restriction-endonuclease generated fragments of the kinetoplast DNA, (restriction fragment length polymorphism-RFLP), obtaining the electrophoretic profiles, also known as "restriction fingerprints" (Morel et al, 1986). The schizodeme method using total kinetoplast DNA represents the method of choice for distinguishing different stocks and strains of this parasite (Avila et al. 1990). According with these authors, the polymerase chain reaction (PCR) can be used to amplify the fragments of kDNA minicircles of *T. cruzi*, allowing its direct

detection and genotype classification (Avila et al, 1990). In the present investigation the RFLP was used to characterize the schizodemes patterns of several clones isolated from the Colombian strain of *T. cruzi*, after amplification, by polymerase chain reaction (PCR) of the variable portions of the kDNA. Investigations on the clonal structure of the Colombian strain of *T. cruzi* has demonstrate, in previous studies (Camandaroba et al, 2001), the presence of an homology of the clones isolated in the 10th and in the 30th day of infection, with the parental strain, considering the biological, histopathological and isoenzymic characters. However some clones differed in their virulence and in the percentage of slender forms in the early infection. Response to chemotherapy with Benznidazole of the strains of Biodeme Type III have shown a high resistance for this type of strain (Andrade et al, 1985). The clones isolated in the 30th day of infection, was identical to the parental strain with cure rates of 0 (nule) to 16%,confirming its resistance (Camandaroba et al, 2003). Clones isolated in the 10th day, also demonstrated a high resistance, although with a slight increase in its susceptibility to treatment, with cure rates of 0 (nule) to 30% (data not published).

It seems important to identify the genetic profiles of the twelve isolated clones, being seven isolated in the advanced acute infection, and five in the early phase of acute infection, and to correlate the findings, with the degree of virulence and the response to chemotherapy. The presence of a "principal clone", that predominates in the composition of one *T. cruzi* strain (Andrade, 1999), has been previously suggested by the analysis of the biological and isoenzymic characters of different Biodemes (Campos and Andrade,1996, Campos et al,1999, Camandaroba et al, 2001). The present study was performed with the objective of to investigate whether the molecular structure of the Colombian strain corresponds to the clonal homology previously described (Camandaroba et al. 2001).

MATERIAL AND METHODS

Isolation of total kDNA – kDNA was extracted from the parental Colombian strain ant its clones, using the Genomic kit (GFXtm) from Pharmacia. Parasites were obtained from axenic culture in Warren medium, cryopreserved and 100 µl were

transferred to a filtration column connected to an eppendorf tube and were added with 34 μ l of lysis buffer plus 134 μ l of extraction buffer. The samples were then centrifuged at 8.000 r.p.m This was followed by a second washing with lysis and extraction buffers. The samples were then centrifuged with Wash solution (*Pharmacia*) at 12.000 rpm during 3 min followed by addition of 50 μ l of ultra-pure and sterile water at 70° C, with centrifugation at 9.000 rpm. The samples were maintained into a cold chamber until use.

Amplification by PCR (polymerase chain reaction) - was performed in 100 μ l reaction mixture containing 10 mM Tris HCl (pH 8.4), 50 mM KCl, 2.0 mM MgCl₂, 200 μ M of each dNTP, 2 μ l DNA (~0.5 μ g), 2.5 U of Taq polymerase (Perkin Elmer-Cetus Corporation) 2 pmols of previously described oligonucleotide primers (Avila et al. 1990). After an initial 5 min denaturation step at 94° C, 35 cycles of amplification were performed on DNA Thermal Cycler (Perkin Elmer-Cetus gene Amp PCR System 9600) with a step program consisting of 45 sec. Denaturation at 94° C, 45 sec annealing at 55° and 1 min extension at 72° C. Additional 10 min extension step at 72° C was performed at the end of reaction. Each PCR round had a negative control (ultra-pure water) and serum normal of human patient. In order to confirm the results, PCR products of the predicted size (330 bp) were separated by electrophoresis in a 2% agarose gel.

kDNA analysis - was performed by comparative study of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) obtained from the digestion of amplified minicircle DNA variable region by *Rsa* I, *Hinf* I and *Eco* RI restriction endonucleases, according to the manufacturer's procedures (*Pharmacia Biotec*) The DNA fragments were separated by electrophoresis in a 7% polyacrylamide gel on the system electrophoresis vertical (*Pharmacia Biotech*) and ethidium bromide stained (*Pharmacia Biotec*), and visualization in the system Eagle eye I.

RESULTS

PCR amplification of the twelve clones isolated from Colombian strain in two different phases of infection revealed the presence of 330bp fragments from the k-DNA amplified minicircles of every clone as shown in Figure 1.

The bands' profiles of the restriction fragments from the minicircles of kDNA (RFLP) obtained through digestion with the enzymes *Hinf* I (**Figs. 2A, 2B**)) *Rsa* I (**Fig. 3**), and *Eco* RI (data not included) are shown in the Figures 2 and 3. They were identical for the clones as compared with the parental strain and amongst the clones isolated in two different phases of infection (Figs. 2, 3).

DISCUSSION

The clonal structure of *T. cruzi* strains has been proposed by Tibayrenc et al, (1986) and Tibayrenc & Ayala (1988). According to those authors, *T. cruzi* strains are natural clones and the natural selection, favouring only certain genetic patterns of combinations could account for a limited number of isoenzyme strains represented by three major clones. Revollo et al (1998) , confirmed a correlation between the biological characteristics and phylogenetic variability of *T. cruzi* by multilocus enzyme electrophoresis and random amplification of polymorphic DNA.

Results of the present study confirmed the clonal homology of the Colombian strain of *T. cruzi* previously detected by the biological and isoenzymic characterization (Camandaroba et al, 2001). Molecular analysis, through PCR amplification of the variable portions of the kDNA minicircles and characterization

of the restriction fragment length polymorphism (RFLP) have shown identical electrophoretic profiles, after digestion with the restriction enzymes *Hinf* I, *Rsa* I and *Eco* RI. The Colombian parental strain and the 12 clones presented the same schizodeme. Avila et al (1990) analyzing the profiles obtained by enzyme digestion of 56 strains from South and Central America classified them into different schizodemes : S1, S2, S3, S4, S5, S6 . The Colombian strain referred by these authors was included into the group S4 . However, tentative to establish a correspondence with the profiles of the bands obtained for the Colombian parental strain and the clones, in the present study, was not accomplished, probably because of technical variations in the methods used in the investigations.

Albeit the similarity of the genetic profiles of the isolated clones, a variation in the degree of virulence between them, has been registered for the clones isolated in the 30th day of infection (Camandaroba, et al,2001) and for those isolated in the 10th day of infection (data not included)). Some of these clones have determined in mice, high levels of parasitemia, and the presence of a significant number of slender forms in the early phase of infection. This confirms the hypothesis that the virulence is a variable parameter, independent of the biological or genetic characteristics of the *T. cruzi* strain (Andrade, 1974). Resistance to chemotherapy has been detected in the infection with the several clones. These data confirm the importance of genetic characters in the response to chemotherapy (Toledo et al, 2003) and confirmed the high resistance of strains of Biodeme Type III (*T. cruzi* I), previously demonstrated (Andrade et al. 1985).

Findings of the present study support the hypothesis that a "principal clone" (Andrade, 1999, Camandaroba et al, 2001) predominate in the Colombian strain

and is responsible for its behavior and tissue tropism , confirmed by the molecular characterization, using the schizodeme analysis of the PCR amplified minicircles of kinetoplast DNA, as previously described for the Clones of the 21SF strain , (Campos et al, 1999) .

REFERENCES

- Andrade SG 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev.. Pat. Trop* 3: 165-121.
- Andrade SG 1999. *Trypanosoma cruzi*: Clonal Structure of Parasite Strains and the Importance of Principal Clones. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 185-187.
- Andrade SG, Magalhães JB 1997. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 30: 27-35.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL, 1985. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* of different types. *Bull. Wrld. Hlth. Org.* 63: 721-726.
- Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG 1983. Correlation between isoenzyme patterns and biological behavior of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.* 77: 796-799.

Avila H, Gonçalves AM, Nehme NS, Morel CM, Simpson L 1990. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Mol. Biochem. Parasitol* 42: 175-188.

Camandaroba ELP, Campos RF, Magalhães JB, Andrade SG 2001. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 34 : 151-157.

Camandaroba ELP, Reis EAG, Gonçalves MS, Reis MG, Andrade SG 2003. *Trypanosoma cruzi*: Susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the high resistant Colombian strain. *Rev Soc Bras Med Trop* 36: 1-9.

Campos FC, Gonçalves MS, Reis EAG, Reis MG, Andrade SG 1999. Comparative analysis by Polymerase Chain Reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its Clones and subclones: Possibility of predominance of a principal clone in this area. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94(1): 23-29.

- Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Pova M 1980 Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. R. Soc. Med. Hyg* 74: 221-237.
- Momen H 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a Commentary on Characterization and Nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 94: 181-184 Suplemento I.
- Morel C, Chiari E, Plessmann Camargo E, Mattei DM, Romãha AJ, Simpson L 1980. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 77: 6810-6814.
- Morel CM, Deane MP, Gonçalves AM 1986. The Complexity of *Trypanosoma cruzi* Populations revealed by Schizodeme Analysis. *Parasitol. Today* 2: 97-101.
- Nunes LR, Carvalho MRC, Buck GA 1997. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. *Mol. Biochem. Parasitol* 86: 211-224.
- Revollo S, Oury B, Laurent J, Barnabé C, Quesney V, Carrière B, Noël S, Tibayrenc M 1998. *Trypanosoma cruzi*: Impact of Clonal Evolution of the Parasite on Its Biological and Medical Properties. *Exp. Parasitol* 89: 30-39.

Satelite Meeting 1999. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 94 (Suppl. 1): 429-432.

Tibayrenc M, Ayala FJ 1988. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas; disease:genetical,taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 42: 277-292.

Tibayrenc M, Ward P, Moya A., Ayala FJ 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Natl. Acad. Sci. (USA)* 83: 115-119.

LEGENDS

Figure 1- PCR amplification of twelve clones isolated from the Colombian strain in two different phases of infection: M- Mark ladder ; CP-parental strain. NC_a- Negative Control (normal human serum); NC_b - Negative Control (ultra-pure water).

Clones isolated in the 30th day of infection : CI-CoL-C1; CI-Col-C2; CI-Col-C3; CI-Col-C4; CI-Col-C5; CI-Col-C6; CI-Col-C7

Clones isolated in the 10th day of infection: CI-Col-C8; CI-Col-C10; CI-Col-C13; CI-Col-C14; CI-Col-C15.

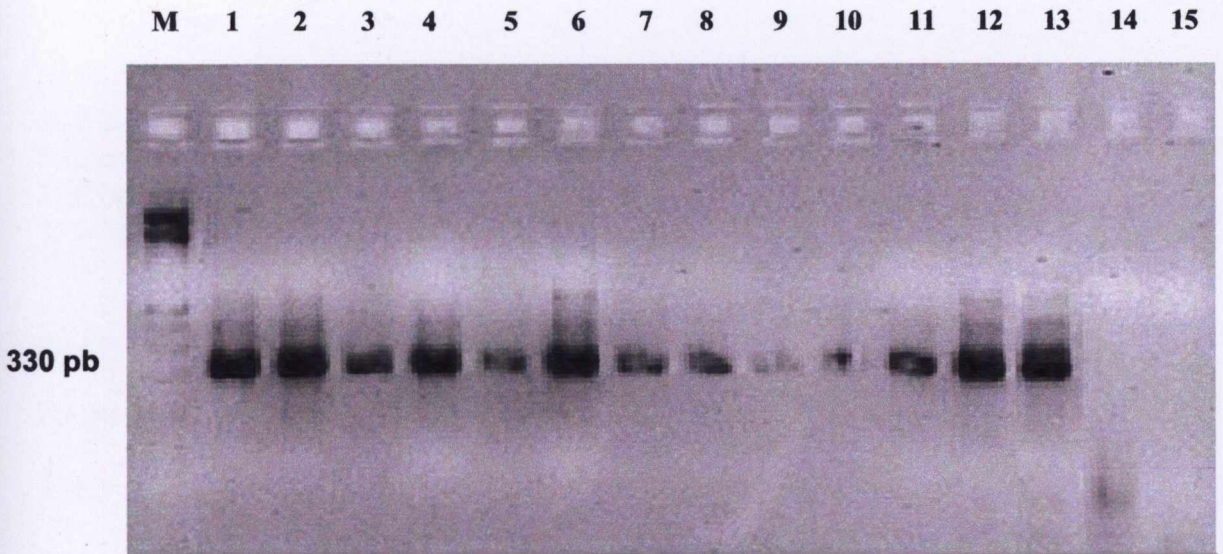
Figure 2A - Schizodeme patterns from twelve clones of the Colombian strain, isolated in two different phases of infection, digested by *Hinf* I restriction enzyme: CP-parental strain. Clones isolated in the 30th day of infection:CI-CoL-C1; CI-Col-

C2; CI-Col-C3; CI-Col-C4; CI-Col-C5; CI-Col-C6; CI-Col-C7. Clones isolated in the 10th day of infection: CI-Col-C8; CI-Col-C10; CI-Col-C13; CI-Col-C14; CI-Col-C15.

Figure 2B-Schizodeme patterns of eight clones isolated from the Colombian strain in two different phases of infection, digested by *Hinf* I restriction enzyme: ; Colombian strain; Clones isolated in the 30th day of infection: CI-Col-C1; CI-Col-C2; CI-Col-C3; CI-Col-C4; clones isolated in the 10th day of infection: CI-Col-C8; CI-Col-C10; CI-Col-C13; CI-Col-C14.

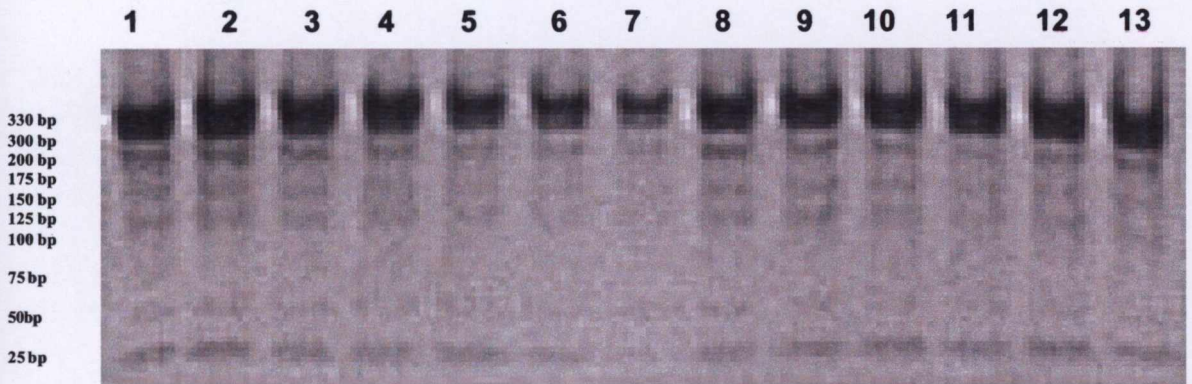
Figure 3- Eight clones schizodeme patterns from the Colombian strain, isolated in two different phases of infection, digested by *RSA* I restriction enzyme: Colombian strain; clones isolated in the 30th day of infection: CI-Col-C2; CI-Col-C3; CI-Col-C4; CI-Col-C5; Clones isolated in the 10th day of infection: CI-Col-C8; CI-Col-C7; CI-Col-C10; CI-Col-C13.

Figure 1



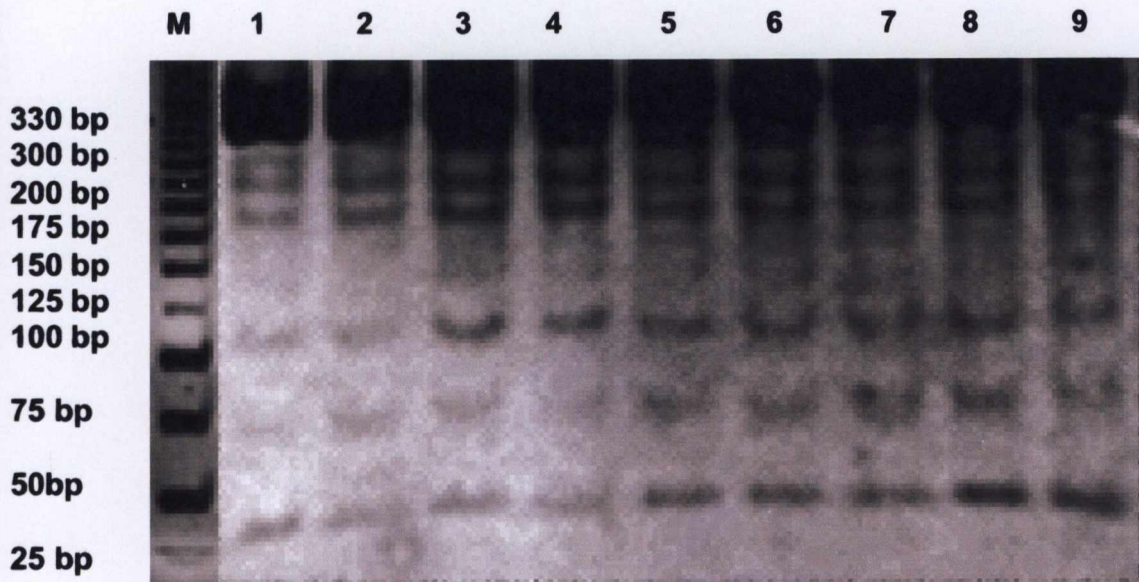
M-Molecular marker Ladder; 1- CI-Col-C1; 2- CI-Col-C2; 3- CI-Col-C3; 4- CI-Col-C4; 5- CI-Col-C5; 6- CI-Col-C6; 7- CI-Col-C7; 8- CI-Col-C8; 9- CI-Col-C10; 10- CI-Col-C13; 11- CI-Col-C14; 12- CI-Col-C15; 13- Colombian strain; 14- NC1- negative control: normal human serum; 15- NC2- Negative control: water

Figure 2A



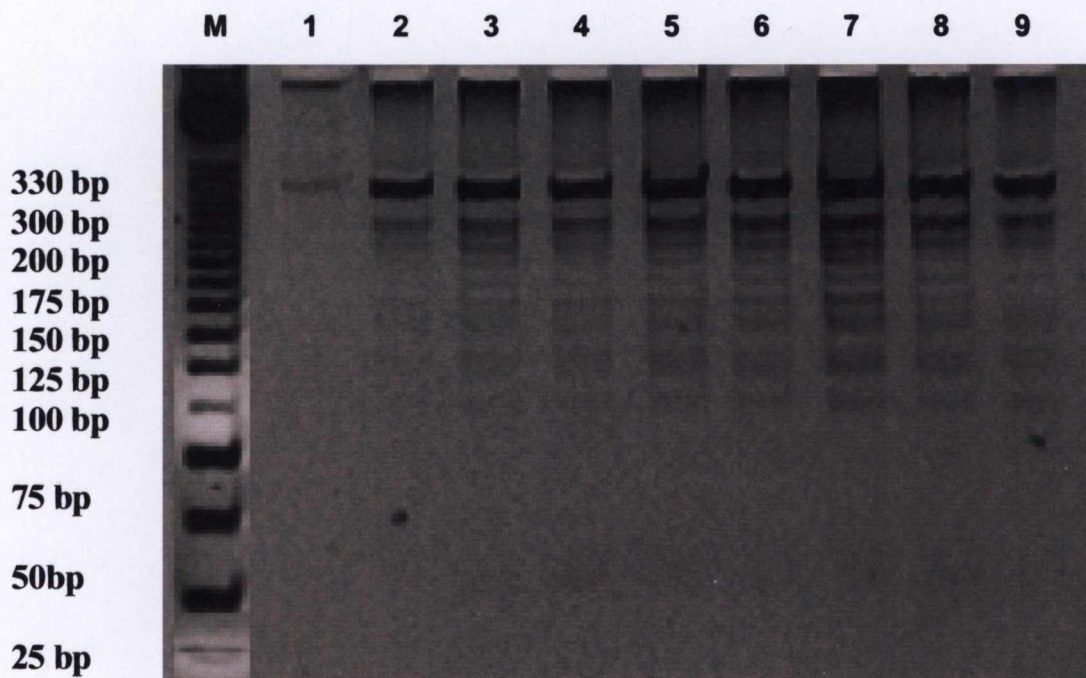
1- Colombian strain; 2- CI-Col-C1; 3- CI-Col-C2; 4- CI-Col-C3; 5- CI-Col-C4; 6- CI-Col-C5; 7- CI-Col-C6; 8- CI-Col-C7; 9- CI-Col-C8; 10- CI-Col-C10; 11- CI-Col-C13; 12- CI-Col-C14; 13- CI-Col-C15

Figure 2B



M- Molecular marker Ladder ; 1- Colombian strain; 2- CI-Col-C1; 3- CI-Col-C2; 4- CI-Col-C3; 5- CI-Col-C4; 6- CI-Col-C8; 7- CI-Col-C10; 8- CI-Col-C13; 9- CI-Col-C14

Figure 3



Molecular marker Ladder ; 1- Colombian strain; 2- CI-Col-C2; 3- CI-Col-C3; 4- CI-Col-C4; 5- CI-Col-C5; 6- CI-Col-C8; 7- CI-Col-C7; 8- CI-Col-C10; 9- CI-Col-C13

ARTIGO 1

***Trypanosoma cruzi*: susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the highly resistant Colombian strain**

Trypanosoma cruzi: suscetibilidade à quimioterapia com o benzonidazol de clones isolados da cepa Colombiana, altamente resistente

Edson L.P. Camandaroba¹, Eliana A.G. Reis², Marilda S. Gonçalves²,
Mitermayer G. Reis² and Sonia G. Andrade¹

Abstract The present investigation was performed to evaluate the susceptibility of seven clones isolated from the highly resistant Colombian strains, prototype of Biodeme Type III. Seven clones previously obtained, showed a phenotypic homogeneity and high similarity with the parental strain. Eight groups of 30 mice were inoculated with one of seven clones or the parental strain; 20 were treated with benznidazole (100mg/kg/day) and 10 were untreated controls. Cure evaluations were done by parasitological and serological tests and PCR. Cure rates varied from 0% (null) to 16.7%. Correlation between positivity of parasitological and serological tests with positive PCR reached 37%. The results demonstrated the high resistance of the clones, suggesting the predominance of a highly resistant principal clone in this strain. The findings apparently indicate that the possibility of cure is minimal for patients infected with this biodeme; a fact that could affect the control of Chagas' disease through treatment of chronically infected people.

Key-words: Chagas' disease. *Trypanosoma cruzi*. Clones. Chemotherapy. Resistance. Benznidazole.

Resumo A presente investigação visa avaliar a suscetibilidade ao benzonidazol de sete clones isolados da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, protótipo do biodema III, altamente resistente aos quimioterápicos. Os clones previamente obtidos apresentavam homogeneidade fenotípica e alta similaridade com a cepa parental. Oito grupos de 30 camundongos foram inoculados com cada um dos sete clones e a cepa parental; 20 foram tratados com benzonidazol 100mg/kg/dia e 10 foram controles não tratados. A avaliação da cura foi feita por testes parasitológicos, sorológicos e o PCR. Os índices de cura variaram de 0%(nulo) a 16,7%. Correlação entre a positividade dos testes parasitológicos e sorológicos com a da PCR alcançou 37%. Os resultados demonstraram a alta resistência dos clones, sugerindo a predominância de um clone principal, muito resistente à quimioterapia nesta cepa. Isto indica que as possibilidades de cura de pacientes infectados com este biodema são mínimas, o que poderá interferir no controle da doença através do tratamento de indivíduos cronicamente infectados.

Palavras-chaves: Doença de Chagas. *Trypanosoma cruzi*. Clones. Quimioterapia. Resistência. Benzonidazol.

Among endemic areas of Chagas' disease in Brazil, in which transmission by the vector insect is only partially controlled, 5 million people are estimated to be chronically infected³⁰. Treatment of infected people in endemic areas has been recommended by the National Health Foundation of Brazil for acute or recent chronic cases¹⁹ as well as for congenital and accidental infections and for children with positive serology. It is also indicated for patients with acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) and for those undergoing organ transplantation

or receiving immunosuppressive drugs, which present a risk for reactivation of latent infection with *T. cruzi*¹⁹. However, success of treatment with currently used drugs (Nifurtimox or Benznidazole) is limited by the prevalence of *T. cruzi* strains resistant to these chemotherapeutics^{3,5,21}. It has been shown that resistance is correlated with biological characteristics of the parasite. The Type III biodeme, of which the prototype is the Colombian strain, is highly resistant⁵. Strains isolated from mice previously treated with benznidazole showed increased resistance

1. Laboratório de Doença de Chagas Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA. 2. Laboratório de Patologia e Biologia Molecular do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz da Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, BA.

Financial support: this work was sponsored by the "Programa de Apoio à Pesquisa Estratégica em Saúde" (Papes 2) - FIOCRUZ - Rio de Janeiro-Brazil
Address to: Dra. Sonia G. Andrade. Laboratório do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ. R. Waldemar Falcão 121, Brotas, 40295-001 Salvador, BA, Brazil.

Fax: 55 71 356-4292

Recebido para publicação em 10/1/2002.

to treatment with the same drug⁴, suggesting the selection of resistant clones to explain the persistence of infection in treated mice. Marretto and Andrade²² investigated this possibility by studying the isoenzymic profiles of the Colombian strain isolated from treated mice, but no phenotype differences were detected by comparison of the isoenzymic profiles. Murta & Romanha²⁴ performed the *in vivo* selection of nitroderivates-resistant clones from the Y strain, and concluded that the resistance of the strain could be related to the sensitive/resistant clone ratio in the population.

Considering that *T. cruzi* strains are complex clonal populations²⁶, it is important to evaluate the susceptibility to treatment of a representative number of individual clones. A previous study¹⁴ demonstrated the identity of seven clones obtained from the Colombian strain, based upon biological behavior or isoenzymic profiles. The possibility of the predominance of a *principal clone*, as representative of strains circulating in a single endemic area, has been recently suggested^{2 16}. This could be decisive for the success of treatment of chronic patients, considering the possibility of predominance of a highly

resistant *principal clone* in one geographical area. Although the Colombian strain has been characterized as resistant, the presence of susceptible clones cannot be ruled out. In a population of parasites with mixed susceptibilities, a partial response to treatment could be expected in infected individuals, with a decrease in the parasite load. In the present study, in which the seven clones of the Colombian strain were tested for susceptibility to benznidazole, results obtained in mice were evaluated by various parasitological tests, as well as by polymerase chain reaction (PCR). This test has been recently included for the diagnosis of chronic infection in humans^{10 11 12} and as a cure test in treated patients¹³. An evaluation of the sensitivity of this test has been performed in the blood containing known aliquots of trypomastigotes¹⁷. However, the sensitivity of PCR for post-treatment detection of sub-patent parasitemia in mice has not been previously evaluated, in comparison with the standard tests. The present study examined the susceptibility to chemotherapy of individual clones from a resistant strain and the value of PCR as a cure test.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals. For the present study, 240 Swiss outbred mice were used. Maintenance and care of experimental animals complied with the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/FIOCRUZ guidelines for humane use of laboratory animals.

***Trypanosoma cruzi* strain:** the Colombian strain²⁰ biologically characterized as Biodeme Type III⁴ Zymodeme 1^{4 23} and recently included into the group *T. cruzi* I⁸ was used for all the experiments.

Clones from the Colombian strain: clones were obtained by isolation of a single form according to Dvorak¹⁸ from peripheral blood of Swiss outbred mice, infected with the parental strain as previously described¹⁴.

Identification of the isolated clones: seven clones were isolated and denominated as follows: Cl-Col-C1, C2, C3, C4, C5, C6 and C7.

Chemotherapy: eight experimental groups of 30 mice, weighing from 10 to 12g, were infected with 5×10^4 to 1×10^5 trypomastigotes from the parental strain or one of the seven clones (Table 2). Twenty infected mice from each group were submitted to chemotherapy and 10 remained as untreated controls. Benznidazole (N-benzyl-2-nitro-1-imidazole-acetamide) 100mg/kg of body weight / day was administered daily by gavage, from 20 days post infection up to 90 days. Following treatment, parasitemia was evaluated on alternate days, and the results were evaluated as the mean obtained in five mice from each experimental group. Parasitemia of infected non-treated controls was similarly evaluated.

Evaluation of treatment: a total of 83 mice that survived from the treatment groups were submitted to

parasitological tests and serological examination to detect cure rates. Parasitemia was examined for 30 days following the end of treatment, to detect positivity by direct examination. The mice that maintained a negative parasitemia were submitted to the parasitological cure tests: subinoculation and haemoculture; serology and PCR were also used as cure tests. A total of 21 untreated mice that survived from the eight groups (Table 1) were similarly evaluated during the post-treatment period.

Subinoculation: citrated blood from each mouse (0.5ml) was intraperitoneally inoculated into 5 suckling mice. Blood examination was performed until 20 days post inoculation to detect the presence of trypomastigotes.

Haemoculture: this was performed in Warren axenic medium²⁸ with 0.5ml of blood directly collected from the heart, and the cultures were examined after 45 days.

Serological test: indirect immunofluorescence test (IFT) was performed using as antigen, culture forms of *T. cruzi* in Warren medium, washed three times by centrifugation with PBS pH 7.2, formalin fixed and mounted on glass slides. Sera were tested in decreasing concentrations, from 1:10 to 1:640. Fluoresceinated anti-mouse rabbit IgG secondary antibody was diluted at 1:80.

Polymerase chain reaction (PCR): a total of 54 samples of blood were obtained from treated mice, 7 infected with the parental strain and 47 with the clones. As controls, 5 samples from untreated mice infected with the parental strain were tested by PCR.

The blood samples (500µl) were stored at 4°C in 1:1 guanidine 6M/EDTA 0.2M pH 8.0 solution for a maximum of 30 days until processing.

Isolation of the kinetoplast DNA (kDNA) was performed according to Wincker et al²⁹. For amplification of a 330 bp fragment primers P35: 5'AAA TAA TGTACG GG (T/G)GAGATG CATGA 3' and P36: 5'GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT3'd NTPs and 2.5U of Taq Polymerase (*Perkin Elmer Cetus Corporation*) were added to the isolated k DNA. After an initial 5 min denaturation step at 94°C, 35 cycles of amplification were performed in a Thermal Cycler (*Perkin-Elmer-Cetus gene Amp PCR System 9600*) with a step program consisting of 45 sec denaturation at 94°C, 45 sec annealing at 55°C and 1 min extension at 72°C and 1 min extension at 72°C. The product of PCR electrophoresed in 2% agarose gel

in TAE buffer (0.04M Tris-acetate, 0.001 M EDTA) and stained with ethidium bromidium. As DNA ladder, 100 base pair marker (*Amersham Pharmacia Biotech*) was used. Each PCR batch included a negative control (blood sample from uninfected mouse) and a positive control (culture forms of *T. cruzi*). In order to confirm the specificity of the amplified fragment it was analyzed by dot blot hybridization using allele specific probe P67 (5'TGGTTTTGGGG(C/G 0(G/C)(T/G)TCAA(A/C)TTT 3'). Labeling the 5' end of the oligonucleotide probe was performed using the radioactive nucleotide [³²P]ATP and the T4 polynucleotide kinase enzyme (*Kit Ready-To-Go T4 Polynucleotide kinase - Pharmacia Biotech*) and autoradiography was performed.

RESULTS

Parasitemia. As shown in Figures 1a, 1b, 1c and 1d, parasitemic levels of treated animals markedly decreased in the different experimental groups during treatment. Negative parasitemia (by direct blood examination) was

observed from day 2 - 8 of treatment with slight differences between the clones. In the post treatment phase (120 days on), positive direct parasitemia was detected in 19/ 83 mice (22%).

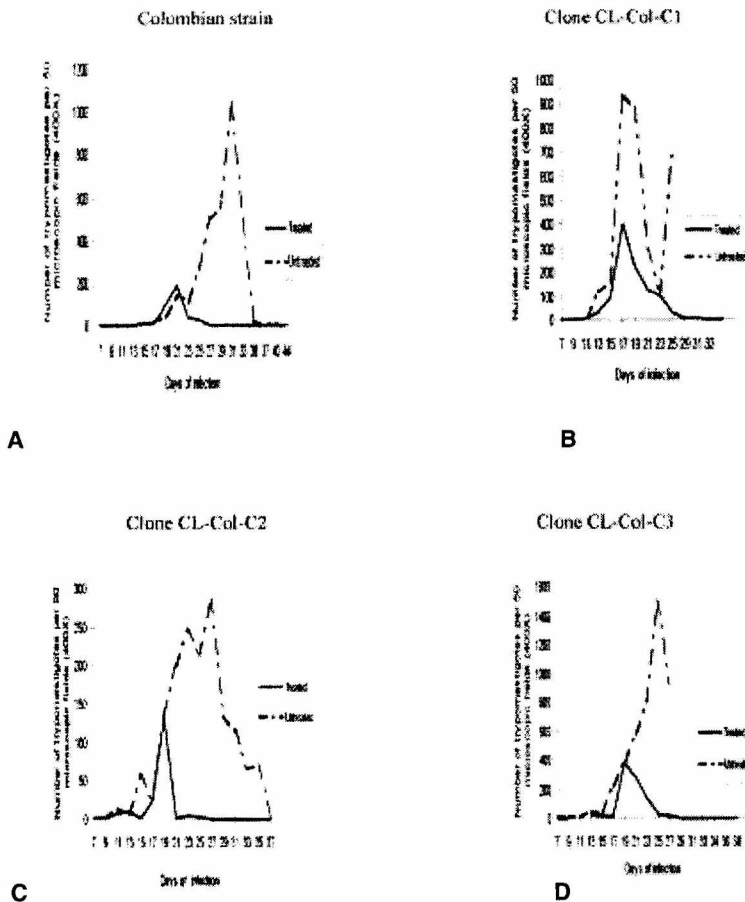


Figure 1 - Parasitemia in mice infected with *T. cruzi* (Colombian strain and its clones): untreated control (dashed line) and treated with benznidazole (solid line): a) parental strain, b) clone CL-Col-C1, c) clone CL-Col-C2, d) clone CL-Col-C3. A marked decrease of parasitemic levels of treated animals is seen from the beginning of treatment in the different experimental groups.

Untreated controls showed negative parasitemia (by direct blood examination, from the day 37 on). In the post treatment phase positive parasitemia to direct blood examination was detected in 11/21 mice (52.3%).

Mortality. Cumulative mortality and the number of survivors in the different experimental groups are expressed in Table 1. Peak mortality occurred at day 30 of infection, and decreased with treatment, except for the mice infected with clone C1, with high mortality. The untreated mice showed a significantly higher mortality when compared with the treated animals, except for

Clone C2, with low mortality. From 160 treated mice 83 animals survived (mortality rate 48%) and from 80 untreated mice, 21 survived (mortality rate 73%).

Parasitological cure tests. Positivity of at least one test (direct blood examination, subinoculation into newborn mice or haemoculture) was defined as cure failure; positive parasitological tests were present in 50% to 100% of the mice examined 30 days after the end of treatment, for the parental strain and the 7 clones (Table 2). The untreated controls were 100% positive by parasitological tests.

Table 1- Cumulative mortality of mice infected with the Colombian strain of *T. cruzi* and 7 clones untreated and treated with benznidazole.

Experimental groups	Cumulative mortality					
	treated*			untreated**		
Days infection	30	60	90-120	survivors number	20-90	survivors number
	%	%	%		%	
Parental strain	40.0	0.0	0.0	12	20.0	8
Cl-Col-C1	60.0	65.0	80.0	4	60.0	4
Cl-Col-C2	10.0	0.0	0.0	18	0.0	10
Cl-Col-C3	40.0	0.0	0.0	12	100.0	0
CL-Col-C4	75.0	0.0	0.0	5	90.0	1
Cl-Col-C5	50.0	0.0	0.0	10	80.0	2
CL-Col-C6	60.0	0.0	0.0	8	100.0	0
CL-Col-C7	30.0	0.0	0.0	14	80.0	2
Total				83		21

* Initial number: 20 mice; **Initial number: 10 mice

Table 2- Cure rates in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Colombian strain and 7 clones), treated with benznidazole, based on parasitological and serological tests.

Identification	Inocula	Mice (#)	Positive cases(#)	Positive		Cure rates ^b %
				parasitol tests %	serology ^a %	
Col Strain	5 x10 ⁴	12	12	84.0	88.8	0.0
Cl-Col-C1	5 x10 ⁴	4	4	100.0	100.0	0.0
Cl-Col-C2	1x10 ⁵	18	18	100.0	100.0	0.0
Cl-Col-C3	5 x10 ⁴	12	10	66.6	69.0	16.7
Cl-Col-C4	5 x10 ⁴	5	5	100.0	100.0	0.0
Cl-Col-C5	1x10 ⁵	10	9	50.0	100.0	0.0
Cl-Col-C6	1x10 ⁵	8	8	62.5	100.0	0.0
Cl-Col-C7	5 x10 ⁴	14	14	69.0	100.0	0.0
Total		83	80			

^a: Titers of Indirect immunofluorescence tests: 1:20 to 1:640

^b: Combined data of parasitological and serological results

Col Strain = Colombian parental strain. Cl-Col-C = Clone Colombian strain

Serologic reaction. the indirect immunofluorescence test (IFT) revealed positive results for 94% of treated animals 30 days after the end of treatment (Table 2); the minimal titer considered as positive was 1:20. Titers varied from 1:20 to 1:640 for the parental strain and the seven clones (Tables 3 and 4). Untreated controls showed positive IFT with titers varying from 1:80 to 1:640.

Polymerase chain reaction. The PCR amplification and hybridization revealed the presence of 330bp fragments from the kDNA amplified minicircles as shown

in Figures 2, 3 and 4; 29.2% of blood samples obtained from treated mice were positive by PCR versus 40% of the controls (infected, not treated).

Cure rates. Cure rates were established by the combination of parasitological test results and IFT titers, from the titer of 1:20 (Table 2). Following this criterion the parental strain and all the clones with the exception of Clone C3 presented 0% cure. Clone C3 showed 16.7% cure. Comparison between the results of parasitological cure tests, serological tests and PCR are expressed in

Table 3- Comparison of results of parasitological tests, serology and PCR in mice infected with the Colombian parental strain and submitted to benznidazole therapy.

Mice (#)	Parasitological tests			Serological IIF titers ^b	Molecular test/PCR
	Parasitemia ^a	subinoculation	hemoculture		
03	neg	neg	neg	1:20	*
04	neg	neg	neg	1:640	neg
05	neg	pos	neg	1:320	*
06	neg	pos	pos	1:640	neg
07	neg	pos	neg	1:40	pos
08	neg	pos	neg	neg	pos
09	neg	pos	neg	1:160	neg
10	pos	*	*	*	*
11	neg	pos	neg	1:320	pos
12	neg	pos	neg	1:320	*
14	neg	pos	pos	1:640	pos
15	pos	*	*	*	*

*Test not done

^a: Cases with positive direct parasitemia were not submitted to the other tests

^b: Indirect immunofluorescence test

Table 4- Comparison of results of parasitological tests, serology and PCR in mice infected with the clone CI-Col-C7, treated with benznidazole.

Mice (#)	Parasitological tests			Serological IIF titers ^b	Molecular test/PCR
	Parasitemia ^a	subinoculation	hemoculture		
1	neg	pos	pos	1:320	neg
2	neg	pos	pos	1:320	neg
3	neg	*	neg	1:640	neg
4	pos	pos	*	*	*
5	neg	*	pos	1:640	pos
6	neg	*	pos	1:640	pos
7	neg	pos	pos	1:640	neg
8	neg	pos	pos	1:640	pos
9	neg	pos	neg	1:640	neg
10	neg	pos	pos	1:640	neg
11	neg	pos	pos	1:640	pos
12	neg	neg	neg	1:640	pos
13	neg	pos	pos	1:640	pos
14	neg	neg	neg	1:160	neg

* Test not done

^a: Cases with positive direct parasitemia were not submitted to the other tests

^b: Indirect immunofluorescence test

Tables 3 and 4 for mice infected with the parental strain or clone C7 as examples of the results from different tests, obtained in groups infected with several clones.

Correlation between parasitological tests and PCR. In mice with positive parasitological tests (from

which samples were tested by PCR) 37% were positive by PCR and 57% were negative. In mice with negative parasitological tests, samples tested by PCR were negative in 3.7% and positive in 1.8% (Tables 3 and 4).

DISCUSSION

Analysis of the biological behaviour of clones isolated from the Colombian strain, prototype of Type III, Zymodeme 1 of *T. cruzi*, showed clonal homogeneity¹⁴. This was considered suggestive of the predominance of a *principal clone*^{2, 16}, according to the concept of Tibayrenc *et al*⁶ and Tibayrenc and Breniere²⁷. Studies of Revollo *et al*²⁵ have shown a clear relationship

between the genetic profiles of clonal populations of *T. cruzi* and its biological characteristics, including the response to chemotherapy.

In the present investigation, the homogeneity of biological characteristics and isoenzyme patterns of seven clones as previously described¹⁴, corresponded to similar resistance to chemotherapy. Treatment of

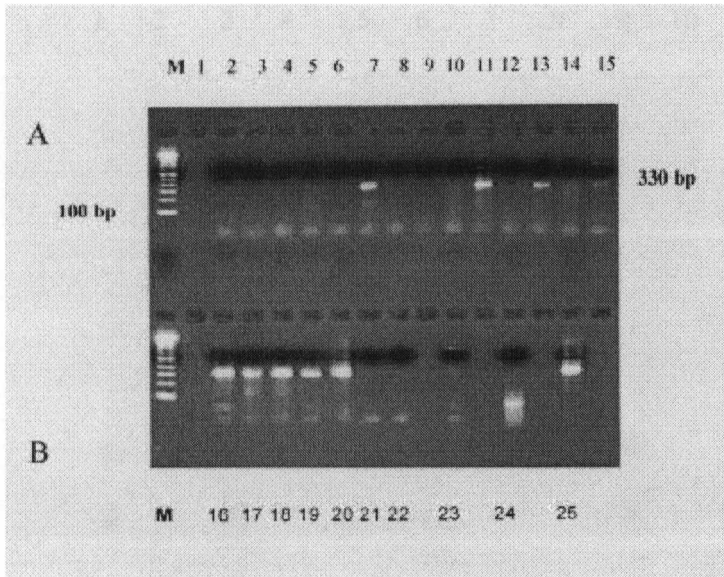


Figure 2 - k DNA Amplification: a: clone CI-Col-C2: samples 1 to 11 and clone CI-Col-C7: samples 12 to 14. b: Clone CI-Col-C7: samples 16 to 22 and Positive control (culture forms of *T. cruzi*): 25. Negative control (blood of normal mouse): 24. Negative control (ultra pure water without DNA samples): 23. M: marker ladder: 100 bp.

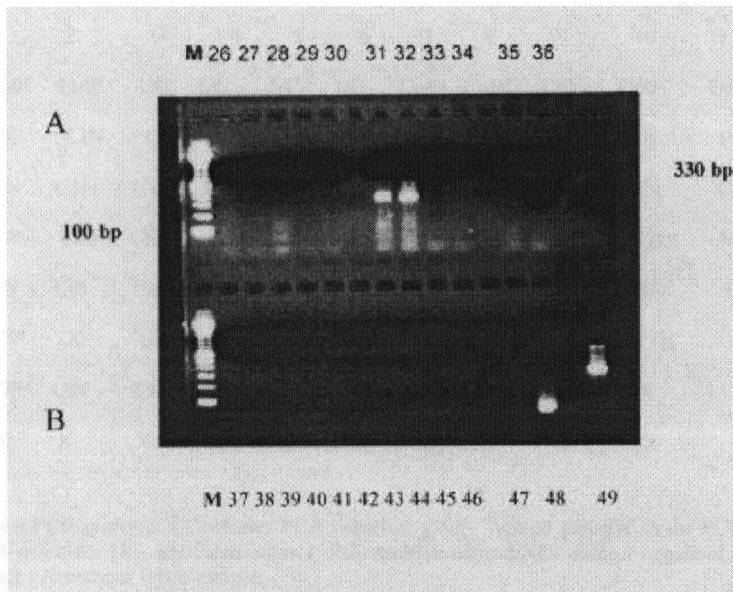
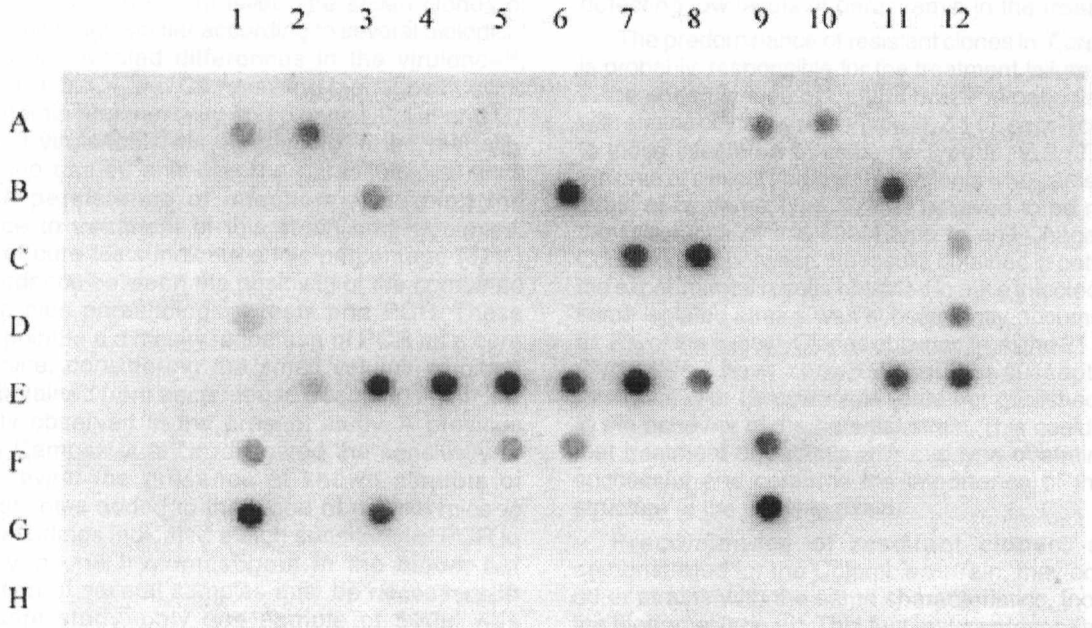


Figure 3 - k DNA amplification: a: clone CI-Col-C1 samples 26 to 30 and clone CI-Col-C3: samples 31 to 34 and clone CI-Col-C4: samples 35 and 36. b: clone CI-Col-C5: samples 37 to 46. Positive control (culture forms of *T. cruzi*): 49. Negative control (blood of normal mouse): 48. Negative control (ultra pure water without DNA samples): 47. M-marker ladder: 100 bp.



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	ColP	ColP	UC	UC	UC	UC	ColN	ColN	CIP	ColP	ColN	ColN
B	UC	CIN	CIP	CIN	CIN	CIP	CIN	CIN	H ₂ O	CN	PC	X
C	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	X	CIP	CIP	CIN	CIN	CIN	CIP
D	CIP	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	CIN	H ₂ O	NC	PC
E	CIN	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIP	CIN	CIN	CIP	CIP
F	CIP	X	CIN	CIN	CIP	CIP	CIN	CIN	CIP	CIN	CIN	CIN
G	CIP	CIN	CIP	X	H ₂ O	X	CN	X	PC	X	X	CIN
H	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X	X

Legends: CIP- clones PCR positive; CIN-clones PCR negative; ColP- Treated parental strain PCR positive; ColN: treated parental strain PCR negative; UC- untreated control; PC- positive control; NC- control negative(blood of normal mice); H₂O- ultre pure water ; X-without DNA sample;

Figure 4 -Hybridization by dot-blot technique with allele specific probe P67 from the conserved region within the minirepeats of *T. cruzi* k DNA minicircles. DNA samples from blood of infected mice, either with the parental *T. cruzi* strain or its clones; untreated or with benznidazole therapy, positive control (culture forms) and negative control.

infected mice has a clear effect on parasitemia, which decreases to a sub-patent level. The seven clones of this strain although similar according to several biological parameters, revealed differences in the virulence¹⁴, clones C1, C3, C4 and C6 revealing the highest levels of parasitemia and mortality and clones C2, C5 and C7 the lowest virulence. This is reflected in the mortality rates in the treated animals. The parasitological tests revealed persistence of infection confirming the resistance to treatment of this strain and its clones. Results of cure tests indicate a low percentage (37%) of concordance between the positivity of the combined serologic plus parasitological tests and PCR. These findings point to a difficulty in the use of PCR as a cure test in mice, considering the small volume of blood sample obtained from each mouse, resulting in the low sensitivity observed in the present study. A previous study by Campos et al¹⁷ investigated the sensitivity of PCR to reveal the presence of known aliquots of trypomastigotes added to the blood of normal mice *in vitro*. The findings indicated a high sensitivity of PCR to detect even one trypomastigote in the blood, but examination of several samples may be necessary. In the present study, only one sample of 500µl was examined for each mouse. Furthermore, in the other parasitological tests (subinoculation of blood into newborn mice, haemoculture or xenodiagnosis), parasite

multiplication occurs, increasing the possibilities of detecting low levels of parasitemia in the treated mice.

The predominance of resistant clones in *T. cruzi* strains is probably, responsible for the treatment failure, as seen in the endemic area of Central Brazil⁶ in patients infected with strains of the biodeme Type III, Z 1 (*T. cruzi* I) contrasted to those infected with biodeme Type II, Z 2 (*T. cruzi* II). Failures of clinical treatment of patients who carried *T. cruzi* strain of biodeme Type III, was believed to be related to the resistance of this strain type to anti-Chagas drugs. Concordance between the results obtained in patients and the experimental results obtained in mice infected with the same isolated strains was subsequently documented for 81.8% of the cases⁶. Clones obtained from the 21 SF strain (Type II)¹⁵, have shown a medium susceptibility to treatment with benznidazole (data not published) similar to the behavior of the parental strain. This could suggest that treatment of patients with this type of strain can be successful and confirms the importance of the clonal structure of the parasite strain.

Predominance of resistant clones, as now demonstrated for the Colombian strain, may occur with other strains with the same characteristics, included in the biodeme Type III⁴. This fact may represent a serious challenge to Chagas' disease control in endemic areas, where a high incidence of chronically infected patients is detected by serological or PCR tests^{1,29}.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to Mr. Brendan L. Flannery (University of California, Berkeley, CA, USA), for language review.

REFERENCES

- Andrade ALSS, Zicker F, Oliveira RM, Silva SA, Luquetti A, Travassos LR, Almeida IC, Andrade SS, Andrade JG. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *The Lancet* 348:1407-1413, 1996.
- Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:185-187, 1999.
- Andrade SG, Figueira RM. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga RO7-1051 na infecção por diferentes cepas do *T. cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 19: 335-341, 1977.
- Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and Zymodemes of *Trypanosoma cruzi*: correlations with clinical data and experimental pathology. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30: 27-35, 1997.
- Andrade SG, Magalhães JB, Pontes, AL Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin of the World Health Organization*, 63: 721-726, 1985.
- Andrade SG, Rassi A, Magalhães JB, Ferriolli Filho F, Luquetti AO. Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86: 624-626, 1992.
- Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Transaction of the Royal Society of Tropical medicine and Hygiene* 77: 796-799, 1983.
- Anonymous. Recommendations from a Satellite Meeting. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (supl 1): 429-432, 1999.
- Ávila HA, Borges -Pereira J, Thiemann O, De Paiva E, Degraive, W, Morel CM, Simpson L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology* 31:2421-2426, 1993.
- Ávila HA, Sigman DS, Cohen LM, Millikan RC, Simpson L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular Biochemistry Parasitology* 48:211-222, 1991.
- Britto C, Cardoso MA, Monteiro Vianni CM, Haslocher-Moreno A, Xavier, SS, Oelemann W, Santoro A, Pirmez C, Morel CM, Wincker P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology* 110: 241-247, 1995.
- Britto C, Cardoso MA, Ravel C, Santoro AA, Pereira JB, Coura JR, Morel CM, Wincker P. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and non radioactive hybridization. *Experimental Parasitology* 81: 462-471, 1995.

13. Britto C, Macedo V, Silveira C, Cardoso A, Marques P, Fernandes O. Potencial de aplicação da técnica de PCR na determinação de cura parasitológica em pacientes chagásicos crônicos submetidos a quimioterapia específica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 32 (supl II): 77-78, 1999.
14. Camandaroba ELP, Campos RF, Magalhães JB, Andrade, S.G. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (Biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 34: 151-157, 2001.
15. Campos RMF, Andrade SG. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91:795-800, 1996.
16. Campos RMF, Gonçalves MS, Reis EAG, Reis MG, Andrade SG. Comparative analysis by polymerase chain reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones: possibility of predominance of a principal clone in this area. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94: 23-29, 1999.
17. Campos RF, Magalhães JB, Reis EAG, Reis MG, Andrade SG. Sensitivity of the polymerase chain reaction for detection of known aliquots of *Trypanosoma cruzi* in the blood of mice: an *in vitro* study. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35: 487-490, 2002.
18. Dvorak JÁ. Single Cell Isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and Why? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18 (supl): 29-38, 1985.
19. Fragata Filho AA, Luquetti AO, Prata A, Rassi A, Gontijo ED, Ferreira HO, Cançado JR, Coura JR, Andrade SG, Macedo V, Amato Neto A, Oliveira Jr W, Brener Z. Etiological treatment for Chagas' disease. *Parasitology Today* 13:127-128, 1997.
20. Federici EE, Abelmann WB, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13: 272-280, 1964.
21. Filardi LS, Brener Z. Nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology* 176: 293-287, 1982.
22. Marretto JPM, Andrade SG. Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27: 209-215, 1994.
23. Miles MA, Lanham SM, Souza, AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74: 221-237, 1980.
24. Murta SMF, Romanha AJ. *In vivo* selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. *Parasitology* 116: 165-171, 1998.
25. Revollo S, Oury B, Laurent J-P, Barnabé C, Quesney V, Carrière V, Noël S, Tibayrenc M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. *Experimental Parasitology* 89: 30-39, 1998.
26. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural population of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Science of Unites States of America* 83:115-119, 1986.
27. Tibayrenc M, Brenière SF. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than zymodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83: 249-255, 1988.
28. Warren LG. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. *Journal of Parasitology* 46:529-539, 1960.
29. Wincker P, Britto C, Pereira JB, Cardoso A, Oelemann W, Morel CM. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural area. *The American Journal of Tropical Medicine Hygiene* 51:771-777, 1994.
30. World Health Organization. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series*, Geneva 81-95, 1991.

4 DISCUSSÃO

As diferenças que têm sido detectadas nas cepas do *T. cruzi* estão baseadas em caracteres intrínsecos, como a composição antigênica (ANDRADE et al., 1981), a suscetibilidade aos quimioterápicos (ANDRADE et al., 1975; BRENER et al., 1976), padrões isoenzimáticos (MILES et al., 1980, ANDRADE et al., 1983; TIBAYRENC & AYALA, 1988), no perfil genômico do kDNA (MOREL et al., 1980; ÁVILA et al., 1990). Entretanto foi o estudo das relações parasito-hospedeiro que permitiu identificar claras diferenças no determinismo das lesões tissulares, na dependência do tropismo, virulência e patogenicidade das cepas do *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1970; ANDRADE, 1974; ANDRADE & ANDRADE, 1976; ANDRADE et al., 1985b). Estes achados permitiram classificar as cepas em tipos distintos, posteriormente designadas como biotemas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997). A partir dos estudos de TIBAYRENC & AYALA (1988), foi sugerida uma estrutura clonal para as cepas do *T. cruzi*, baseada na existência de linhas clonais, pela análise eletroforética multiloci de 15 genes que codificam as isoenzimas (MLEE) de 121 cepas de diferentes áreas geográficas. De acordo com estes autores, as cepas do *T. cruzi* são clones naturais e uma seleção natural, favorecendo apenas alguns padrões genéticos de combinação seria responsável pela existência de um número limitado de cepas que seriam os “*major clones*” ou “*clones principais*” (TIBAYRENC & BRENIÉRE, 1988). Baseados neste conceito, diferentes autores têm procurado correlacionar o comportamento biológico de cepas com os padrões filogenéticos. Os estudos sobre as distâncias genéticas entre os clones, quando correlacionadas com diferentes

parâmetros biológicos (REVOLLO et al., 1998) confirmaram as correlações bioquímicas estabelecidas por ANDRADE et al. (1983) através do estudo isoenzimático. Também a correlação da resposta aos quimioterápicos com os padrões moleculares das cepas e clones foi confirmado por TOLEDO et al. (2002).

O interesse na caracterização de clones de cepas protótipos de diferentes biodemas, reside na possibilidade de se identificar a sua homogeneidade ou heterogeneidade clonal e na identificação de caracteres genéticos capazes de serem correlacionados com os diferentes aspectos clínicos, epidemiológicos e a resposta aos quimioterápicos.

No presente estudo procurou-se estabelecer os caracteres genéticos, dos clones da cepa protótipo do biodema Tipo III: cepa Colombiana.

Sete clones da cepa Colombiana, isolados aos 30 dias de infecção, quando a parasitemia atinge o seu pico máximo, e investigados quanto aos aspectos biológicos, bioquímicos e isoenzimáticos, com o objetivo de caracterizar as suas populações e estabelecer a homogeneidade ou heterogeneidade das mesmas (CAMANDARROBA et al., 2001) mostraram as características básicas do biodema Tipo III, embora com variações quanto à virulência, correlacionada com os níveis parasitêmicos e os índices de mortalidade. Os dados obtidos na caracterização dos clones isolados no 30^o dia de infecção (CAMANDARROBA et al., 2001), permitiram sugerir a homogeneidade clonal com a predominância de um clone principal na cepa Colombiana do *T. cruzi*. Cada clone representa uma unidade reprodutiva para as gerações que o sucedem, devido à sua reprodução por divisão binária, com ausência de trocas genéticas (TIBAYRENC & AYALA, 1988) ou com mínimas possibilidades desta ocorrência, como registrado por BOGLIOLO et al. (1996). A identificação da

homogeneidade ou heterogeneidade clonal, bem como a identificação dos caracteres genéticos e sua correlação com os caracteres biológicos, são importantes para a compreensão do papel das cepas do *T. cruzi* e da sua influência sobre as manifestações clínicas da doença de Chagas.

No presente estudo, além dos clones isolados no 30^o dia, outros foram isolados em uma fase precoce da infecção (10^o dia), tendo em vista a possibilidade de que, a presença de uma maior multiplicação parasitária de alguns clones nesta fase, com picos mais precoces de parasitemia e apresentando um número significativo de formas delgadas. Isto poderia significar uma maior suscetibilidade aos quimioterápicos e/ou diferenças genéticas em relação aos clones isolados mais tardiamente, numa fase em que predominam as formas largas. Juntamente com os clones obtidos no 30^o dia, os isolados no 10^o dia foram submetidos à caracterização genética, utilizando-se a técnica do RFLP e estes dados foram correlacionados com o comportamento biológico. Deste modo, procurouse verificar se clones isolados em diferentes fases da infecção apresentariam variações quanto ao comportamento biológico de um modo geral e, particularmente, quanto ao histotropismo clonal. Os caracteres biológicos e bioquímicos semelhantes foram confirmados pelo padrão dos esquizodemas obtidos em todos os clones que foram isolados no 10^o e no 30^o dia de infecção (Manuscrito incluído).

Além disto, foi investigada a resposta ao quimioterápico Benzonidazol, como mais um elemento para identificar possíveis diferenças em clones isolados em fase precoce da infecção em comparação com a cepa parental.

Foi demonstrado que os clones isolados no 10^o dia de infecção apresentam as características biológicas e isoenzimáticas do biotipo Tipo III, bem como o mesmo

padrão genético. É interessante observar que houve nítida variação da virulência entre os clones, tanto nos isolados aos 30 como aos 10 dias de infecção. Entretanto, o fator virulência, aumentando a mortalidade e determinando em alguns casos, picos precoces de parasitemia e presença de formas delgadas, não foram suficiente para alterar os caracteres gerais do biotipo, nem os caracteres bioquímicos e moleculares. Como já foi referido, o fator virulência é variável e não deve ser considerado como suficiente para diferenciar cepas ou clones. Além disto, fatores ligados ao hospedeiro poderão condicionar a exaltação da virulência de patógenos, como ocorre em pacientes imunossuprimidos (aidéticos ou transplantados em uso de imunossupressores) em que se observa uma reativação da doença de Chagas crônica assintomática, com proliferação parasitária e desenvolvimento de uma forma aguda da doença (ROCHA et al., 1994; FERREIRA, 1994). Também no modelo experimental foi demonstrada exaltação da virulência da cepa Colombiana, quando os camundongos foram imunossuprimidos com corticoide ou por bloqueio de células do sistema fagocítico mononuclear, por injeções intra-peritoneais de tinta da China (ANDRADE et al., 1972).

No presente estudo, a cepa Colombiana parental adquiriu nas passagens em laboratório, uma maior virulência quando comparada com os estudos iniciais, porém manteve as demais características deste biotipo. Os seus clones mantiveram os caracteres básicos quando se consideram o tropismo tissular e a patogenicidade, a predominância de formas largas, a resistência aos quimioterápicos, além das características isoenzimáticas e genéticas. A presença de populações clonais pertencentes a um mesmo clone principal, porém variando no grau de virulência, pode explicar as variações de virulência de uma mesma cepa. Os perfis

isoenzimáticos dos diversos clones estudados representam o padrão do zimodema 1 (Z1) para a cepa parental e os clones isolados no 10º dia, semelhante ao observado com os clones isolados no 30º dia de infecção.

Os 12 clones da cepa Colombiana, isolados em duas fases diferentes da infecção e a cepa parental apresentaram o mesmo padrão molecular, isto é, o mesmo esquizodema. Os achados do presente estudo confirmam a hipótese de que um clone principal (ANDRADE, 1999; CAMANDAROBÁ et al., 2001) predomina na cepa Colombiana, através da sua caracterização genética.

Esta homologia clonal foi anteriormente observada por CAMPOS et al. (1999) analisando clones e subclones isolados da cepa 21SF (São Felipe-Bahia) obtendo um índice de similaridade de 80 a 100% nos fragmentos de kDNA sugerindo a presença de um clone principal em circulação na área endêmica do Recôncavo Bahiano (São Felipe, BA) (CAMPOS & ANDRADE, 1996). Isto explicaria a estabilidade dos caracteres biológicos e isoenzimáticos de cepas desta área (todas incluídas em um mesmo biodema Tipo II).

A cepa Colombiana representa cepas de alta patogenicidade e alta resistência aos quimioterápicos. Estas mesmas características foram demonstradas para as cepas isoladas de pacientes chagásicos de Montalvânia, MG, as quais foram incluídas no biodema Tipo III. Estas cepas mostraram alta resistência aos quimioterápicos quando inoculadas em camundongos, com resultado comparável ao que foi detectado nos pacientes tratados com benzonidazol (ANDRADE et al., 1992).

Considerando os vários resultados acima descritos, aspectos particulares foram investigados tais como o histotropismo clonal e a resposta aos quimioterápicos.

Os clones mantiveram o tropismo predominante para músculo esquelético e miocárdio, como o observado para a cepa parental, e alta patogenicidade, determinando no camundongo, extensas lesões necrótico-inflamatórias. Este histotropismo, predominante em miocárdio e músculo esquelético, tem sido uma característica de cepas do biotipo Tipo III, mas isto não significa a presença exclusiva dos parasitos em um único órgão ou tecido. O tropismo predominante de um biotipo é mantido, independentemente da linhagem do camundongo como foi observado com a cepa Colombiana inoculada em seis diferentes linhagens de camundongos isogênicos (ANDRADE et al., 1985b). A presença de parasitos em outros tecidos, porém de maneira discreta, tem sido registrada, como em músculo liso da parede intestinal, macrófagos de baço e do fígado, células gliais do cérebro e plexo de Auerbach no intestino.

Um aspecto, investigado no presente trabalho, diz respeito ao "modelo histotrópico clonal" do *T. cruzi*, cujas bases foram propostas por MACEDO & PENA (1998), segundo as quais, cada clone constituinte de uma cepa se destina a um determinado tecido, de uma maneira restritiva. O tropismo diferencial de cepas e clones foi estudado pelos referidos autores em animais experimentais usando a técnica do "low stringence single specific primer" (LSSP-PCR) (MACEDO & PENA, 1998, ANDRADE L. et al., 1999, 2002). Estes estudos, entretanto, não foram confirmados na presente investigação, tendo sido demonstrado que os clones isolados da cepa Colombiana (CAMANDARROBA et al., manuscrito incluído), mostraram um tropismo ubiqüitário para vários órgãos e tecidos. Os estudos iniciais de VAGO et al. (1996a,b, 2000), em material de necropsia de casos humanos da doença de Chagas, demonstraram a possibilidade de se identificar diretamente nos

tecidos (coração e tubo digestivo) a presença de formas do *T. cruzi* geneticamente diferentes, pela técnica de LSSP-PCR. Utilizando esta técnica, sugerem que o tropismo excludente dos diferentes clones poderia explicar diferentes manifestações da doença de Chagas. Entretanto, nos casos humanos de áreas endêmicas, os autores (VAGO et al. 1996 a, b) não puderam descartar a possibilidade de dupla infecção com diferentes cepas, considerando-se a possibilidade de re-infecções (MACEDO, 1976), conforme comprovado experimentalmente (ANDRADE & ANDRADE, 1968; DEANE et al., 1984), o que poderia levar ao isolamento de cepas com diferentes padrões genéticos em um mesmo hospedeiro.

O isolamento por meio de micromanipulação, de uma forma única do parasito, o qual se multiplica por injeção em camundongo recém-nascido constituindo-se em um clone, permite afirmar que a população de um mesmo clone pode se distribuir por diferentes órgãos e tecidos o que vem a demonstrar que a sua distribuição é ubiqüitária e não restritiva. Estes achados são contrários ao “Modelo clonal histotrópico”.

A resposta aos quimioterápicos nitrofurânicos e nitroimidazólicos em uso clínico tem mostrado resultados irregulares, com variações geográficas nos índices de cura, como revisto por COURA & CASTRO (2002). Estas diferenças têm sido atribuídas as diferentes cepas do *T. cruzi*. A caracterização experimental de cepas mais ou menos resistentes, (ANDRADE et al., 1975, 1985; FILARDI & BRENER, 1982) tem contribuído para a melhor compreensão do fator resistência à quimioterapia.

As cepas de biodema Tipo III, têm sido caracterizadas como altamente resistentes aos quimioterápicos nifurtimox e benzonidazol. Entretanto, quando os

animais infectados são submetidos ao tratamento, há, entre 48 e 72 horas, um nítido efeito do medicamento, com uma queda em crise da curva parasitêmica, atingindo níveis subpatentes. Isto poderia indicar a presença de alguns clones que responderiam ao medicamento e daí a queda inicial da parasitemia. Entretanto, os testes parasitológicos (hemocultura diagnóstica, xenodiagnóstico, subinoculação), revelam a persistência da infecção confirmando a alta resistência da cepa e dos clones ao tratamento.

No presente trabalho, CAMANDARоба et al. (2003) (manuscrito incluído), investigando a resposta ao benzonidazol de sete clones da cepa Colombiana do *T. cruzi*, isolados na fase avançada da infecção, demonstraram que os índices de cura variaram de 0 a 16.7% entre a cepa parental e os seus clones, indicando a alta resistência dos clones ao quimioterápico. O índice de cura de 16.7% obtido para o clone CI-Col-C3 foi similar ao obtido para a cepa Colombiana do *T. cruzi* em estudos anteriormente realizados por ANDRADE et al. (1985). Isto sugere que o clone CI-Col-C3 apresenta o mesmo grau de suscetibilidade da cepa parental. Quando os clones foram isolados na fase precoce da infecção (CI-Col-C8, CI-COL-C10, C-COL-C13, CI-COL-C14, CI-Col-C15), inoculados em camundongos e submetidos ao tratamento com Benzonidazol, houve um aumento discreto da susceptibilidade com os índices de cura variando de 0% a 36,3% entre a cepa e os clones (CAMANDARоба et al., manuscrito em preparação).

Neste trabalho, além dos testes de cura convencionais (subinoculação do sangue em camundongos recém-nascidos, hemocultura e teste sorológico de imunofluorescência indireta), foi também realizada a PCR para a avaliação de cura dos animais tratados. Foi detectada uma baixa percentagem (37%), de concordância

entre os testes parasitológicos convencionais, e a PCR com predominância de positividade dos testes convencionais.

Tendo em vista a alta sensibilidade da PCR para a detecção de número mínimo de parasitos, a explicação para o baixo índice de concordância encontrado reside, provavelmente, na ausência de formas parasitárias nas amostras que representam uma fração (500 μ l) do sangue coletado de cada animal tratado e com parasitemia direta negativa. Em estudo anterior deste laboratório (CAMPOS et al., 2002), em que se investigou a sensibilidade da PCR para detectar formas tripomastigotas, usando alíquotas conhecidas, contendo 1 a 50 parasitos, colocados em amostras de 500 μ l de sangue de camundongo normal, a PCR revelou produtos de 330 pares de base nos controles positivos e nas amostras contendo 3 a 50 tripomastigotas. Quando apenas uma amostra contendo 1 ou 2 tripomastigotas foi examinada, os resultados foram negativos. Entretanto nos experimentos em que 10 amostras contendo 1 parasito e 10 amostras contendo 2 parasitos foram examinadas, 9/10 amostras foram positivas, confirmando a alta sensibilidade da reação, porém com a necessidade de sua repetição. Deste modo, no presente trabalho, o exame de uma única amostra de cada animal, mostrou baixo índice de positividade. A alta sensibilidade dos testes parasitológicos convencionais (62,5% a 100%) deve-se ao fato destes testes permitirem a multiplicação dos raros parasitos possivelmente presentes, quer seja pela inoculação no camundongo recém-nascido, no meio de cultura ou no triatomineo (nos casos em que o xenodiagnóstico é também realizado). Experimentalmente, VARGAS et al. (1996), testando diferentes diluições de sangue de camundongos infectados determinaram a positividade da

PCR pela identificação de fragmentos de 270 pares de bases, até a diluição de 1×10^2 parasita/mL, porém não deixa claro qual o número de parasitos em cada amostra nem informa o número de amostras examinadas para a obtenção destes resultados. O teste da PCR tem sido utilizado para o diagnóstico da doença de Chagas em áreas endêmicas ou como critério de cura. Nem sempre há concordância entre os resultados obtidos com o xenodiagnóstico e a sorologia, quando comparados a PCR. JUNQUEIRA et al. (1996), ao analisarem 60 pacientes chagásicos comparando os testes parasitológicos e a PCR observaram que quatro casos apresentaram xenodiagnóstico positivo e PCR negativo. BRITTO et al. (2001) ao compararem os índices de cura de 85 pacientes com doença de Chagas, verificaram que os pacientes na fase aguda da infecção apresentaram 86% de xenodiagnóstico negativo e PCR positiva em 5/32. O resultado de 83% para o xenodiagnóstico negativo foi verificado nos pacientes na fase crônica indeterminada e PCR positiva em 9/40. O grupo placebo apresentou 36% de PCR positiva. Quando os resultados da PCR foram comparados com o xenodiagnóstico em três estados brasileiros, em pacientes com sorologia positiva, foram observados diferentes índices de positividade. O xenodiagnóstico apresentou positividade de 24,5% (Minas Gerais), 13% (Paraíba) e 34% (Piauí). A PCR apresentou positividade de 96,5% (Minas Gerais), 44,7% (Paraíba) e 59,4% (Piauí). No Estado do Amazonas, xenodiagnóstico e PCR revelaram a positividade de 2,4% e 10%, respectivamente, sugerindo um baixo nível de parasitemia nesta região (BRITTO et al., 1999).

No animal experimental, em que são feitas triagens de drogas os testes de cura têm papel relevante. São realizados individualmente, utilizando-se vários testes parasitológicos e sorológicos. Seria do máximo interesse que se pudesse contar

com a reação da PCR nos laboratórios que pesquisam a eficácia de drogas contra o *T. cruzi*. Entretanto, algumas peculiaridades dos experimentos realizados em animais, fazem com que seja necessária uma validação dos testes usualmente aplicados em humanos, para o seu uso nas avaliações feitas em camundongos. Os resultados de triagens de drogas em camundongos devem ser realizados individualmente e daí as dificuldades já discutidas, quanto ao volume de sangue disponível.

Um outro aspecto de relevância refere-se ao número de reações da PCR requeridas para a positivação. Como foi referido anteriormente, em estudos realizados por ARAÚJO et al. (2002) com cães infectados com a cepa Berenice (Be-62 e Be-78) do *T. cruzi* após 5-12 anos foi verificado a baixa sensibilidade da PCR quando foi feita apenas uma reação. A positividade da PCR alcançou 67 a 100% com no mínimo duas amostras de sangue e em nove reações da PCR repetidas da mesma amostra. Vale ressaltar ainda que em alguns casos como dos cães 1, 2 e 6 a positividade somente foi observada após 5 e 6 extrações de DNA.

Os estudos ultraestruturais realizados por ANDRADE & FREITAS (1987) em miocélulas cardíacas de camundongos infectados com cepas de biodema Tipo III e tratados com o nifurtimox, observaram intensas alterações das amastigotas, com vacuolização do citoplasma, tumefação mitocondrial e enrugamento da membrana e lesões das miocélulas cardíacas em torno dos parasitos desintegrados. No tratamento com nifurtimox ou com o benzonidazol os ninhos parasitários ainda remanescentes continuam a sofrer ruptura e as formas amastigotas resistentes que escapam da ação da droga, transformam-se em tripomastigotas e são lançadas na corrente sangüínea sendo detectadas nos testes parasitológicos, no xenodiagnóstico

e na subinoculação em camundongos recém-nascidos. No teste do xenodiagnóstico com cinco ninfas de triatomíneos observou-se que apenas 1 ou 2 ninfas apresentaram positividade para *T. cruzi*, em razão do número reduzido de parasitos circulantes.

Muitas vezes, foi observado xenodiagnóstico negativo no camundongo, porém com títulos de anticorpos positivos anti-*T. cruzi*. Apesar da importância das reações sorológicas como testes de cura tem que levar em conta que este teste pode permanecer positivo mesmo em animais curados, o que pode ser explicado pela persistência de antígenos parasitários como demonstrado por ANDRADE et al. (1991). Estes autores demonstraram em camundongos infectados com cepas do biotipo Tipo II e parasitologicamente curados que há persistência dos antígenos parasitários do *T. cruzi* seqüestrados pelas células dendríticas foliculares do baço mantendo a memória imunológica.

A predominância de clones resistentes em uma cepa do *T. cruzi* é provavelmente responsável, pela falha do tratamento de pacientes chagásicos, como visto em áreas endêmicas da região Central do Brasil (ANDRADE et al. 1992) em pacientes infectados com cepas de biotipo Tipo III, Z1 (*T. cruzi* I) contrastando com aqueles infectados com cepas do biotipo Tipo II, Z2 (*T. cruzi* II). Neste trabalho (ANDRADE et al. 1992) falhas no tratamento clínico de pacientes que são infectados com cepas de biotipos Tipo III, foram relacionadas à resistência desse tipo de cepa às drogas antichagásicas. Vale ressaltar a concordância entre os resultados do tratamento de pacientes chagásicos na área endêmica de Montalvânia-MG, e de cepas deles isolados e inoculadas em camundongos, cuja correlação foi de 81,8% (ANDRADE et al., 1992).

Outras cepas com as mesmas características, incluídas no biodema Tipo III apresentam também elevado grau de resistência. Este fato poderá representar um sério desafio para o controle da doença de Chagas nas áreas endêmicas, onde há uma alta incidência de pacientes cronicamente infectados detectados pelos testes sorológicos e por PCR (ANDRADE, et al., 1996; WINCHER et al., 1994).

Embora se tenha detectado um índice de cura ligeiramente mais elevado nos animais infectados com os clones isolados no 10^o dia de infecção, a um nível de 36,3%, (manuscrito em preparação), este é ainda considerado um índice muito baixo de cura, confirmando a alta resistência dos clones da cepa Colombiana.

Os resultados obtidos demonstram a correlação entre as características genéticas e a resposta aos quimioterápicos, levando-se em conta a homogeneidade clonal desta cepa e a sua correlação com a uniformidade da resposta ao tratamento. Considerando os dois genótipos principais: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, TOLEDO et al. (2003), verificaram a alta resistência dos clones incluídos no grupo *T. cruzi* I do qual fazem parte à cepa Colombiana e seus clones.

Estes dados estão também coerentes com o modelo clonal postulado para o *T. cruzi* por TIBAYRENC & AYALA (1988), que prevêem uma correlação entre as divergências dos genótipos clonais do *T. cruzi* e suas propriedades biológicas inclusive a resposta aos quimioterápicos.

5 CONCLUSÕES

1) A caracterização biológica e bioquímica dos clones isolados no 10^o dia de infecção mostrou uma homogeneidade entre os mesmos, correspondendo a uma similaridade com a cepa parental, idêntica ao observado com os clones isolados no 30^o dia de infecção.

2) A caracterização dos esquizodemas por meio da PCR-RFLP de 14 clones isolados da cepa Colombiana, protótipo do Biodema Tipo III (*T. cruzi* I) no 10^o e no 30^o dias de infecção, demonstrou uma homogeneidade clonal e a identidade entre os clones e a cepa parental.

3) O histotropismo da cepa Colombiana e dos clones foi demonstrado em diferentes órgãos e tecidos, sendo ubiqüitário e não restritivo, com parasitismo predominante em músculo esquelético e miocárdio, não se comprovando o tropismo de um clone para um só tipo de célula.

4) A resposta terapêutica ao Benzonidazol, dos clones isolados no 30^o dia de infecção foi semelhante à da cepa parental e confirmou a alta resistência da cepa Colombiana e dos seus clones ao tratamento quimioterápico, variando os índices de cura de 0 a 16,7% e de 0% a 36,3% entre a cepa e os clones isolados no 10^o dia de infecção.

6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABUIN, G.; FREITAS-JÚNIOR, L. H. G.; WALTER, C.; ALVES, M. J. A.; SCHENKMAN, S. Expression of trans-sialidase and 85-kDa glycoprotein genes in *Trypanosoma cruzi* is differentially regulated at the post-transcriptional level by labile protein factors. **J. Biol. Chem.**, **274**:13041-13047, 1999.

ACOSTA-SERRANO, A.; ALMEIDA, I. C.; FREITAS-JUNIOR, L. H.; YOSHIDA, N.; SCHENKMAN. The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **114**:143-150, 2001.

ALVES, A. M. B.; TANURI, A.; ALMEIDA, D. F.; VON KRÜGER, W. M. A. Reversible changes in the isoenzyme electrophoretic mobility pattern and infectivity in Clones of *Trypanosoma cruzi*. **Exp. Parasitol.**, **77**:246-253, 1993.

ANDRADE, A. L. S.; ZICKER, F.; OLIVEIRA, R. M.; SILVA, S. A.; LUQUETTI, A. T.; ALMEIDA, I. C.; ANDRADE, S. S.; ANDRADE, J.; MARTELLI, C. M. T. Randomised trial of efficacy of Benznidazole in treatment early *Trypanosoma cruzi* infection. **Lancet**, **348**:1407-1413, 1996.

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

_____. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp. Parasitol.**, **100**:269-275, 2002.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo o Baiano. **Rev. Patol. Trop.**, **3**:165-121, 1974.

_____. Morphological and behavioral characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**:39-46, 1985. Suplemento.

_____. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **85**:17-27, 1990.

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

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F. D.; BARRAL-NETTO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **23**:245-250, 1981.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. Estudo histopatológico comparativo das lesões produzidas por duas cepas de *Trypanosoma cruzi*. **O Hospital**, **70**:1268 -1278, 1966.

_____. A. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. **Rev. Inst. Med. São Paulo**, **10**:180-187, 1968.

_____. Aspectos anátomo-patológicos e resposta terapêutica na infecção chagásica crônica experimental. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **18**:268 -275, 1976.

ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. ; ANDRADE, Z. A. Recuperação e caracterização de *Trypanosomas* inoculados em animais imunes (Reinoculação com diferentes cepas do *T. cruzi*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **12**:395-402, 1970a.

ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Med. Ba.**, **70**:32-42, 1970b.

ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga RO-1051 na infecção por diferentes cepas do *T. cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **19**:335-341, 1977.

ANDRADE S. G.; FIGUEIRA, R. M.; ANDRADE, Z. A. Influência de infecções repetidas no quadro histopatológico de doença de Chagas experimental. **Gaz. Med. Bahia**, **68**:115-123, 1968.

ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; CARVALHO, M. L.; GORINI, D. F. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica e experimental pelo Bay 2502. Resultados de tratamento a longo prazo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **17**:380-389, 1975.

ANDRADE, S. G.; FREITAS, L. A. R. *Trypanosoma cruzi*: cardiac myocells alterations due to spontaneous or therapeutically induced intracelular parasite desintegracion. **Cell. Mol. Biol.**, **33**:797-805, 1987.

ANDRADE, S. G.; FREITAS, L. A. R.; PEYROL, S.; PIMENTEL, A. R.; SADIGURSKY, M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. **Bull. World Health Org.**, **69**:191-197, 1991.

ANDRADE, S. G.; GRIMAUD, J. A. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* - an ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **81**:29-41, 1986.

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.**, **30**:27-35, 1997.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with Benznidazole and Nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull. World Health Org.**, **63**:721-726, 1985a.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L. Terapêutica da fase crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* com o Benzonidazol e o Nifurtimox. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **22**:113-118, 1989.

ANDRADE, S. G.; RASSI, A.; MAGALHAES, J. B.; FERRIOLLI FILHO, F.; LUQUETTI, A. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **86**:624-626, 1992.

ANDRADE, S. G.; SILVA, A. A.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. Comportamento de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros com baixa resistência. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.**, **14**:154-161, 1972.

ANDRADE, S. G.; SILVA, R. C.; SANTIAGO, C. M. G.; FREITAS, L. A. R. Therapeutic action of MK-436 (2,5-nitroimidazole) on *Trypanosoma cruzi* infections in mice: a parasitological, serological, histopathological and ultrastructural study. **Bull. World Health Org.**, **65**:625-633, 1987.

ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M.; ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **18**:499-506, 1985b.

ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S. G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **77**:796 -799, 1983.

ANDREWS, N. W. From lysosomes into the cytosol:the intracellular pathway of *Trypanosoma cruzi*. **J. Med. Biol. Res.**, **27**:471-475, 1994.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:29-432, 1999. Suplemento.

APARÍCIO, I. M.; SCHARFSTEIN, J.; LIMA, A. P. C. A. A new cruzipain-mediated pathway of human cell invasion by *Trypanosoma cruzi* require tripomastigote membranes. **Infect. Immun.**, **72**: 5892-5902, 2004.

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.**, **81**:21-31, 2002.

ATAYDE, V. D.; NEIRA, I.; CORTEZ, M.; FERREIRA, D.; FREYMULLER, E.; YOSHIDA, N. Molecular basis of non-virulence of *Trypanosoma cruzi* clone CL-14. **Int. J. Parasitol.**, **34**:851-860, 2004.

AVILA, H. A.; BORGES-PEREIRA, J.; THIEMANN, O.; de PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. M.; SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimes of chronic chagasic patients by polimerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: comparison with serology and xenodiagnostic. **J. Clin. Microbiol.**, **31**:2421-2426, 1993.

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

AVILA, H. A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M.; LILLIKAN, 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.**, **48**:211-222, 1991.

BARNABÉ, C.; BRISSE, S.; TIBAYRENC, M. Population structure and genetic typing of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: a multilocus enzyme electrophoresis approach. **Parasitol.**, **120**:513-526, 2000.

BARNABÉ, C.; NEUBAUER, K.; SOLARI, A.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: presence of the two major phylogenetic lineages and of several lesser discrete typing units (DTUs) in Chile and Paraguay. **Acta Trop.**, **78**:127-137, 2001a.

BARNABÉ, C.; YAEGER, R.; PUNG, O.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: A considerable phylogenetic divergence indicates that the agent of Chagas disease is indigenous to the native fauna of the United States. **Exp. Parasitol.**, **99**:73-79, 2001b.

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

BARRETT T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G.; TEIXEIRA, R.; ALMEIDA de SOUZA, J. A.; SHERLOCK, I. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia state, Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **74**:84-90, 1980.

BASOMBRÍO, M. A.; GÓMEZ, L.; PADILLA, A. M.; CIACCIO, M.; NOZAKI, T.; CROSS, G. A. M. Targeted deletion of the GP72 gene decreases the infectivity of *Trypanosoma cruzi* for mice and insect vectors. **J. Parasitol.**, **88**:489-493, 2002.

BASTRENTA, B.; BOSSENO, M. F.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; BRENIÈRE, S. F. Restriction fragment length polymorphism of 195 bp repeated satellite DNA of *Trypanosoma cruzi* supports the existence of two phylogenetic groups. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:323-328, 1999.

BOGLIOLO, A. R.; LANHAM, S. M.; CORREDOR, A. Further enzyme polymorphism in *Trypanosoma cruzi* from Colombia. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **18**: 427-433, 1985.
BOGLIOLO, A. R.; LAURIA-PIRES, L.; GIBSON, W.C. Polymorphisms in *Trypanosoma cruzi*: evidence of genetic recombination. **Acta Trop.**, **61**:31-40, 1996.

BONGERTS, V.; DVORAK, J. A. *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**:716-722, 1983.

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

_____. The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **63**:215-220, 1969.

_____. Intraespecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct features. **PAHO**, **347**:11-21, 1977.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **5**:220-224, 1963.

BRENER, Z.; CHIARI, E.; ALVARENGA, N. J. Observations on *Trypanosoma cruzi* strain maintained over an eight year period in experimentally inoculated mice. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **16**:39-46, 1974.

BRENER, Z.; COSTA C. A. G.; CHIARI, E.. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* to chemotherapeutic agents. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **18**:450-455, 1976.

BRENIERE, S. F.; BARNABE, C.; BOSSENO, M. F.; TIBAYRENC, M. Impact of number of isoenzyme loci on the robustness of intraspecific phylogenies using multilocus enzyme electrophoresis: consequences for typing of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, **127**:273-281, 2003.

BRISSE, S.; CHRISTIAN, B.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **Int. J. Parasitol.**, **30**:35-44, 2000a.

BRISSE, S.; DUJARDIN, J.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **111**:95-105, 2000b.

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

BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; MARQUES, P; FERNANDES, O, MOREL, C.M. Polymerase chain reaction detection: New insights into the diagnosis of chronic Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **94**:305-306, 1999a.

BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; RAVEL, C.; SANTORO, A. A.; PEREIRA, J. B.; COURA, J. R.; MOREL, C. M.; WINCKER, P. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and non radioactive hybridization. **Exp. Parasitol.**, **81**:462-471, 1995.

BRITTO, C.; MACEDO, V.; SILVEIRA, C. C. A.; MARQUES, P. F. O. Potencial de aplicação da técnica de PCR na determinação de cura parasitológica em pacientes chagásicos crônicos submetidos à quimioterapia específica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **32**:77-78, 1999b. Suplemento II.

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

BRUMPT, E.; SILVA, P. Existence du "*Schizotrypanum cruzi*" Chagas, 1909, à Bahia (Matta de São João). Biologie du "*Conorrhinus megistus*". **Bull. Soc. Pathol. Exot.**, **5**:22, 1912.

BUSCAGLIA, C. A.; DI NOIA, J. M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chaga's disease. **Microb. Infect.**, **5**: 419-427, 2003.

CALVET, C. M.; MEUSER, M.; ALMEIDA, D.; MEIRELLES, M. N. L.; PEREIRA, M. C. S. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocitos interaction: role of fibronectin in the recognition processo and extracelluar matrix expression in vitro and in vivo. **Exp. Parasitol.**, **107**:20-30, 2004.

CAMANDAROBA, E. L. P.; CAMPOS, R. F.; MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **34**:151-157, 2001.

CAMANDAROBA, E. L. P.; REIS, E. A. G.; GONÇALVES, M. S.; REIS, M. G.; ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: Susceptibility to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the hight resistant Colombian strain. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **36**:1-9, 2003.

CAMARGO, M.E. Fluorescent antibody test for serodiagnostic of American Trypanosomiasis. Tecnicl modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **8**:227-234, 1966.

CAMPOS, R. F.; ANDRADE, S. G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **91**:795-800, 1996.

CAMPOS, R.F.; GONÇALVES, M. S.; REIS, E. A. G. REIS, M. G.; ANDRADE, S. G. Comparative analysis by Polymerase Chain Reation amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones:possibility of predominance of a principal clone in this area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **94**:23-29, 1999.

CAMPOS, R. F.; GUERREIRO, M. L. S.; SOBRAL, K. de S. C.; LIMA, R. de C. P. C; ANDRADE, S. G. Response to chemotherapy with Benznidazole of clones isolated from the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biodeme Type II, *Trpanosoma cruzi* II). **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **38**:142-146, 2005.

CAMPOS, R. F.; MAGALHÃES, J. B.; REIS, E. A. G.; REIS, M. G.; ANDRADE, S. G. Sensitivity of the Polymerase Chain Reaction for detection of known aliquots of *Trypanosoma cruzi* in the blood of mice *in vitro* study. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**:487-490, 2002.

CANO, M. I.; GRUBER, A.; VAZQUEZ, M.; CORTÉS, A.; LEVIN, M. J.; GONZÁLEZ, A.; DEGRAVE, W.; RONDINELLI, E.; ZINGALES, B.; RAMIREZ, J. L.; ALONSO, C.; REQUENA, J. M.; SILVEIRA, J. F. Molecular karyotype of clone CL Brener chosen for the *Trypanosoma cruzi* genome project. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **71**:273-278, 1995.

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.**, **47**:35-45, 1990.

CHAGAS, C. Nova espécie mórbida do homem, produzida por um *Trypanosoma* (*Trypanosoma cruzi*) Nota prévia. **Braz. Méd.**, **16**:1909a.

_____. 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**, **1**:159-228, 1909b.

_____. Revisão do ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi*. **Braz. Med.**, **23**:235, 1913.

CORTEZ, M.; NEIRA, I.; FERREIRA, D.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; ATAYDE, V. D.; YOSHIDA, N. Infection by *Trypanosoma cruzi* metacyclic forms deficient in gp82 but expressing a related surface molecule, gp30. **Infect. Immun.**, **71**:6184-6191, 2003.

COURA, J. R.; de CASTRO, S. L. A critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **97**:3-24, 2002.

COWMAN, A. F.; CRABB, B. S. Functional genomics: identifying drug targets for parasitic disease. **Trends Parasitol.**, **19**:538-543, 2003.

DEANE, M. P.; SOUSA, M. A.; PEREIRA, N. M.; GONÇALVES, A. M.; MOMEN, H.; MOREL, C. M. *Trypanosoma cruzi*: Inoculation schedules and re-isolation methods select Individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by Schizodeme and Zymodeme analyses. **J. Protozool.**, **31**:276-280, 1984.

DE SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z, BARRAL-NETTO, M. **TRYPANOSOMA CRUZI e doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.7, p.88-126.

DEVERA, R. A. **Caracterização biológica, bioquímica e molecular de cepas do Trypanosoma cruzi, antes e após passagens em camundongos e em cultura**. 2002, 139 f. Tese (Doutorado)-Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro-RJ.

DEVERA, R.; ILLRRAMENDI, X.; MOTOYA-ARAUJO, R.; PIRMEZ, C.; COURA, J. R. Biodemes of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from three endemic areas in Minas Gerais State. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **35**:323-330, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O ; COURA, J. R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infecting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **98**:1-12, 2003.

DIAS, J. C. P. O controle da doença de Chagas no Brasil.In: SILVEIRA, A.C.; ARIAS, A.R. de; SEGURA,E.; GUILLÉN,G.; RUSSOMANDO,G.; SCHENONE,H.; DIAS;J.C.P.; PADILLA,J.V.; LORCA,M.; SALVATELLA,R. **El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América**. Uberaba-MG: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002. cap.2, p.145-237.

DIAZ de TORANZO, E. C.; CASTRO,J. A.; FRANKE D. E.; CAZZULLO, B. M.; CAZZULLO, J. J. Interaction of Benzonidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplast DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. **Experientia**, **44**: 880-881,1988.

DI NOIA, J. M.; BUSCAGLIA, C. A.; DE MARCHI, C. R.; ALMEIDA, I. C.; FRASCH, A. C. C. A *Trypanosoma cruzi* small surface molecula provide the first immunological evidence that Chaga's disease is due to a single parasite lineage. **J. Exp. Med.**, **195**:401-413, 2002.

DIEGO de, J. A.; PALAU, M. T.; GAMALLO, C.; PENIN, P. Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. **Trop. Med. Int. Health**, **3**:222-233, 1998.

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

_____. Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: how and why? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **18**:29-38, 1985. Suplemento.

DVORAK, J. A.; HARYMAN, D. L.; MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* correlation of growth kinetic to zymodemes type in clones derived from various sources. **J. Protozool.**, **27**:472-474, 1980.

EBERT, F. Further isoenzymatic studies on *Trypanosoma cruzi* stocks from Brazil, Colombia and Chile. **Trop. Med. Parasitol.**, **36**:85-87, 1985.

ENGEL, J. C.; DVORAK, J. A.; SEGURA, E. L.; CRANE, M. J. *Trypanosoma cruzi*: biological characterization of 19 clones derived from two chagasic patients. I. Growth kinetics in liquid medium. **J. Protozool.**, **29**:555-560, 1982.

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and myosites in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **13**:272-280, 1964.

FELICIANGELI, M. D.; CAMPBELL-LENDRUM, D.; MARTINEZ, C.; GONZALEZ, D.; COLEMAN, P.; DAVIES, C. Chagas disease control in Venezuela: lessons for the Andean region and beyond. **Trends Parasitol.**, **19**:44-49, 2003.

FERNANDES, O.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; PINHO, A. P.; MOREL, C. M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D. A.; JANSEN, A. M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, **118**:161-166, 1999a.

FERNANDES, O.; SANTOS, S. S.; JUNQUEIRA, A. C. V.; JANSEN, A. M.; CUPOLILLO, E.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B.; COURA, J. R. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the Mini-exon and ribosomal spacers. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **94**:195-197, 1999b.

FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; 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.**, **58**:807-811, 1998.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. A atividade terapêutica do Posaconazol e Benzonidazol em camundongos deficientes de IL-12 infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 41., E PRIMEIRO ENCONTRO DE MEDICINA TROPICAL DO CONE SUL, 2005, Florianópolis. Resumos... Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005a. p. 339.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. O papel dos linfócitos T CD8⁺ na eficácia do Posaconazol e do Benzonidazol no tratamento da fase aguda da doença de Chagas Experimental. In: CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE MEDICINA TROPICAL, 41., E PRIMEIRO ENCONTRO DE MEDICINA TROPICAL DO CONE SUL, 2005, Florianópolis. Resumos... Uberaba: Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 2005b. p. 339.

FERREIRA, M. S. Chagas disease and immunosuppression. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **94**:325-327, 1994.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **176**:293-287, 1982.

FRAGATTA FILHO, A. A.; LUQUETTI, A. O.; PRATYA, A. R.; RASSI, A.; GONTIJO, E. D.; FERREIRA, H. O.; CANÇADO, J. R.; COURA, J. R.; ANDRADE, S. G.; MACEDO, V.; AMATO NETO, A.; OLIVEIRA, JUNIOR, W.; BRENER, Z. Ethiological treatment for Chagas' disease. **Parasitol. Today.**, **13**:127-128, 1997.

FRANCO DA SILVEIRA, J. Biologia Molecular do *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **TRYPANOSOMA CRUZI e doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.8, p.127-169.

FRASCH, A. C. C.; REYES, M. B. Diagnosis of Chagas disease using recombinant DNA technology. **Parasitol. Today.**, **6**:137-139, 1990.

GARZÓN, E.; BORGES, M. C.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; NACIFE, V.; MEIRELLES, M. de N.; GUILARD, E.; BOSSENO, M. F.; GUEVARA, A. G.; BRENIÉRE, S. F.; OUASSI, A. *Trypanosoma cruzi* carrying a targeted deletion of a Tc52 protein-encoding allele elicits attenuated Chaga's disease in mice. **Immunol. Lett.**, **89**:67-80, 2003.

GAUNT, M. W.; YEO, M.; FRAME, I. A.; STOTHARD, J. R.; CARRASCO, H. J.; TAYLOR, M. C.; MENA, S. S.; VEAZEY, P.; MILES, G. A. J.; ACOSTA, N.; ARIAS, A. R. de.; MILES, M. A. Mechanism of genetic exchange in American trypanosomes. **Nature**, **421**:936-939, 2003.

GOIJMAN, S. G.; STOPPANI, A. O. M. Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *Trypanosoma cruzi*. **Biochem. Pharmacol.**, **34**:1331-1336, 1985.

GOIJMAN, S. G.; FRASCH, A. C. C.; STOPPANI, A. O. M. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. **Biochem. Pharmacol.**, **34**:1457-1461, 1985.

GOLDBERG, S. S.; SILVA PEREIRA, A. A. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. **J. Protozool.**, **69**: 91-96, 1983.

GOMES, M. L.; ROMANHA, A. J.; GONÇALVES, A. M.; CHIARI, E. Stability of isoenzyme and kinetoplast DNA (k-DNA) patterns in sucessively cloned *Trypanosoma cruzi* populations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **86**:379-385, 1991.

GOMES, Y. de M. Diagnóstico Etiológico. In: MALTA, A. J. **Doença de Chagas**. São Paulo-SP: Editora Sarvier, 1996. cap VII, p.119-132.

GONÇALVES, A.M.; MOREL, C. M. Characterization of parasites: Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: MOREL, C.M.(Ed.). **Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual**. 2.ed. Geneva/Rio de Janeiro: UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/Fundação Oswaldo Cruz, 1984. cap. II, p.100-115.

GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M. An improved silver staining procedure for Schizodeme analysis in polyacrylamide gradient gels. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **85**:101-106, 1990.

GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; SARAIVA, N.; SEGURA, I.; MOREL, C. M. Schizodeme analysis with the restriction endonuclease RSA I differentiates between *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **86**:477-478, 1991.

GONZALEZ, J.; MUÑOZ, S.; ORTIZ, S.; ANACONA, D.; SALGADO, S.; GALLEGUILLOS, M.; NEIRA, I.; SAGUA, H.; SOLARI, A. Biochemical, Immunological, and Biological Characterization of *Trypanosoma cruzi* Populations of the Andean North of Chile. **Exp. Parasitol.**, **81**:125-135, 1995.

GULL, K. The biology of kinetoplastid parasites: insights and challenges from genomics and post-genomics. **Int. J. Parasitol.**, **31**:443-452, 2001.

GUZMÁN-BRACHO, C. Epidemiology of Chagas disease in Mexico: an update. **Trends Parasitol.**, **17**:372-376, 2001.

HALL, F. A.; JOINER, K. Developmentally regulated virulence factors of *Trypanosoma cruzi* and their relationship to evasion of host defence. **J. Euk. Microbiol.**, **40**:207-213, 1993.

HALL, F. B. *Trypanosoma cruzi*: mechanism for entry into host cells. **Cell. Biology.**, **4**:323-333, 1993.

HECKER, H.; BETSCHART, B.; BURRI, M.; SCHLIMME, W. Functional morphology of Trypanosome chromatin. **Parasitol. Today.**, **11**:79-82, 1995.

HENRIKSSON, J.; ÅSLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today.**, **12**:108-114, 1996.

HENRIKSSON, J.; DUJARDIN, J. C.; BARNABÉ, C.; BRISSE, X.; TIMPERMAN, G.; VENEGAS, J.; PETTERSSON, U.; TIBAYRENC, M.; SOLARI, A. Chromosomal size variation in *Trypanosoma cruzi* is mainly progressive and is evolutionarily informative. **Parasitology**, **124**:277-286, 2002.

HIGO, H.; MIURA, S.; HORIO, M.; MIMORI, T.; HAMANO, S.; AGATSUMA, T.; YANAGI, T.; CRUZ-REYES, A.; UYEMA, N.; ROJAS de ARIAS, A.; MATTA, V.; AKAHANE, H.; HIRAYAMA, K.; TAKEUCHI, T.; TADA, I.; HIMENO, K. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. **Parasitol. Int.**, **53**:337-344, 2004

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

HIGO, H.; YANAGI, T.; MATTA, V.; AGATSUMA, T.; KANBARA, H.; TADA, I.; LEON, M.P.; MONROY, C.; TABARU, Y. Genetic Structure of *Trypanosoma cruzi* in Central America and its Comparison with South America Strains. **Int. J. Parasitol.**, **27**:1369-1374, 1997.

JOHNSON, A. M. Speculation on possible life cycles for the clonal lineages in the genus *Toxoplasma*. **Parasitol. Today**, **13**:393-397, 1997.

JUNQUEIRA, A. C. V.; CHIARI, E.; WINCKER, P. Comparison of the polymerase chain reaction with two classical parasitological methods for the diagnosis of Chagas disease in an endemic region of north-eastern Brazil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **90**:129-132, 1996.

KENDREW, S. J. **The encyclopedia of Molecular Biology**. Oxford-USA: Editora Blackwell Science Ltd., 1994, p. 1165.

KRIEGER, M. A.; ALMEIDA, E.; OELEMANN, W.; LAFAILLE, J. J.; PEREIRA, J. B.; KRIEGER, H.; CARVALHO, M. R.; GOLDENBERG, S. Use of recombinant antigens for the accurate immunodiagnosis of Chaga's disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **46**:427-434, 1992.

LAURENT, J. P.; BARNABE, C.; QUESNEY, V.; NOEL, S.; TIBAYRENC, M. Impact of clonal evolution on the biological diversity of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, **114**:213-218, 1997.

LAURENT, J. P.; SWINDLE, J. *Trypanosoma cruzi*: sensitivity to selective drugs in phylogenetically unrelated stocks. **Exp. Parasitol.**, **94**:60-66, 2000.

LEIBY, D. A.; HERRON, R. M.; READ, E. J.; LENES, B. A.; STUMPF, R. J. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. **Transfusion**, **42**:549-555, 2002.

LEON, W.; FRASCH, A. C. C.; HOEIJMAKERS, J. H. J.; FASE-FOWLER, F.; BORST, P.; BRUNEL, F.; DAVISON, J. Maxi-circles and mini-circles in kinetoplast DNA from *Trypanosoma cruzi*. **Biochim. Biophys. Acta**, **607**:221-231, 1980.

LEVINE, N. D. J.O.; CORLISS, F. E. G.; COX, G.; DEROUX, J.; GRAIN, B.M.; HONIGBERG, G. F.; LEEDALE, A. R.; LOEBLISH III, J.;A. R.; LOM, D.; LYNN, E.J.; MERINFELD, F.C.; PAGE, G.; POLJANSKY, G; SPRAGUE, V.; VAVRA, J.; WALLACE, F.G. A newly revised classification of the protozoa. **J. Protozool.**, **27**:37-58, 1980.

LIBBY, P.; ALROY, J.; PEREIRA, M. E. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. **J. Clin. Invest.**, **77**:127-135, 1986.

LIMA, M. T.; JANSEN, A. M.; RONDINELLI, E.; GATTASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. **Parasitol. Res.**, **77**:77-81, 1990.

LIMA, M. T.; LENZI, H. L.; GATTASS, C. R. Negative tissue parasitism in mice injected with a noninfective clone of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Res.**, **81**:6-12, 1995.

LUMSDEN, W.H.R. Problems in characterization and nomenclature of *Trypanosoma* populations. **Ann. Soc. Belg. Med. Trop.**, **57**:361-68, 1977.

LUQUETTI, A. O.; MILES, M. A.; RASSI, A.; REZENDE, J. M. SOUZA, A.; POVOA, M.; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodeme associated with acute and chronic Chagas disease in Central Brasil. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80**:462-470, 1986.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **TRYPANOSOMA CRUZI e a doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 17, p. 344-378.

MACEDO, A. M.; PENA, S. D. J. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol. Today**, **14**:119-124, 1998.

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.**, **55**:147-154, 1992.

MACEDO, V. O. **Influência da exposição a reinfeção na evolução da doença de Chagas. Estudo longitudinal de 5 anos**. Tese (Doutorado). **Rev. Patol. Trop.**, **5**:33-115, 1976.

MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G. Investigation on the possibility of spontaneous cure of mice infected with different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **36**:481-484, 1994.

MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G. Estudo do comportamento de cepas de *Trypanosoma cruzi* após passagem em diferentes espécies de triatomíneos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **24**:209-216, 1991.

MAGALHÃES, J. B.; ANDRADE, S. G.; SHERLOCK, I. *Trypanosoma cruzi* strains: behavior after passage into autochthonous or foreign of triatome (biological and biochemical patterns). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **38**:23-28, 1996.

MAGALHÃES, J. B.; PONTES, A. L.; ANDRADE, S. G. Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* no camundongo, após passagem em diferentes meios. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **80**:41-50, 1985.

MAGESA, S. M.; MDIRA, K. Y.; BABIKER, H. A.; ALIFRANGIS, M.; FÄRNERT, A.; SIMONSEN, P. E.; BYGBJERG, I. C.; WALLIKER, D.; JAKOBSEN, P. H. Diversity of *Plasmodium falciparum* clones infecting children living in a holoendemic area in north-eastern Tanzania. **Acta Trop.**, **84**:83-92, 2002.

MÁLAGA, S.; YOSHIDA, N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increase parasite infectivity. **Infect. Immun.**, **69**:353-359, 2001.

MANQUE, P. M.; NEIRA, I.; ATAYDE, V. D.; CORDERO, E.; FERREIRA, A. T.; FRANDO DA SILVEIRA, J.; RAMIREZ, M.; YOSHIDA, N. Cell adhesion and Ca²⁺ signaling in stably transfected *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing the metacyclic stage-specific surface molecule gp82. **Infect. Immun.**, **71**:1561-1565, 2003.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, A. V. L. Forma crônica cardíaca. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z, BARRAL-NETTO, M. **TRYPANOSOMA CRUZI e doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap.15, p. 266-343.

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**, **83**:175-181, 1988.

MÁRQUEZ, E. F.; ARCOS-BURGOS, M.; TRIANA, O. C.H.; MORENO, J. M.; JARAMILLO, N.O. Clonal population structure of colombian sylvatic *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.**, **84**:1143-1149, 1998.

MARR, J. J.; DOCAMPO, R. Chemotherapy for Chagas' Disease: A Perspective of Current Therapy and Considerations for Future Research. **Rev. Infec. Dis.**, **8**:884-903, 1986.

MARRETTO, J. P. M.; ANDRADE, S. G. Biochemical behavior of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from mice submitted to specific chemotherapy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **27**:209-215, 1994.

MASLOV, D. A. LUKES, J.; JIRKU, M.; SIMPSON, L. Phylogeny of trypanosomes as inferred from the small and large subunit rRNAs: implications for the evolution of parasitism in the trypanosomatid protozoa. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **75**: 197-205, 1996.

MEEÛS, T.; RENAUD, F. Parasites within the new phylogeny of eukaryotes. **Trends Parasitol.**, **18**:247-251, 2002.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, **64**:475-482, 1978.

MELVILLE, S. E. Genome research in *Trypanosoma brucei*: chromosome size polymorphism and its relevance to genome mapping and analysis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **91**:116-120, 1997.

MICHAILOWSKY, W.; MURTA, S. M. F.; CARVALHO-OLIVEIRA, L.; PEREIRA, M. E. S.; FERREIRA, L. R. P.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J.; GAZZINELLI, R. T. Interleukin-12 enhances In vivo parasitocidal effect of Benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob. Agents Chemother**, **42**:2549-2556, 1998.

MILES, M.A. Isozyme characterization. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**,**18**:53-59, 1985. Suplemento.

MILES, M.A.; CIBULSKIS, R. E. Zymodeme Characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, **2**:94-101, 1986a.

_____. The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today.**, **2**:94-97, 1986b.

MILES, M. A.; LAHAM, S. M.; SOUZA, A. A. POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Med. Hyg.**,**74**:221-237, 1980.

MOMEN, H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a Commentary on Characterization and Nomenclature. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:181-184, 1999. Suplemento 1.

MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **29**:1070-1074, 1980.

MOREL, C.; CHIARI, E.; PLESSMANN CAMARGO, E.; 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**, **77**:6810-6814, 1980.

MOREL, C. M.; DEANE, M. P.; GONÇALVES, A. M. The Complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by Schizodeme analysis. **Parasitol. Today**, **2**:97-101, 1986.

MORGAN, U. M.; CONSTANTINE, C. C.; THOMPSON, R. C. A. Is *Cryptosporidium* clonal? **Parasitol. Today**, **13**:488, 1997.

MORTARA, R. A.; ANDREOLI, W. K.; TANIWAKI, N. N.; FERNANDES, A. B.; DA SILVA, C. V.; FERNANDES, M. C. D.C.; L'ABBATE, C.; DA SILVA, S. Mammalian cell invasion and intracellular trafficking by *Trypanosoma cruzi* infective forms. **An. Acad. Bras. Cienc.**, **77**:77-94, 2005.

MURTA, S. M. F.; GAZZINELLI, R. T.; BRENER, Z.; ROMANHA, A. J. Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to Benzimidazole and Nifurtimox. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **93**:203-214, 1998.

MÜLLER, S.; LIEBAU, E.; WALTER, R. D.; KRAUTH-SIEGEL, R.L. Thiol-based redox metabolism of Protozoan parasites. **Trends Parasitol.**, **19**:320-328, 2003.

NEIRA, I.; FERREIRA, A. T.; YOSHIDA, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. **Int. J. Parasitol.**, **32**:405-414, 2002.

NEIRA, I.; SILVA, F. A.; CORTEZ, M.; YOSHIDA, N. Involvement of *Trypanosoma cruzi* metacyclic tripomastigote surface molecule gp82 in adhesion to gastric mucin and invasion of epithelial cells. **Infect. Immun.**, **71**:557-561, 2003.

NUNES, L. R.; CARVALHO, M. R. C.; BUCK, G. A. *Trypanosoma cruzi* strains partition into two groups based on the structure and function of the spliced leader RNA and rRNA gene promoters. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **86**:211-224, 1997.

OLIVEIRA, R. P.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. An Alternative Approach to evaluating the intraspecific genetic variability of parasites. **Parasitol. Today**, **13**:196-200, 1997.

OLIVEIRA, R.P.; MELO, A. I. R.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E.; PENA, S. D. J. The Population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 strains using eight polymorphic CA-Repeat microsatellites. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:65-70, 1999.

OUAISSI, M.A. Role of the RGD sequence in Parasite adhesion to Host Cells. **Parasitol. Today**., **4**:169-173, 1988.

PEREIRA, M. E. A.; HOFF, R. Heterogenous distribution of neuraminidase activity in strains and clones do *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. **Mol. Biochem. Parasitol.**,**20**:183-189, 1986.

PESSOA, S.; MARTINS, A.V. **Parasitologia médica**. 10.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1977. 986 p.

POLAK, A.; RICKLE, R. Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative Benznidazole. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**,**72**:45-54, 1978.

POSTAN, M.; CHEEVER, A. W.; DVORAK, J. A.; MCDANIEL, J. P. A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/He mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio-X10/4. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80**:50-55, 1986.

POSTAN, M.; MCDANIEL, J. P.; DVORAK, J. A. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I: a comparison of the course of infection of C3H/He mice with two clones isolated from a common source. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **32**:497-506, 1983.

_____. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. course of infection of C57bl/6 mice with single-cell-isolated stocks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **33**:236-238, 1984.

_____. *Trypanosoma cruzi*: constancy of clone pathogenicity for inbred mice during long-term *in vitro* maintenance. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **80**:659-663, 1986.

_____. Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **81**:415-419, 1987.

REVOLLO, S.; OURY, B.; LAURENT, J.; BARNABÉ, C.; QUESNEY, V.; CARRIÈRE, B.; NOËL, S.; TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: Impact of Clonal Evolution of the Parasite on Its Biological and Medical Properties. **Exp. Parasitol.**, **89**:30-39, 1998.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **TRYPANOSOMA CRUZI e doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 16, p. 2297-337.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. Forma indeterminada da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **TRYPANOSOMA CRUZI e doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 14, p.246-259.

ROCHA, A.; MENEZES, A. C. O.; SILVA, A. M.; FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; BURGARELLI, M. K. N.; ALMEIDA, E.; TURCATO, JUNIOR, G.; METZE, K.; LOPES, E. R.; Pathology of patients with Chagas's disease and acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **50**:261-268, 1994.

RODRIGUES, P.; ESCALANTE, M.; DÍEZ, H.; CUERVO, C.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, R. S.; ZARANTE, I.; PUERTA, C.V. Estudio de la variabilidad de seis cepas colombianas de *Trypanosoma cruzi* mediante polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLP) y amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPD). **Biomedica**, **22**:263-271, 2002.

RODRÍGUEZ, P.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, S.; ZARANTE, I.; PUERTA, C. Isoenzymatic characterization of Colombian strains of *Trypanosoma Cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **93**:739-740, 1998.

ROGERS, W. O.; WIRTH, D. F. Kinetoplast DNA minicircle: regions of extensive sequence divergence. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, **84**:565-569, 1987.

ROMANHA, A. J. **Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi***. 1982. 110f. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais-MG.

ROMANHA A. J.; SILVA PEREIRA, A. A. da; CHIARI, E. ; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*. changes after prolonged subculture. **Comp. Biochem. Physiol.**, **62**:139-142, 1979.

RUIZ-GARCIA, M.; MONTILLA, M.; NICHOLLS, S.; ALVAREZ, D. Population genetic analysis of Colombian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by enzyme electrophoretic profiles. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **96**:31-51, 2001.

SATELITE MEETING. Recommendations from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **94**:429-432, 1999. Suplemento 1.

SCHENKMAN, S.; FERGUSON, M. A. J.; HEISE, N.; CARDOSO DE ALMEIDA, M. L.; MORTARA, R. A.; YOSHIDA, N. Mucin-like glycoprotein linked to the membrane by glycosilfosfatidilinositol anchor are the major acceptors of sialic acid a reaction catalysed by trans-sialidase in metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **59**:293-304, 1993.

SCHENKMAN, S.; JIANG, M-S.; HART, G. W.; NUSSENZWEIG, V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell.**, **65**:1117-1125, 1991.

SCHENKMAN, S.; PONTES DE CARVALHO, L.; NUSSENZWEIG, V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **J. Exp. Med.**, **175**: 567-575, 1992.

SCHOFIELD, C. J.; DUJARDIN, J. P. Chagas disease vector control in America Central. **Parasitol. Today.**, **13**:141-144, 1997.

SHLOMAI, J. The structure and replication of Kinetoplast kDNA. **Curr. Mol. Med.**, **4**:623-647, 2004.

SILVEIRA, A. C. O controle da doença de Chagas nos países do Cone Sul da América. História de uma iniciativa internacional. 1991/2001. In: SILVEIRA, A. C.; ARIAS, A. R. de.; SEGURA, E.; GUILLÉN, G.; RUSSOMANDO, G.; SCHENONE, H.; DIAS, J. C. P.; PADILLA, J. V.; LORCA, M.; SALVATELLA, R. **El control de la enfermedad de Chagas en los países del Cono Sur de América**. Uberaba-MG: Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, 2002. cap.1, p.16-44.

SOLARI, A.; ORTÍZ, S.; SOTO, A.; ARANCIBIA, C.; CAMPILLAY, M.; CONTRERAS, M.; SALINAS, P.; ROJAS, A.; SCHENONE, H. Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children with Nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. **J. Antimicrob. Chemother.**, **48**:515-519, 2001.

SOUSA, M.A. Morphobiological characterization of *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 and its distinction from other Trypanosomes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **94** :205-210, 1999. Suplemento I.

SOUZA, M. M.; ANDRADE, S. G.; BARBOSA, J. R. A. A.; SANTOS, R. T. M.; ALVES V. A. F.; ANDRADE, Z. A. *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **91**: 217-224, 1996.

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.**, **83**:141-152, 1996.

STEVENS, J.; NOYES, H.; GIBSON, W. The Evolution of Trypanosomes Infecting Humans and Primates. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **93**:669-676, 1998.

STEVENS, J. R.; GIBSON, W. C. The Molecular Evolution of Trypanosomes. **Parasitol. Today.**, **15**:432-437, 1999a.

STEVENS, J.R.; GIBSON, W. C. The evolution of pathogenic trypanosomes. **Cad. Saúde Públ.**, **15**:673-684, 1999b.

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.**, **33**:205-214, 1989.

TAN, H.; ANDREWS, N. W. Don't bother to knock – the cell invasion strategy of *Trypanosoma cruzi*. **Trends Parasitol.**, **18**:427-428, 2002.

TANURI, A.; ANDRADE, P. P.; ALMEIDA, D. F. *Trypanosoma cruzi*: isolation of cloned strains characterization of their infectivity. **J. Parasitol.**, **71**:397-402, 1985.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends Parasitol.**, **8**:405-410, 2002.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. Towards a Population Genetics of Microorganisms: the Clonal Theory of Parasitic Protozoa. **Parasitol. Today.**, **7**:228-232, 1991.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F. J. *Trypanosoma cruzi* Populations: more clonal than sexual. **Parasitol. Today.**, **3**:189-190, 1987.

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

TIBAYRENC, M.; BRENIÈRE, S. F. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than zymodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **83**:249-255, 1988.

TIBAYRENC, M.; KJELLBERG, F.; AYALA, F. J. A clonal theory of parasitic protozoa: the population structures of *Entamoeba*, *Giardia*, *Leishmania*, *Naegleria*, *Plasmodium*, *Trichomonas*, and *Trypanosoma* and their medical and taxonomical consequences. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **87**:2414-2418, 1990.

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**, **83**:115-119, 1986.

TOLEDO, M. J. de O.; LANA, de M.; CARNEIRO, C. M.; BAHIA, M. T.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; VELOSO, V. M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; TAFURI, W. L. Impact of *Trypanosoma cruzi* evolution on its biological properties in mice. **Exp. Parasitol.**, **100**:161-172, 2002.

TOLEDO, M. J. O.; BAHIA, M. T.; CARNEIRO, C. M.; MARTINS FILHO, O. A.; TIBAYRENC, M.; BARNABÉ, C.; TAFURI, W. L.; LANA, M. Chemotherapy with Benznidazole and Itraconazole for mice Infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimicrob. Agents Chemother.**, **47**:223-230, 2003.

UMEZAWA, E. S.; NASCIMENTO, M. S.; STOLF, A. M. Enzyme linked immunosorbent assay with *Trypanosoma cruzi* excreted-secreted (TESA-ELISA) for

serodiagnosis of acute and chronic Chagas' disease. **Diag. Microbiol. Infect. Dis.**, **39**:169-176, 2001.

UMEZAWA, E. S.; BASTOS, S. F.; CAMARGO, M. E.; YAMAUCHI, L. M.; SANTOS, M. R.; GONZALEZ, A.; ZINGALES, B.; LEVIN, M. J.; SOUSA, O.; RANGEL-ALDÃO, R.; da SILVEIRA, J. F. Evaluation of recombinant antigens for serodiagnosis of Chagas disease in South in Central America. **J. Clin Microbiol**, **37**:1554-1560, 1999.

UMEZAWA, E. S.; LEVITUS, G.; PONCE, C.; PONCE, E.; HENRIQUEZ, D.; REVOLLO, S.; ESPINOZA, B.; KHAN, B.; da SILVEIRA, J. F. Serodiagnosis of chronic and acute Chagas disease with *Trypanosoma cruzi* recombinant proteins: result of a collaborative study in six latin American Countries. **J. Clin Microbiol**, **42**:449-452, 2004.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; REIS, D. A.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES JUNIOR., S.; MOREIRA, M. C. V.; BRASILEIRO FILHO, G.; PENA, S. D. J. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease – differential distribution of genetic types into diverse organs. **Am. J. Pathol.**, **156**:1805-1809, 2000.

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

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; REIS, D.A.; PEREIRA, M. E. S.; 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.**, **149**:2153-2159, 1996b.

VARGAS, D.; WALLACE, A.; SOLARI, A. Estandarizacion de la reaccion de polimerizacion en cadena (PCR) en muestras de sangre de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Dia**, **20**:136-140, 1996.

VELOSO, V. M.; CARNEIRO, C. M.; TOLEDO, M. J.; LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W. L. Variation in susceptibility to Benznidazole in isolates derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **96**:1005-1011, 2001.

VENEGAS, J.; ORTIZ, S.; MUNOZ, S.; SOLARI, A. Molecular karyotype and Schizodeme analyses of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chilean triatomines. **Parasitology**, **115**:41-46, 1997.

WARREN, L.G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **J. Parasitol.**, **46**:529-539, 1960.

WALLIKER, D. Malaria Parasites: Randomly Interbreeding or 'Clonal' Populations? **Parasitol. Today.**, **7**:232-235, 1991.

WESTON, D.; PATEL, B.; VAN VOORHIS, W. C. Virulence in *Trypanosoma cruzi* infection correlates with the expression of a distinct family of sialidase superfamily genes. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **98**:105-116, 1999.

WHO. Control of Chagas' disease. Report of a WHO Expert Committee. **WHO Tech. Rep. Ser.**, Geneva, 81-95, 1991.

WHO. Control of Chagas disease. Second. Report of the WHO Expert Committee. **WHO Tech. Rep. Ser.**, Geneva, 1-109, 2002.

WHO. Report of the steering committees research activities of the scientific working group (SWG) on Chaga's disease 1982-1985. Parasite Classification. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **81**:181-244, 1986. Suplemento.

WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J. B.; CARDOSO, A. G.; OELEMANN, W.; MOREL, C. M. Use a simplified Polymerase Chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **51**:771-777, 1994.

YOSHIDA, N.; FAVORETO JÚNIOR, S.; FERREIRA, A. T.; MANQUE, P. M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cell. **Bras. J. Med. Biol. Res.**, **33**:269-278, 2000.

ZAVALA-CASTRO, J. E.; ACOSTA-VIANA, K.; GUZMÁN-MARÍN, E.; ROSADO-BARRERA, M. E.; ROSALES-ENCINA, J. L. Stage specific kinetoplast DNA-binding proteins in *Trypanosoma cruzi*. **Acta Trop.**, **76**:139-146, 2000.

ZINGALES, B.; RONDINELLI, E.; DEGRAVE, W.; SILVEIRA, J. F.; LEVIN, M.; L. E. PASLIER, D.; MODABBER, F.; DOBROKHOTOV, B.; SWINDLE, J.; KELLY, J. M.; ÅSLUND, L.; HOHEISEL, J. K.; RUIZ, A. M.; CAZZULO, J. J.; PETERSSON, U.; FRASCH, A. C. The *Trypanosoma cruzi* Genome Initiative. The *Trypanosoma Cruzi* Genome Consortium. **Parasitol. Today.**, 1:16-22, 1997.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. S. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, 94:159-164, 1999.

APÊNDICE A

Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones

Estrutura clonal da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* (Biodema Tipo III): análise biológica, isoenzimática e histopatológica de sete clones isolados

Edson Luiz Paes Camandaroba¹, Rozália Figueira Campos², Juracy Barbosa Magalhães¹
and Sonia G. Andrade¹

Abstract The clonal structure of the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*, biodeme Type III and zymodeme 1, was analyzed in order to characterize its populations and to establish its homogeneity or heterogeneity. Seven isolated clones presented the basic characteristics of Biodeme Type III, with the same patterns of parasitemic curves, tissue tropism to skeletal muscle and myocardium, high pathogenicity with extensive necrotic-inflammatory lesions from the 20th to 30th day of infection. The parental strain and its clones C1, C3, C4 and C6, determined the higher levels of parasitemia, 20 to 30 days of infection, with high mortality rate up to 30 days (79 to 100%); clones C2, C5 and C7 presented lower levels of parasitemia, with low mortality rates (7.6 to 23%). Isoenzymic patterns, characteristic of zymodeme 1, (Z1) were similar for the parental strain and its seven clones. Results point to a phenotypic homogeneity of the clones isolated from the Colombian strain and suggest the predominance of a principal clone, responsible for the biological behavior of the parental strain and clones.

Key-words: *Trypanosoma cruzi*. Colombian strain. Clonal structure. Clones. Biodemes. Zymodemes. Histopathology.

Resumo A estrutura clonal da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, biodema Tipo III e zimodema 1, foi analisada com o objetivo de caracterizar as suas populações e estabelecer a homogeneidade ou heterogeneidade das mesmas. Foram isolados sete clones, os quais apresentaram as características básicas do biodema Tipo III, com o mesmo padrão de curvas parasitêmicas, tropismo tecidual para músculo esquelético e miocárdio, alta patogenicidade, com extensas lesões necrótico-inflamatórias, do 20^o ao 30^o dia de infecção. A cepa parental e os clones C1, C3, C4 e C6 apresentaram os níveis mais elevados de parasitemia entre 20 e 30 dias pós-infecção e alto índice de mortalidade até 30 dias (79 a 100%); os clones C2, C5 e C7 apresentaram níveis mais baixos de parasitemia com baixa mortalidade até 30 dias (7,6 a 23%). Os padrões isoenzimáticos foram característicos do zimodema 1 (Z1) para a cepa parental e os sete clones. Os achados do presente trabalho indicam uma homogeneidade fenotípica entre os clones isolados da cepa Colombiana e sugerem a predominância de um clone principal, responsável pelo padrão de comportamento biológico da cepa parental e dos clones.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*. Cepa Colombiana. Estrutura clonal. Clones. Biodemas Zimodemas. Histopatologia.

The Colombian strain of *T. cruzi* has been used in experimental investigations since the pioneering studies of Federici *et al*². They described the progressive myocarditis occurring in mice as well as the main features of chronic disease in the murine model. Comparative studies of the biological behavior and histopathological lesions produced by the Colombian, Y¹⁷ and São Felipe strains¹ showed marked differences

in tissue tropism, virulence and pathogenicity³. These strains came to represent the prototypes for three different biological types or biodemes: I, II, III. The Colombian strain was isolated from a human case originating in Colombia¹² and was typed as Biodeme Type III and identified as zymodeme Z1 by Andrade *et al*⁴, according to the isoenzymic patterns of Miles *et al*⁴. This classification corresponds to the recently

1. Laboratório de Doença de Chagas Experimental do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fundação Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ). Salvador, BA.

2. Departamento de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Feira de Santana, Feira de Santana, BA.

Financial support - PAPES II - FIOCRUZ, Rio de Janeiro, RJ.

Address to: Dra. Sonia G. Andrade. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz /FIOCRUZ. R. Valdemar Falcão 121, Brotas 41945-001 Salvador, BA.

Fax: 55 71 356-2155.

e-mail: sgandrade@cpqgm.fiocruz.br

Recebido para publicação em 3/7/2000.

established taxa *T. cruzi*, as referred by Momem¹⁵. Another characteristic of Biodeme Type III is its resistance to chemotherapy with benznidazole and nifurtimox⁴.

Since *T. cruzi* strains represent multiclonal populations¹⁸, investigation of their structure should contribute to define the homogeneity or heterogeneity of

its clonal constitution. This seems crucial to clarify a possible role of parasite strains in the clinical manifestations of Chagas' disease. Inasmuch the possibility of a predominance of principal clones, as representative of strains circulating in one endemic area, has been recently suggested^{29 10}.

MATERIALS AND METHODS

T. cruzi* strain.** The Colombian strain, maintained in our Laboratory by successive passages into mice for several years, has been used in the present investigation. ***Cloning of the strain. To obtain a single parasite, citrated blood taken from mice infected with the parental strain, on the 30th day of infection, was centrifuged at 900g and parasites in the plasma counted in a Neubauer chamber after dilution in PBS, pH 7.2. The volume of 1ml was distributed in multi-well microtiter culture plates and examined with an inverted microscope. By micromanipulation, a single trypomastigote form was isolated and intraperitoneally inoculated into an approximately 8-day-old suckling mouse. From 10 to 30 days after inoculation the peripheral blood was examined for the presence of trypanosomes. They were then defined as clones¹¹. Seven clones were isolated by this method and named as: Cl-Col-C1, C2, C3, C4, C5, C6 and C7 respectively. The blood of these mice was inoculated individually into groups of mice with 10 to 12g body weight. After 3 to 13 passages into mice, inocula (5×10^4 to 1×10^5) were obtained for the infection of the experimental groups and used for biological, isoenzymic and histopathological characterization of the clones to be compared with the parental strain. One group of mice, having the same body weight, was inoculated with the parental strain for comparison.

Biological characterization - Parasitemia was evaluated on the 7th to 50th day after infection, by microscopic examination of 5ml of fresh tail blood, between glass and coverslips, and counted in 50

microscopic fields (400X). The parasitemic levels were expressed as logarithms of the media of parasites in peripheral blood of 5 mice.

Cumulative mortality was evaluated from 30 to 50 days after infection. Morphology of trypomastigotes in peripheral blood was evaluated by the percentage of slender and broad forms, as seen in smears stained with the May Grünwald-Giemsa method.

Histopathological study. Three to five infected mice were sacrificed after 14, 20, 25 and 30 days post-infection (p.i). Fragments of the myocardium and skeletal muscle were fixed into 10% formalin and embedded in paraffin. Five-micrometer thick sections were stained with hematoxylin and eosin and microscopically analyzed.

Isoenzymic characterization. Enzymic extracts were obtained by hemoculture in axenic Warren culture medium from each clone. Parasites from culture were washed four times, with centrifugation at 2000g in buffer Tris-KRT pH 7.3 and enzymic extracts were prepared and stored in liquid nitrogen as *pearls*. The following isoenzymes were tested: alanine aminotransferase (ALAT-E.C.2.6.1.2); aspartate aminotransferase (ASAT-E.C.2.6.1.1); glucose-phosphate isomerase (GPI)-E.C.5.3.1.9); phosphoglucosmutase (PGM-E.C.2.7.5.1). Electrophoresis was performed according to the method of Miles *et al*⁴.

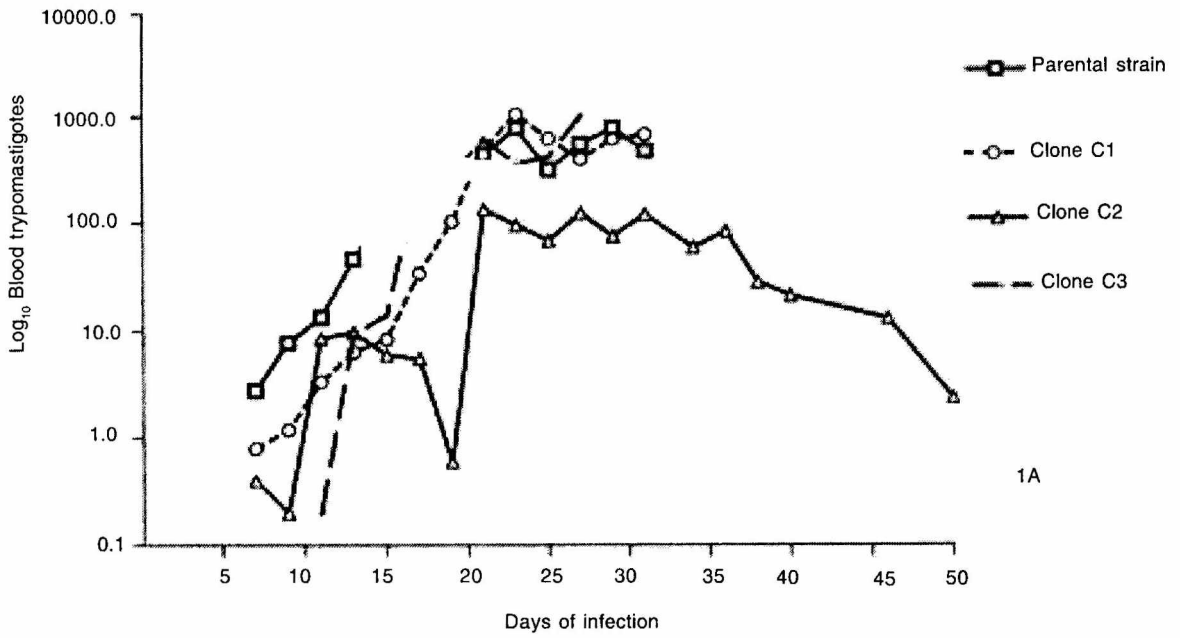
Statistical analysis. For comparative evaluation of the mortality of mice infected with parental strain and clones a non-parametric Fisher test was applied.

RESULTS

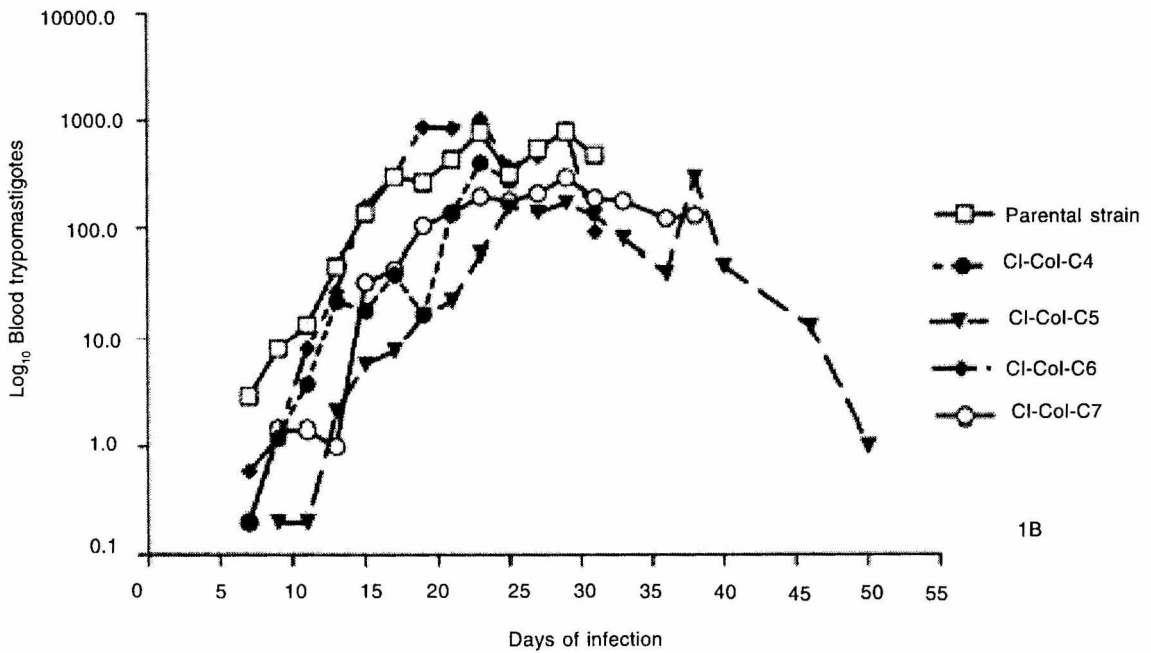
The biological behavior of the seven clones isolated from the Colombian strain were analyzed in comparison with the parental strain, taking into account several parameters, as follows: parasitemia, morphology of parasite in peripheral blood, cumulative mortality of the infected animals, tissue tropism and histopathological lesions. The parental strain and the seven clones have shown the parasitemic profiles of the Type III strain, with a slow increase in the number of parasites and with peaks of parasitemia between 20 and 30 days p.i. (Figures 1A and B). By taking the media for 5 mice, the parasitemic peaks were considered as high, above 500 trypomastigotes/50 microscopic fields (400X) or as medium, from 100 to 500 trypomastigotes. The strains with high parasitemic levels determined high mortality rates; medium parasitemic levels, coincided with low mortality. As shown in Table I, the cumulative mortality

of mice infected with the parental strain and the seven derived clones, expressed as percentage of dead animals, varied from a low (7.6 to 23%) to a high level (100%). Mortality up to 30 days of infection was low for the clones C2, C5 and C7 and high for the parental strain and the clones C1, C3, C4, C6 (100%). These findings indicate different degrees of virulence for the several clones investigated.

Morphological study of peripheral blood trypomastigotes showed a predominance of slender forms on the 10th day of infection for the parental strain and clones C3, C5 and C7, and broad forms from the 14th day onwards. The clones C1, C4 and C6 showed a predominance of slender forms up to the 14th day of infection. The parental strain and its 7 clones presented a predominance of broad forms by the 20th day of infection.



1A



1B

Figure 1A and 1B - Log mean number of blood trypomastigotes in 50 high power microscopic fields (400X) of 5 mice infected with either the parental Colombian strain or Clones CI-Col- C1, C2, C3, C4, C5, C6, C7. Parasitemic profiles are similar for the seven clones as compared with the parental strain with peaks from 20 to 30 days post-infection.

Table 1 - Cumulative mortality in mice infected with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* and its clones (30 days of infection).

Experimental groups	Inoculum	Mice number	Mortality	Mortality (%)
Parental strain	1 x 10 ⁵	25	9/90	100.0
Cl-Col-C1	5 x 10 ⁴	18	11/11	100.0
Cl-Col-C6	1 x 10 ⁵	25	14/14	100.0
Cl-Col-C3	5 x 10 ⁴	25	12/13	92.3
Cl-Col-C4	1 x 10 ⁵	25	15/19	78.9
Cl-Col-C7	1 x 10 ⁵	25	3/13	23.0
Cl-Col-C2	1 x 10 ⁵	25	1/13	7.6
Cl-Col-C5	1 x 10 ⁵	25	1/13	7.6

Comparison of percentage of mortality between clones and parental strain has shown significant differences for clones C7, C2, C5 ($p < 0.01$ Fischer test).

Isoenzymic characterization. The electrophoretic patterns obtained for the parental strain and its clones, regarding the enzymes PGM, GPI, ALAT and ASAT, reproduced the profiles already described for the

Biodeme Type III⁷, corresponding to zymodeme Z1¹⁴ (Figures 2, 3 and 4). Clone C1 revealed 3 bands with the enzyme ALAT (Figure 4A); clone C3 revealed 2 bands with the enzyme ASAT (Figure 4B).

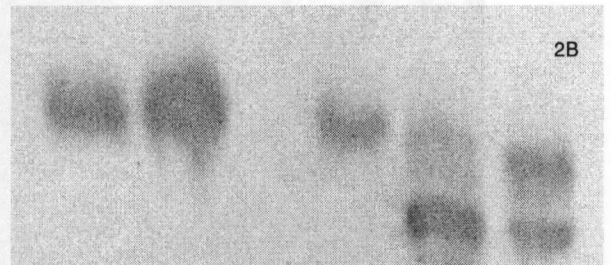
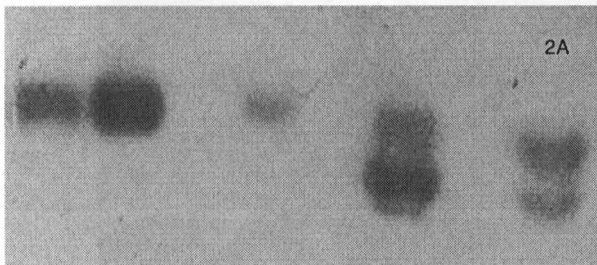


Figure 2A and 2B - Isoenzymic profiles for PGM of the Colombian parental strain and the clones Cl-Col-C3 and C4 in comparison with prototypes of Biodemes I (Per), II (21SF), III (Col).

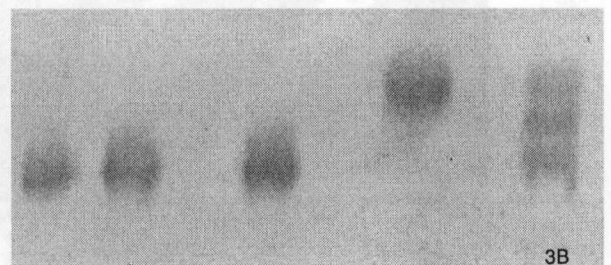


Figure 3A and 3B - Electrophoretic isoenzymic patterns for GPI of the Colombian parental strain and the clones Cl-Col-C2 and C7 as compared with the Biodemes I, II, III respectively: Per, 21SF, Col.

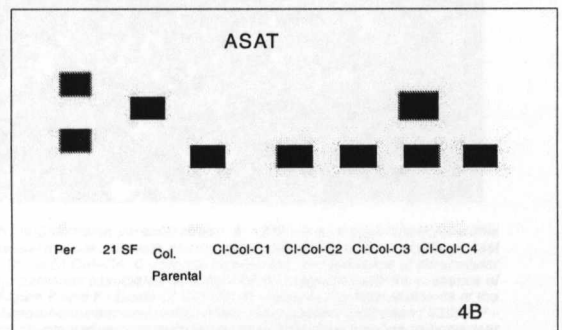
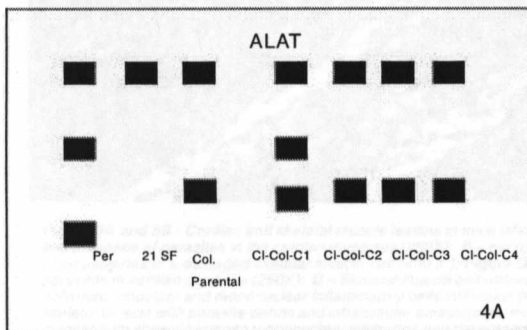


Figure 4A and 4B - Isoenzymic profiles for ALAT and ASAT of the Colombian parental strain and the clones Cl-Col-C1, C2, C3, C4 in comparison with the prototypes of Biodemes I, II, III. A 3-band profile of ALAT in clone C1 and a 2-band profile for ASAT in clone C3 represent alternative patterns for these enzymes.

Histopathological study. Study of the tissue lesions and parasite tropism was comparatively performed for the parental strain and its clones. The parental strain determined progressive skeletal muscle and myocardium lesions, from the 14th day of infection, with slight mononuclear infiltration and low parasitism of myocytes. By the 20th day of infection a progressive parasitism of myocardiocytes was seen, with focal myocyte necrosis and diffuse mononuclear-cell infiltration (Figure 5A). Tissue parasitism and destruction of myocells with dense inflammatory infiltration were prominent in skeletal muscles and progressive until 30 days of infection (Figure 5B).

Histopathological lesions determined by each one of the seven clones, from 14 to 30 days of infection, showed the same evolution and histopathological aspects of the parental strain. For the seven clones, parasitism and inflammatory infiltration were present at 14 and 20 days p.i., varying from slight to moderate in keeping with the virulence of the clone. Necro-inflammatory lesions were more prominent in skeletal muscles and intensified up to the 30th day of infection. In general, this late phase exhibited parasite and myocell disintegration, together with severe mononuclear-cell infiltration and rare preserved parasites (Figures 5C,D, E and F).

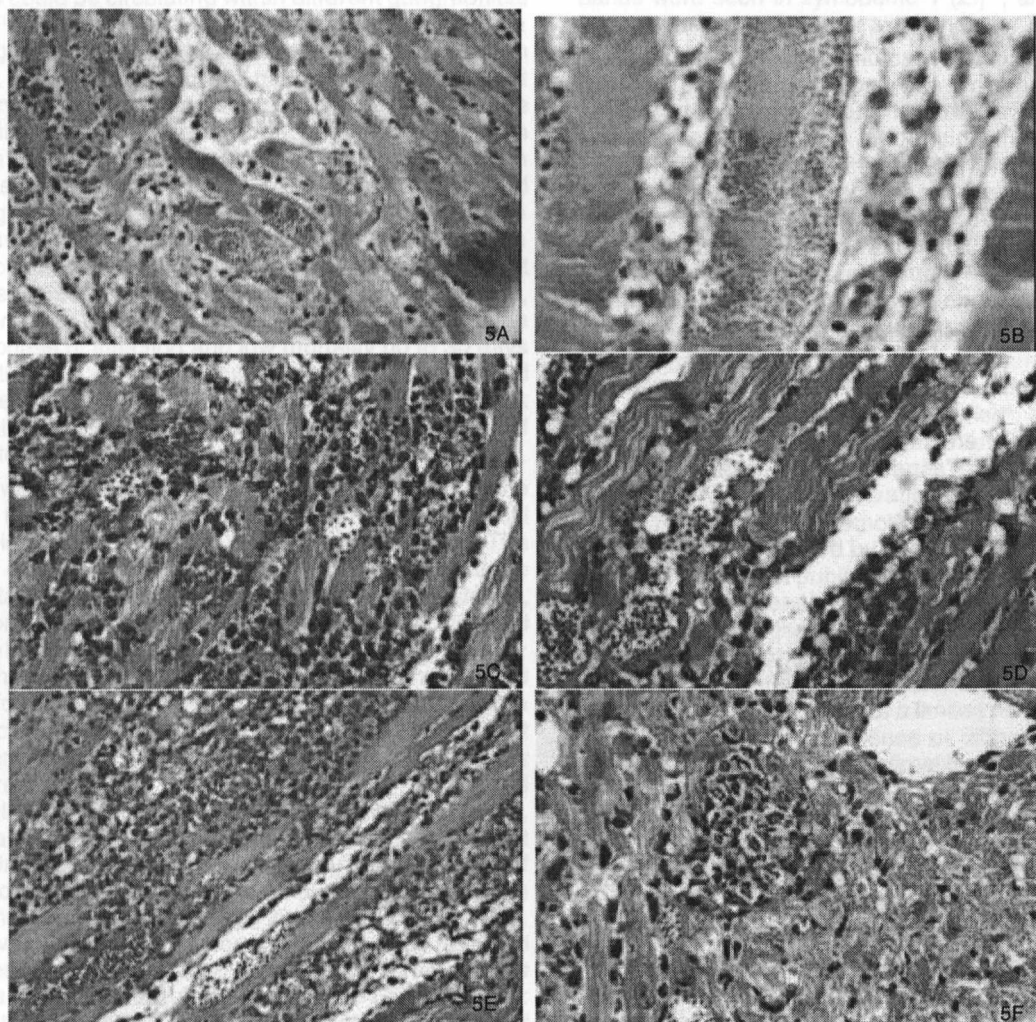


Figure 5A and 5B - Cardiac and skeletal muscle lesions in mice infected with the Colombian parental strain: **A** - Diffuse and moderate myocarditis and presence of parasites in the cardiac myocytes (250X); **B** - necrosis of skeletal muscle cells with mononuclear infiltrate; presence of a large nest of amastigotes in a damaged skeletal muscle cell (400 X); **Figure C and D** - Clone CI-Col-C4: **C** - Intense myocarditis and presence of intracellular parasites in cardiac myocells (250X); **D** - Skeletal muscle cell with intracellular parasites associated with myocell disintegration and the presence of polymorphonuclear and mononuclear inflammatory cells infiltration (400X); **Figure E and F** - Clone CI-Col-C6: **E** - Intense destructive lesions of the skeletal muscle with parasite debris and intracellular amastigotes; intense polymorphonuclear and mononuclear inflammatory infiltration (250X); **F** - myocardium showing intense mononuclear infiltration and the presence of focal disintegration of parasitized myocell with intense polymorphonuclear infiltration (250X).

DISCUSSION

T. cruzi strains represent multiclonal populations, as described by Tibayrenc *et al*¹⁰. based on the multiloci isoenzymic profile of 121 strains from different geographical areas. Macedo and Pena¹³ suggest that multiclonal strains are formed by clonally propagating organisms with different tissue tropisms, correlated with complementary molecular interactions between the invading clones of *T. cruzi* and the host tissues. Clonal populations can be homogeneous or heterogeneous. It has been admitted that a limited number of *principal* clones could be circulating within different geographical areas¹⁹. The present study has demonstrated a homogeneity of the clones obtained from the Colombian strain, both considering its biological behavior and isoenzymic profiles. On analyzing the behavior of the Colombian strain after long period of maintenance in laboratory, by successive passages into mice, an increased virulence was detected, which was revealed by high mortality up to 30 days of infection. The Colombian strain, as initially described³, was characterized by a slow progression of parasitemia, that reached high levels by the 20th to 30th day of infection, with predominance of broad parasite forms from the initial phase of infection and low mortality up to 30 days p.i. Activation of parasite virulence, evaluated in infected mice, either after macrophage blockade with Indian Ink or treatment with corticoid, results in earlier increasing of parasitemia and the presence of slender parasitic forms⁶.

However, considering the profiles of parasitemia, the tissue tropism and pathogenicity pattern, the biological behavior of the Colombian strain was maintained. The seven clones, with the same biological patterns of the parental strain, exhibited different degrees of virulence, as expressed by high levels of parasitemia and elevated mortality; however as has been previously demonstrated¹, virulence is not a stable character, and therefore cannot independently be used for strain characterization. The same type of strain can present different degrees of virulence, evaluated by the levels of parasitemia and the rate of mortality of infected animals. The several strains isolated from São Felipe, BA classified as Biodeme Type II, could either exhibit low virulence, without mortality by the 20th day of infection; medium virulence, with 50% mortality or high virulence, with 100% mortality by 20 days of infection. However, comparative histopathological study revealed that lesions determined by the parental strain and its clones disclosed the same pattern of pathogenicity: same tissue tropism, with predominant involvement of skeletal muscles, intense myocarditis and high tissue parasitism. These findings suggest that when a predominant principal clone is present the histotropism of the strain and of the clones is similar, confirming the stability of strain behavior. The isoenzymic profile of Biodeme Type III represents the same pattern of zymodeme 1 as described by Miles *et al*¹⁴. The

isoenzymic patterns for GPI and PGM represent the same profile for the parental strain and clones, representing a homozygosis for these enzymes. However, the presence of a profile of three bands for ALAT in the clone C1 and two bands for ASAT in the clone C3 represents alternative patterns, as previously demonstrated^{7 14}. According to Miles *et al*¹⁴, of the 11 enzymes which did contribute to the separation of the zymodemes, four gave alternative patterns within individual zymodemes; as for ALAT, up to four ancillary, prominent bands were seen in zymodeme 1 (Z1)¹⁴; and ASAT has been described with one or two bands, for Z1^{7 14}.

The present results, indicative of homogeneity for the clones isolated from the Colombian strain, support the suggestion that the presence of a *principal clone* may be influencing the behavior of Type III strains that circulate in a given endemic area. The predominance of the same type of strain has been recently confirmed by Rodriguez *et al*¹⁶, studying 13 strains from Colombia, and showing that all of them belong to zymodeme Z1 and conform only one cluster by analysis of the dendogram.

The zymodeme Z1 is recognized as representing a sylvatic origin of the parasite⁸ but with presence in the domestic environments. Humans infected with this type of strain have already been identified⁵, and this can influence clinico-pathological manifestations and therapeutic responses in Chagas' disease patients, in endemic areas where sylvatic reservoirs or vectors occur. Resistance to chemotherapy observed with the parental strain is shared by each of its clones, as seen in recent studies (in publication). This seems to confirm the clonal homogeneity of the Colombian strain and its influence in the response to treatment, at least when the isolation of clones is performed around the 30th day p.i. The possibility of monoclonality could not be disproved, but the isolation of a limited number of clones could not confirm the absence of different clones not revealed with the technical approaches used in this study.

This does not preclude that different results could be obtained if the isolation of the clones was performed during an earlier phase of the infection. In this sense, new investigations are in course, with the objective of analyzing clones of Type III strains, obtained in the initial phase of infection and to test their sensibility to chemotherapeutics.

The findings of the present study point to an important role of the parasite strain in the course of infection in the vertebrate host, taking into account the predominance of a principal clone with a marked tissular tropism and high pathogenicity and resistance to chemotherapy. This could be responsible for severity of acute illness or explain chronic disease manifestations in patients infected with this type of strain, identified as of sylvatic origin, and corresponding to the proposed taxa *T. cruzi* I¹⁶.

REFERENCES

1. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas Recôncavo baiano (Contribuição ao estudo da patologia geral da doença de Chagas em nosso meio). *Revista de Patologia Tropical* 3:65-121, 1974.
2. Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasites strains and the importance of principal clones. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 (supl 1): 185-187, 1999.
3. Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gazeta Médica da Bahia* 70:32-42, 1970.
4. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benzonidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin of the World Health Organization* 63:721-726, 1985.
5. Andrade SG, Rassi A, Magalhães JB, Ferrioli Filho F, Luquetti, AO. Specific chemotherapy of Chagas' disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 86:624-626, 1992.
6. Andrade SG, Silva AA, Carvalho ML, Figueira, RM. Comportamento de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros de baixa resistência. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 14:154-161, 1972.
7. Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 77:796-799, 1983.
8. Barrett TV, Hoff RH, Mott KE, Miles MA, Godfrey DG, Teixeira R, Almeida Souza JAA, Sherlock IA. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brasil. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74:84-90, 1980.
9. Campos RMF, Andrade SG. Characterisation of subpopulations (clones and subclones) of the 21 SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 91:795-800, 1996.
10. Campos RMF, Gonçalves MS, Reis EAG, Reis MG, Andrade SG. Comparative analysis by polymerase chain reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones: possibility of predominance of a principal clone in this area. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:23-29, 1996.
11. Dvorak JA. Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and Why? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 18 (supl):29-38, 1985.
12. Federici EE, Abelman WB, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 13:272-280, 1964.
13. Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitology Today* 14:119-123, 1998.
14. Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Póvoa M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 74:221-237, 1980.
15. Momem H. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi*: a commentary on characterization and nomenclature. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 94:181-184, 1999.
16. Rodríguez P, Montilla M, Nicholls S, Zarante I, Puerta C. Isoenzymatic Characterization of Colombian Strains of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93:739-740, 1998.
17. Silva LHP, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clinica et Biologica* 20:191-208, 1953.
18. Tibayrenc M, Ayala FJ. Isozymic variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. *Evolution* 42:277-292, 1988.
19. Tibayrenc M, Brenière SF. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than zymodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83(supl 1): 249-255, 1988.
20. Tibayrenc M, Ward P, Moya A, Ayala FJ. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings of the National Academy of Science of USA* 83:115-119, 1986.

APÊNDICE B

ORAL TRANSMISSION OF CHAGAS DISEASE: IMPORTANCE OF *Trypanosoma cruzi* BIODEME IN THE INTRAGASTRIC EXPERIMENTAL INFECTION

Edson Luiz P. CAMANDAROBA, Clarissa M. PINHEIRO LIMA & Sonia G. ANDRADE

SUMMARY

Oral transmission of *Trypanosoma cruzi* has been suspected when epidemic episodes of acute infection were observed in areas devoid of domiciled insect vectors. Considering that the distribution of *T. cruzi* biotopes differs in sylvatic and domestic cycles, results of studies on biotopes can be of interest regarding oral transmission. The infectivity of *T. cruzi* strains of different biotopes was tested in mice subjected to infection by the digestive route (gavage). Swiss mice were infected either with the Peruvian strain (Biotope Type I, Z2b) or the Colombian strain (Biotope Type III, Z1, or *T. cruzi* I); for control, intraperitoneal inoculation was performed in a group of mice. The Colombian strain revealed a similar high infectivity and pathogenicity when either route of infection was used. However, the Peruvian strain showed contrasting levels of infectivity and pathogenicity, being high by intraperitoneal inoculation and low when the gastric route was used. The higher infectivity of the Colombian strain (Biotope Type III) by gastric inoculation is in keeping with its role in the epidemic episodes of acute Chagas disease registered in the literature, since strains belonging to Biotope III are most often found in sylvatic hosts.

KEYWORDS: *Trypanosoma cruzi*; Oral transmission; Experimental intragastric infection; *T. cruzi* strains infectivity; Biotopes.

INTRODUCTION

Although the vectorial transmission of Chagas disease by the domiciliated vector (*Triatoma infestans*), has been successfully controlled in Brazil, other ways of contamination can be responsible for new cases of infection with *T. cruzi*, as for example, by the digestive route. The contamination of foods by sylvatic vectors and vertebrate reservoirs of *Trypanosoma cruzi* is probably an important factor for the digestive transmission of Chagas disease. Epidemic episodes of human disease, that has been attributed to the oral infection have been registered in Teutonia - RS^{10,11}, and Catolé do Rocha - PB¹⁴. More recently, several episodes have been identified in the Brazilian Amazonia^{5,15,16,17}.

The factors responsible for the high infectivity of the ingested parasites are not well known. The occurrence of severe cases of infection, leading to death of a percentage of infected individuals^{11,12,14}, indicates a high pathogenicity of the parasites and its capacity to penetrate through the gastric mucosa, even after passing through the gastric acid contents. The influence of the parasite strain during oral transmission, has not been previously considered but it probably is an important one. In the sylvatic hosts there is a predominance of Zymodeme I of *T. cruzi*^{4,9} which corresponds to the Biotope Type III³. The occurrence of Z1 strains in the sylvatic reservoirs has been confirmed by ZINGALES *et al.*¹⁸ by ribosomal characterization, resulting in their inclusion into the *T. cruzi* I group¹³. This suggests the possible involvement of the Type III, Z1 strains

in the epidemic episodes of oral transmission registered in the literature. The study of three strains sent to us by S.A. Valente, isolated from infected patients from one epidemic episode in Icoaraci - Pará⁵ revealed the Biotope Type III, Z1 (Pará strains)³; the same happened with five strains from Catolé do Rocha - PB¹⁴ that have been given to us by C. M. Brizola and also characterized as Type III, Z1 (Paraíba strains)³. These are indirect evidences of the involvement of sylvatic strains in the described epidemic episodes.

In the present study we intend to experimentally investigate the influence of the biotopes of *T. cruzi* in the digestive transmission of Chagas disease, taking into account the infectivity and pathogenicity revealed by different strains, during intragastric infection. With this objective, the Peruvian strain, biotope type I and the Colombian strain, biotope Type III were used. Both strains produce intense lesions in the experimental animal when applied by the intraperitoneal route. It is interesting to investigate their pathogenicity, after the intragastric inoculation, by evaluating the evolution of infection as well as tissue lesions and parasite burden in different organs, in comparison with the intraperitoneal route.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals - Outbred Swiss mice weighing from 15 to 20 g, reared in the Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, were used in the

present investigation. The maintenance of the experimental animals complies with the guide lines for the human use of laboratory animals.

Experimental groups - The mice were divided into two main groups:

Group I - 75 mice infected with the Colombian strain (Type III, Z1, *T. cruzi* I). This group was divided into two subgroups:

Ia - 25 mice infected by intraperitoneal (IP) route.

Ib - 50 mice infected by intragastric (IG) route.

Normal controls - 15 uninfected mice in which IG administration of PBS has been performed.

Group II - 40 mice infected with the Peruvian strain (Biodeme Type I, Z2b). This group was divided into two subgroups:

IIa - 18 mice infected by IP route.

IIb - 22 mice infected by IG route.

Normal controls - 10 uninfected mice, receiving IG administration of PBS.

Inocula - Trypomastigote forms were obtained from the blood of infected mice; after centrifugation at 1,500 g for separation of blood elements, the supernatant was washed with PBS, pH 7.3 and centrifugation at 4,500 g; the pellet was suspended in PBS pH 7.3 and trypomastigotes were counted in a Neubauer chamber. The inoculum was adjusted to 5×10^4 trypomastigotes in 0.2 ml.

For IG inoculation, the mice were maintained starved for 12 hours. Infection was performed by gavage, with a special needle (*Biomedical Needles, Popper & Sons, Inc.*), being injected into the stomach 1.0 ml of a suspension containing 0.2 ml of the inoculum diluted in 0.8 ml of PBS, pH 7.3. Uninfected controls received 1.0 ml of PBS by IG inoculation. The IP inoculation was performed with 0.2 ml of the inoculum.

Parasitemia - The media of the number of trypomastigotes counted in the peripheral blood of 5 animals, in 50 microscopic fields of 400 X represented the daily parasitemia.

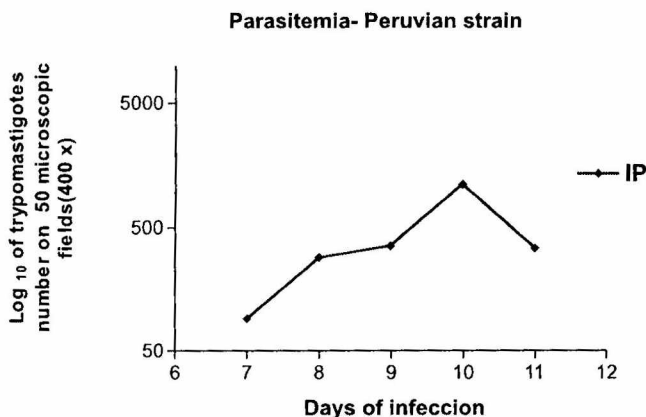


Fig. 1 - Parasitemic levels in mice infected by intraperitoneal route with the Peruvian strain of *T. cruzi*.

Histopathological study - The animals infected with the Peruvian strain were sacrificed at the 7, 8, 9, 10, 12 days post-inoculation, three animals in each point.

The mice infected with the Colombian strain were sacrificed in the 15th, 20th, 25th and 30th day post-infection.

Sections of the heart, skeletal muscle, liver and spleen as well as sections of the stomach, esophagus, peri-esophageal and peri-cardiac mediastinal loose connective tissue, were fixed in 10% Formalin and paraffin embedded. Sections 5 μ m thick, were stained with Hematoxylin and Eosin for histopathological study.

RESULTS

I - Infection with the Peruvian strain

Parasitemia - In mice infected by IP route, parasitemia attained the peak at the 10th day of infection (Fig. 1), and decreased rapidly as expected to Biodeme Type I. In mice infected by IG route the parasitemia persisted subpatent until the 9th and 10th day of infection when it became positive at very low levels, followed by negativation (data not shown).

Mortality - In the group infected by IP route a 100% mortality occurred until the 14th day post-infection. In mice infected by IG route mortality was of 20% until the 21st day of infection.

Histopathological study

Infection with the Peruvian strain given by the intraperitoneal route (Table 1) - An intense and early involvement of the spleen and liver with evident macrophagotropism was seen from the 7th to the 9th day post infection. An intense hyperplasia of the germinal centers of lymphoid follicles of the spleen was present, with vacuolated macrophages containing intracellular parasites (Fig. 3A). The liver showed mononuclear infiltrates in the parenchyma and the presence of amastigotes in Kupffer cells. By the 10th and 11th days post-infection the myocardium and skeletal muscle presented moderate to intense

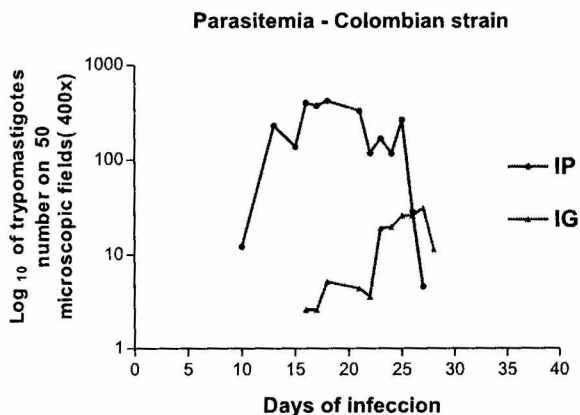


Fig. 2 - Parasitemic levels in mice infected with the Colombian strain of *T. cruzi* by the intraperitoneal (IP) route and by the intragastric (IG) route.

inflammatory infiltration, necrosis of cardiac and skeletal myocytes and the presence of intracellular amastigotes (Fig. 3-B,C). Sections of the esophagus and stomach showed normal structure, without parasites (Fig. 3-D). Amastigotes nests were rarely seen within the muscle layer of these organs. The periesophageic and pericardiac mediastinal loose connective tissue showed diffuse mononuclear infiltrate and the presence of amastigotes in the cytoplasm of adipocytes and macrophages.

Infection with the Peruvian strain given by intragastric route (Table 2) - From the 7th to the 10th day of infection the tissue alterations were limited to a mild to moderate hyperplasia of the lymphoid follicles of the spleen with the presence of vacuolated macrophages containing cells debris (Fig. 3-E) and the presence of scarce parasites at the 11th day. Focal mononuclear infiltrates were seen in the liver parenchyma. The myocardium showed mild focal mononuclear infiltrates that increased by the 11th day, in the absence of parasites (Fig. 3-F). A mild to moderate interstitial infiltrate was seen in skeletal muscle, without parasites (Fig. 3-G). In sections of the esophagus and stomach a diffuse mononuclear infiltration of the mucosal and submucosal layers was seen, without parasites (Fig. 3-H).

Normal controls - Sections of the several organs did not show histopathological alterations.

II - Infection with the Colombian strain

Parasitemia - Fig. 2 shows the evolution of the parasitemia in the mice infected by IP and by IG routes. In both groups parasitemia increased progressively from the 10th day of infection, with maximal peak between the 20th and 30th days. Significant differences were observed between the higher levels attained in those infected by IP route as compared with the IG route.

Mortality rates - It was of 10% until the 30th day of infection in the mice infected by IP route and of 0% in the infected by IG route.

Histopathological study

Infection with the Colombian strain given by the intraperitoneal route (Table 3) - Inflammatory lesions and parasitism were predominant in skeletal muscle and myocardium. The alterations became evident by the 14th day and turned most intense in 20 to 25 days post-infection, showing intense focal inflammatory infiltrates in the myocardium, corresponding to necrosis of parasitized myocytes and diffuse interstitial mononuclear infiltration (Fig. 4A). Skeletal muscles presented intense inflammatory lesions, with focal destruction of parasitized fibers (Fig. 4-B,C). The spleen showed mild hyperplasia of the lymphoid follicles and the liver presented scarce mononuclear infiltrates in the parenchyma in the absence of parasites. The study of the mucosal and submucosal layers of esophagus and stomach, showed normal aspects in most cases, and rarely a mild mononuclear infiltrate was seen (Fig. 4-D). The muscle layer of the stomach and esophagus, occasionally showed the presence of intracellular amastigotes, without inflammatory reaction. The pericardiac and periesophageic mediastinal loose connective tissue did not show inflammatory lesions, nor the presence of parasites.

Infection with the Colombian strain given by intragastric route (Table 4) - Inflammatory lesions of the myocardium and skeletal muscles were absent by the 14th day of infection and became evident and intense from

the 20th day on. In the myocardium, the presence of intracellular amastigotes was frequent, with necrosis of parasitized cells and focal mononuclear infiltrates. Diffuse moderate to intense interstitial infiltration was also seen (Fig. 4-E, F). Skeletal muscle sections showed moderate to intense parasitism with necrosis of parasitized myocytes, focal and diffuse inflammatory infiltration (Fig. 4-G). The spleen showed mild hyperplasia of lymphoid follicles and mild mononuclear infiltrates in the hepatic parenchyma, without parasites. Sections of the esophagus and stomach revealed in all cases the presence of moderate to intense mononuclear infiltration of the mucosal and submucosal layers, without parasites (Fig. 4-H).

Normal controls - The several examined organs did not show histopathological alterations.

DISCUSSION

The possibility of oral transmission of *T. cruzi* infection has been confirmed by different authors^{1,7,8}, however little is known about the role of the strain of the parasite. Results of the present study have indicated a clear difference in infectivity of two different strains of *T. cruzi*, when inoculated by the intragastric route. These strains are highly pathogenic for mice and this has been confirmed in the present paper when the animals were infected by the intraperitoneal route. However the direct intragastric instillation of the parasites suspension in PBS, into direct contact with the gastric juice, has clearly influenced the infectivity of the parasites. The Peruvian strain, highly virulent when injected intraperitoneally, produces in mice high levels of parasitemia and intense macrophagotropism; this same strain determined very low levels of parasitemia by intragastric infection, with low parasitism of macrophages and mild to moderate tissue lesions. The Colombian strain, on the contrary, determined intense myotropism, with involvement of myocardium and skeletal muscle in mice infected by intragastric route, being the tissue lesions comparable to those seen in mice infected by the intraperitoneal route, although with a delay in the evolution and lower levels of parasitemia. The presence of parasites into the gastric or esophageal mucosa, necessary to confirm its invasion by *T. cruzi*, has not been detected. However the presence of significant inflammatory mononuclear infiltrate, more evident in the gastric-esophageal transition, may represent an evidence of invasion. HOFT *et al.*⁷ infected mice by oral route and shown the presence of parasites and mononuclear infiltrates within the gastric mucosa; the cellular infiltration was attributed to the immune response of the mucosa, stimulated by the presence of *T. cruzi*⁷.

The present findings are in accordance with the clinico-epidemiological observations that considered the familial epidemic episodes in the Amazonic regions resulting from the ingestion of food contaminated with the excreta of sylvatic vertebrates and vectors, as reviewed by VALENTE *et al.*¹⁵. These findings suggest that strains more adapted to the sylvatic cycle are involved in these episodes. This is most probable considering that the marsupials lodge *T. cruzi* in its evolutive stages, into the anal glands, and thus could spontaneously eliminate them to the exterior⁶. These clinico-epidemiological observations, match well with the findings of the present study, that shows the maintenance of the pathogenicity of the Colombian strain (prototype of biotipo Type III) by intragastric infection, as compared with the Peruvian strain (Biotipo Type I). This indicates that the digestive infection could be considered as an important way of transmission of *T. cruzi*, in the geographical regions

Table 1
Degree of histopathological lesions and parasitism in mice infected with the *Peruvian* strain of *T. cruzi* by *intraperitoneal* route

Days of infection	Spleen		Liver		Myocardium		Skeletal Muscle	
	LyFH*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*
7 th	+	--	+	--	--	--	--	--
9 th	++	+/+++	+/+++	+/+++	+	+	--	--
10 th	++/+++	++/+++	++	+/+++	++/+++	+/+++	+/+++	+/+++
11 th	++/+++	++/+++	++	++/+++	++/+++	++/+++	+/+++	+/+++

LyFH = Lymphoid follicles hyperplasia; Paras = Parasitism; Infl. Infiltr = Inflammatory infiltration; (--) negative; (+) mild degree; (++) moderate degree; (+++) intense degree; * from / to

Table 2
Degree of histopathological lesions and parasitism in mice infected with the *Peruvian* strain of *T. cruzi* by *intragastric* route

Days of infection	Spleen		Liver		Myocardium		Skeletal Muscle	
	LyFH*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*
7 th	+	--	--	--	--	--	--	--
9 th	+/+++	--	+	--	+	--	--	--
10 th	++	--	+/+++	--	+	--	+	+
11 th	++	+	+/+++	--	+/+++	--	+	+

LyFH = Lymphoid follicles hyperplasia; Paras = Parasitism; Infl. Infiltr = Inflammatory infiltration; (--) negative; (+) mild degree; (++) moderate degree; (+++) intense degree; * from / to

Table 3
Degree of histopathological lesions and parasitism in mice infected with the *Colombian* strain of *T. cruzi* by *intraperitoneal* route

Days of infection	Spleen		Liver		Myocardium		Skeletal Muscle	
	LyFH*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*
14 th	+	--	+	--	+	--	+	--
20 th	+	--	+	--	++/+++	++/+++	+/+++	++/+++
25 th	+/+++	--	+/+++	--	++/+++	+/+++	++/+++	+
30 th	+	--	++	--	+++	+/+++	+++	+/+++

LyFH = Lymphoid follicles hyperplasia; Paras = Parasitism; Infl. Infiltr = Inflammatory infiltration; (--) negative; (+) mild degree; (++) moderate degree; (+++) intense degree; * from / to

Table 4
Degree of histopathological lesions and parasitism in mice infected with the *Colombian* strain of *T. cruzi* by *intragastric* route

Days of infection	Spleen		Liver		Myocardium		Skeletal Muscle	
	LyFH*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*	Infl. Infiltr*	Paras*
14 th	+	--	+	--	+/+++	+	++	+
20 th	++	--	++	--	+++	++/+++	+++	++/+++
25 th	+	--	++	--	+/+++	+/+++	+/+++	++/+++
30 th	+	--	++	--	+++	+/+++	+/+++	++

LyFH = Lymphoid follicles hyperplasia; Paras = Parasitism; Infl. Infiltr = Inflammatory infiltration; (--) negative; (+) mild degree; (++) moderate degree; (+++) intense degree; * from / to

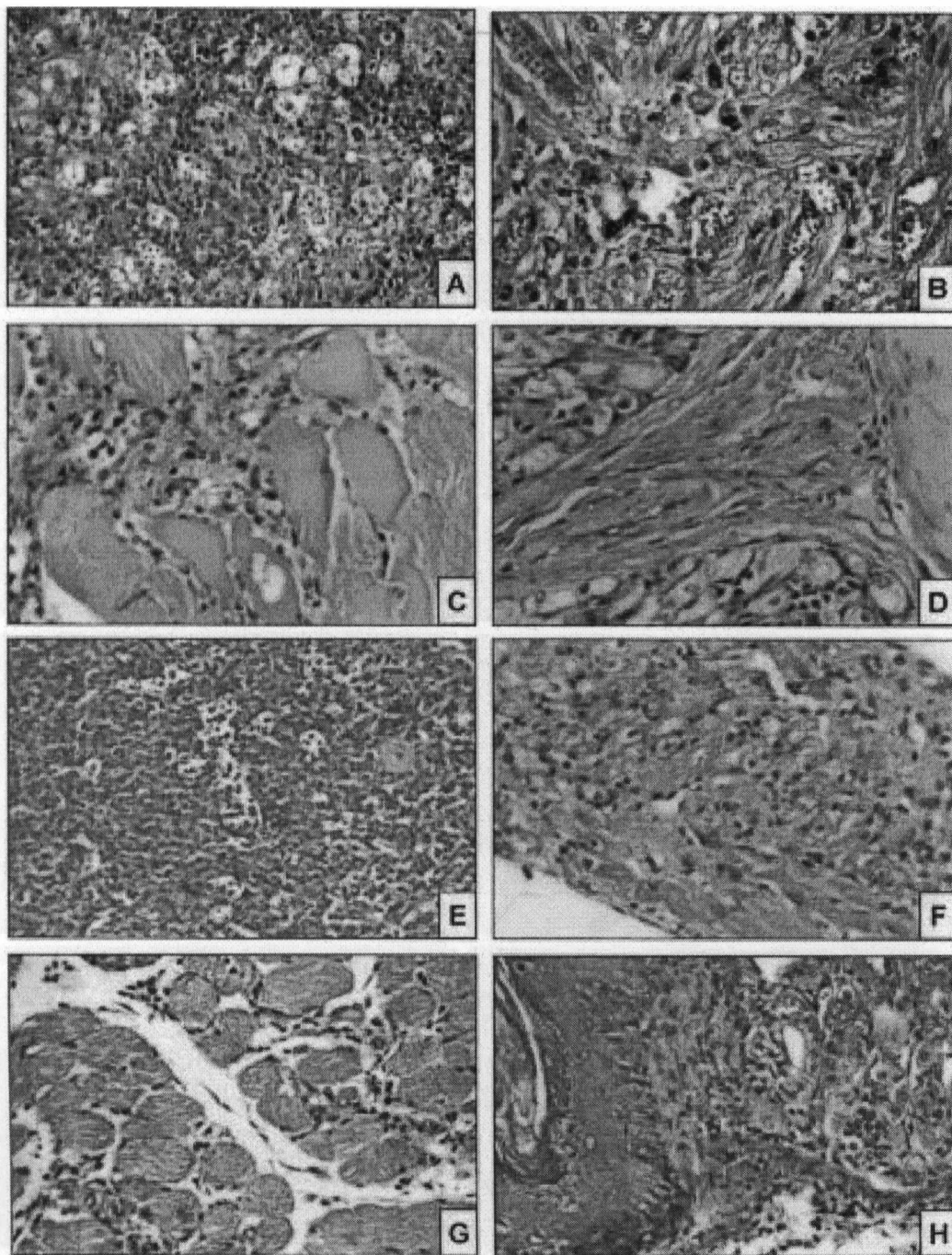


Fig. 3 - Histopathological aspects observed in mice infected with the Peruvian strain. A to D - Infection by intraperitoneal route: A - Section of the spleen showing intense hyperplasia of germinal centers of lymphoid follicles with macrophages containing amastigotes of *T. cruzi* and cell debris. H&E, 250X. **B -** Myocardium - moderate myocarditis, presence of parasites into the cardiac myocells and focal necrosis. H&E, 400X. **C -** Skeletal muscle with focal area of necrosis of parasitized fibers and inflammatory infiltration. H&E, 400X. **D -** Section of stomach with normal aspect from a mouse infected by intraperitoneal route. H&E, 400X. **E to H - Infection by intragastric route: E -** Section of the spleen with mild hyperplasia of lymphoid follicles with macrophages containing cell debris, in the absence of parasites. H&E, 250X. **F -** Myocardium with moderate diffuse mononuclear infiltration, without parasites. H&E, 250X. **G -** Skeletal muscle with moderate interstitial mononuclear infiltrate, in the absence of parasites. H&E, 250X. **H -** Section of the stomach at the gastric-esophagic junction, from a mouse infected by intragastric route; presence of an intense and diffuse mononuclear infiltration of the mucosa and submucosa. H&E, 400X.

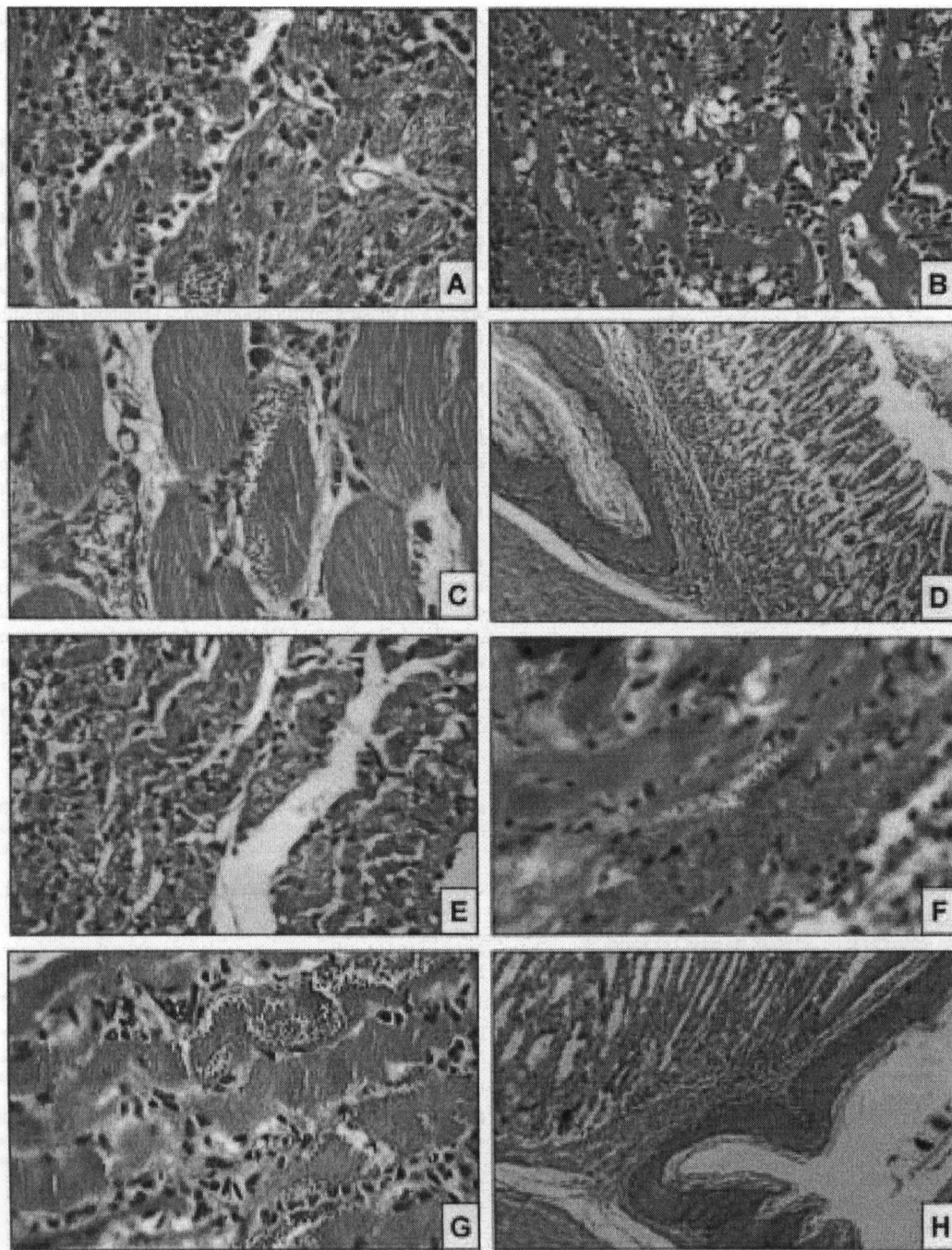


Fig. 4 - Histopathological aspects seen in mice infected with the Colombian strain of *T. cruzi*. A to D - Infection by intraperitoneal route: A - Section of the heart with intense myocarditis and focal necrosis of parasitized cardiac myocytes. H&E, 250X. B - Skeletal muscle showing intense interstitial inflammatory infiltration and the presence of parasites in the cytoplasm. H&E, 250X. C - Skeletal muscle section showing amastigotes in the myocell and interstitial edema and mononuclear infiltration. H&E, 400X. D - Section of the stomach at the gastric-esophageal junction in a mouse infected by intraperitoneal route, showing normal structure. H&E, 100X. E to H - Infection by intragastric route: E - Myocardium with intense interstitial inflammatory infiltration and parasitism of cardiac myocells. H&E, 250X. F - Heart section with intense parasitism of cardiac myocells. H&E, 400X. G - Skeletal muscle section with intracellular amastigotes and interstitial diffuse inflammatory infiltration. H&E, 250X. H - Section of the stomach at the gastric-esophageal junction presenting an intense mononuclear infiltration in the mucosa. H&E, 100X.

in which there are conditions for the contamination of foods or beverages, as referred by SHIKANAI-YASUDA *et al.*¹⁴ and VALENTE *et al.*¹⁵.

RESUMO

Transmissão oral da doença de Chagas: importância do biotopo da *Trypanosoma cruzi* na infecção experimental intragástrica

A ocorrência de microepidemias de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* atribuídas à ingestão de alimentos contaminados com excreta de vetores ou de reservatórios vertebrados, em áreas rurais chamou a atenção para este tipo não vetorial de transmissão da doença de Chagas. Considerando que cepas de diferentes biotopos se distribuem diferentemente nos ciclos silvestre e domiciliar de transmissão, a ocorrência de microepidemias predominantes em áreas próximas aos ecótipos silvestres pode estar relacionada com a cepa do parasito, tendo-se em conta a predominância do Biotopo Tipo III, Z1 nestas áreas. No presente estudo foi investigada a infectividade de cepas do *T. cruzi* de diferentes biotopos quando inoculadas por via digestiva. Foi feita inoculação por via intragástrica (VIG) em camundongos Suíços com a cepa Peruana (Biotopo Tipo I, Z2b) ou com a Colombiana (Biotopo Tipo III, Z1, *T. cruzi* I). Para controle da infecção, camundongos foram também inoculados por via intraperitoneal (VIP). A cepa Colombiana mostrou alta infectividade e patogenicidade tanto por VIP como por VIG. A cepa Peruana apresentou alta infectividade e patogenicidade pela VIP e mostrou baixa infectividade pela VIG. A mais elevada infectividade pela VIG, da cepa Colombiana, cujo biotopo Tipo III, Z1 é o mais freqüentemente encontrado nos hospedeiros silvestres, está de acordo com a ocorrência dos episódios epidêmicos registrados na literatura.

REFERENCES

1. AMATO NETO, V.; MATSUBARA, L.; CAMPOS, R. *et al.* - *Trypanosoma cruzi* in the milk of women with chronic Chagas' disease. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. S. Paulo**, **47**: 10-11, 1992.
2. ANDRADE, S.G. - Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Bahiano. **Rev. Pat. trop.**, **3**: 65-121, 1974.
3. ANDRADE, S.G. & MAGALHÃES, J.B. - Biotopes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **30**: 27-35, 1997.
4. BARRETT, T.V.; HOFF, R.H.; MOTT, K.E. *et al.* - Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia state, Brazil. **Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, **74**: 84-90, 1980.
5. CRESCENTE, J. A.; VALENTE, S. A. S.; VALENTE, V. C. & ARAÚJO, J. A. - Ocorrência de 4 casos agudos de doença de Chagas na vila de Icoaraci-PA. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **25**(supl. 1): 29, 1992. (res. 062).
6. DEANE, M.P.; LENZI, H.L. & JANSEN, A.M. - *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **79**: 513-515, 1984.
7. HOFT, D.F.; FARRAR, P.L.; KRATZ-OWEN, K. & SHAFFER, D. - Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. **Infect. Immun.**, **64**: 3800-3810, 1996.
8. MARSDEN, P.D. - *Trypanosoma cruzi* infections in CFI mice. II. Infections induced by different routes. **Ann. trop. Med. Paras.**, **61**: 62-67, 1967.
9. MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A. & PÓVOA, M. - Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. roy. Soc. trop. Med. Hyg.**, **74**: 221-237, 1980.
10. NERY-GUIMARÃES, F.; SILVA, N. N.; CLAUSELL, D.T. *et al.* - Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrida em Teutônia (Estrela-Rio Grande do Sul). **Hospital (Rio de J.)**, **73**: 1767-1804, 1968.
11. NEVES DA SILVA, N.; CLAUSELL, D. T.; NÓLIBOS, H. *et al.* - Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, **10**: 265-276, 1968.
12. PINTO, A.Y.N.; HARADA, G.S.; VALENTE, V.C. *et al.* - Acometimento cardíaco em pacientes com doença de Chagas aguda em microepidemia familiar, em Abaetetuba, na Amazônia Brasileira. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **34**: 413-419, 2001.
13. RECOMMENDATIONS from a Satellite Meeting. International Symposium to commemorate the 90th anniversary of the discovery of Chagas' Disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94** (suppl. 1): 429-432, 1999.
14. SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A. *et al.* - Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, **33**: 351-357, 1991.
15. VALENTE, S.A.S.; VALENTE, V.C. & FRAIHA NETO, H. - Transmissão da doença de Chagas: como estamos? Considerações sobre a epidemiologia e transmissão da doença de Chagas na Amazônia Brasileira. **Rev. Soc. bras. Med. trop.** **32**(supl. 2):51-55, 1999.
16. VALENTE, V. C.; VALENTE, S.A.S. & PINTO, A.Y.N. - Perfil parasitológico e sorológico em microepidemia familiar de doença de Chagas em Abaetetuba, Estado do Pará. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **34**: 20-21, 2001a.
17. VALENTE, S.A.S.; PIMENTEL, P.S.; VALENTE, V.C. *et al.* - Microepidemia familiar de doença de Chagas em Santarém, primeiro registro no oeste do Pará. **Rev. Soc. bras. Med. trop.**, **34** (supl. 1): 19, 2001b.
18. ZINGALES, B.; STOLF, B.S.; SOUTO, R.P.; FERNANDES, O. & BRIONES, M.R.S. - Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**(suppl. 1): 159-164, 1999.

Received: 08 January 2002

Accepted: 10 April 2002