



**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia Humana**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES  
CLONAIS DE CEPAS DO *Trypanosoma cruzi*: 21SF – BIODEMA TIPO II E  
COLOMBIANA – BIODEMA TIPO III, ISOLADOS DE CAMUNDONGOS  
INFECTADOS, TRATADOS COM BENZONIDAZOL E NÃO CURADOS.**

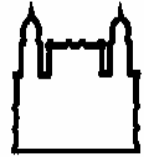
**ISA RITA BRITO DE MORAIS**

**Salvador – Bahia – Brasil  
2012**



**UFBA**

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



**FIOCRUZ**

**Curso de Pós-graduação em Patologia Humana**

**CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES  
CLONAIS DE CEPAS DO *Trypanosoma cruzi*: 21SF– BIODEMA TIPO II E  
COLOMBIANA – BIODEMA TIPO III, ISOLADOS DE CAMUNDONGOS  
INFECTADOS, TRATADOS COM BENZONIDAZOL E NÃO CURADOS**

**ISA RITA BRITO DE MORAIS**

**Orientador: Dr<sup>a</sup> Sonia Gumes Andrade**

Dissertação apresentada ao Colegiado do  
Curso de Pós-graduação em Patologia  
Humana, como pré-requisito obrigatório para  
obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil  
2012

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

Morais, Isa Rita Brito de  
M827c      Caracterização biológica e molecular de populações  
clonais de cepas do *trypanosoma cruzi*: 21SF – biodema tipo II,  
e colombiana – biodema tipo III, isolados de camundongos  
infectados, tratados com benzonidazol e não curados.  
[manuscrito] / Isa Rita Brito de Moraes. - 2012.  
92 f.; 30 cm

Datilografado (fotocópia).

**Dissertação ( Mestrado) – Fundação Oswaldo Cruz,  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Pós-Graduação em  
Patologia, 2012.**

Orientadora: Dr<sup>a</sup>. Sonia Gumes Andrade, Laboratório de  
chagas experimental autoimunidade e imunologia celular.

1. Trypanosoma cruzi 2. Clones. 3. K-DNA 4.  
Esquizodemas I. Título.


CDU 616.937

“CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES CLONAIAS DE  
CEPAS DO *Trypanosoma Cruzi* : 21SF – BIODEMA TIPO II, E COLOMBIANA – BIODEMA  
TIPO III, ISOLADOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS, TRATADOS COM  
BENZONIDAZOL E NÃO CURADOS.”

ISA RITA BRITO DE MORAIS

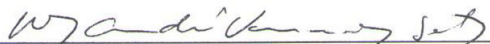
FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



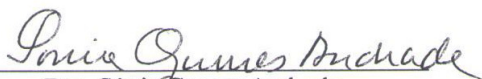
---

Dra. Joice Neves Reis Pedreira  
Professora Adjunto  
UFBA



---

Dr. Marcos André Vannier dos Santos  
Pesquisador Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



---

Dra. Sônia Gumes Andrade  
Pesquisadora Titular  
CPqGM/FIOCRUZ



***“Dedico aos meus pais que me proporcionaram uma vida digna, com exemplos de simplicidade, honestidade e generosidade”.***

*"Melhorar o mundo é melhorar os seres humanos. A compaixão é a compreensão da igualdade de todos os seres, é o que nos dá força interior. Se só pensarmos em nós mesmos, nossa mente fica restrita. Podemos nos tornar mais felizes e, da mesma forma, comunidades, países, um mundo melhor. A medicina já constatou que quem é mais feliz tem menos problemas de saúde. Quando cultivamos a compaixão temos mais saúde."*

*Dalai Lama*

**Senhor!**

**Faze de mim um instrumento da tua paz!**

**onde houver ódio,  
que eu leve o amor  
onde houver ofensa  
que eu leve o perdão,  
onde houver discórdia  
que eu leve a união,  
onde houver dúvidas  
que eu leve a fé,  
onde houver erros  
que eu leve a verdade,  
onde houver desespero  
que eu leve a esperança,  
onde houver tristeza  
que leve a alegria,  
onde houver trevas  
que eu leve a luz!**

**Ó Mestre! Faze que eu procure mais  
Consolar, que ser consolado,  
Compreender que ser compreendido,  
Amar que ser amado...**

**Pois:**

**É dando que se recebe,  
É perdoando que se é perdoado,  
E é morrendo que se vive para a Vida Eterna.**

***São Fransisco de Assis***

## **Agradecimentos à Órgãos e Instituições**

Ao Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/ FIOCRUZ

À Universidade Federal da Bahia

À Faculdade de Medicina da UFBA

Ao Curso de Pós-Graduação em Patologia da UFBA

Ao CNPq – Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

Ao LACEI - Laboratório de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular

Ao LPBM – Laboratório de Patologia e Biologia Molecular

Ao LAPEX – Laboratório de Patologia Experimental

Ao Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz

Ao Laboratório de Histotecnologia do CPqGM / FIOCRUZ

À Biblioteca Interinstitucional Eurydice Pires de Sant´Anna – CPqGM /FIOCRUZ

## **Agradecimentos Pessoais**

À DEUS, pela generosidade de ter me concedido à vida, e à oportunidade me fazer melhor a cada dia.

À toda minha família, por todo amor, convivência e a formação que a mim foi proporcionada.

À Nelson Júnior, pelo companheirismo e cumplicidade nesta jornada.

À todos os meus amigos, por me permitir fazer parte de vida suas vidas.

À minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Sonia Andrade pela oportunidade e exemplos éticos.

Ao Diretor do CPqGM / FIOCRUZ, Dr. Mitermayer Galvão dos Reis

Ao coordenador do Curso de Patologia, Prof. Dr. Luiz Freitas.

Aos meus professores do Curso de Pós – graduação em Patologia.

À Dra Rozalia Campos, pela ajuda desde o início.

À Dra. Joice Neves Reis, pelo auxílio na interpretação dos resultados.

Aos doutorandos Marcos Lázaro e Renata Portela pelo companheirismo e ajuda sempre.

Aos mestrandos Lorena Magalhães, Marcio Cerqueira e Mônica Rebouças por nossa excelente convivência.

À colega Karina Sobral, pela ajuda na formatação dos resultados.

Ao estudante de PIPIC Gyoguevara Patriota, pela ajuda e convivência.

Aos colegas Sr. Juracy Magalhães (*In memoriam*) e à Sra Fátima Magalhães, pelos ensinamentos.

Ao colega Presciano, pelas constantes ajudas com os animais do biotério.

Ao Sr. Antônio do LAPEX, pelo carinho e generosidade.

Às colegas Ariane Pimentel e Dinalva, pela convivência.

À Dra Fabíola Cardillo e seus estudantes.

À todos aqueles que contribuíram de alguma forma para o meu crescimento,

Muito Obrigada !!!

## SUMÁRIO

1. Introdução	1
1.1 A Doença de Chagas	1
1.2 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.3 Heterogeneidade do <i>T. cruzi</i>	3
1.4 O genoma do <i>T. cruzi</i>	4
1.4.1 O DNA do cinetoplasto (K-DNA)	5
1.5. Cepas do <i>T. cruzi</i>	6
1.5.1 Clones do <i>T. cruzi</i>	7
1.6 Caracterização das cepas do <i>T. cruzi</i>	7
1.6.1 Biodemas: caracterização biológica do <i>T. cruzi</i>	8
1.6.2 Zimodemas: estudo isoenzimático de cepas do <i>T. cruzi</i>	9
1.6.3 Esquizodemas: análise molecular do <i>T. cruzi</i>	10
1.6.4 Genótipos de acordo com a taxonomia de 1999: <i>T. cruzi</i> I e II	11
1.6.5 Genótipos de acordo com a taxonomia proposta em 2009	11
1.7 Quimioterapia da Doença de Chagas	12
1.7.1 Susceptibilidade de cepas e clones do <i>T. cruzi</i> quimioterápicos	13
2. Hipótese de Investigação	17
3. Justificativa	18
4 Objetivos	20
4.1 Objetivo Geral	20
4.2 Objetivos específicos	20
5. Considerações Éticas	21
6. Desenho Experimental	22
7. Materiais e Métodos	23
7.1 Animais Experimentais	23
7.2 Cepas do <i>T. cruzi</i>	23
7.3 Grupos Experimentais	23
7.3.1 Testes de cura parasitológicos	24
7.3.2 Parasitemia Direta	24
7.3.3 Xenodiagnóstico	25

7.3.4 Hemocultura Diagnóstica e Sub-inoculação.	25
7.4 Procedimentos experimentais	26
7.4.1 Inóculo	26
7.4.2 Parasitemia	26
7.4.3 Mortalidade Cumulativa	27
7.4.4 Obtenção de parasitos após tratamento quimioterápico	27
7.4.5 Isolamento de Clones	28
7.5 Caracterização Biológica e Molecular dos clones	28
7.5.1 Caracterização Biológica	28
7.5.2 Histopatologia	29
7.5.3 Análise molecular do K-DNA	29
7.5.3.1 Coleta e Preservação das amostras	29
7.5.3.2 Extração do K-DNA	30
7.5.3.3 Amplificação da região variável dos minicírculos do DNA do cinetoplasto pela PCR	30
7.5.3.4 Oligonucleotídeos Sintéticos ( <i>Primers</i> )	31
7.5.3.5 Eletroforese em gel de agarose	31
7.5.3.6 Cortes com enzimas de restrição	32
8 Resultados	33
8.1 Grupo tratado com Benzonidazol e controle não tratado para isolamento dos clones	33
8.1.1 Análise da Parasitemia	33
Cepa Colombiana	33
Cepa 21SF	34
8.1.2 Mortalidade cumulativa	34
Cepa Colombiana	34
Cepa 21SF	35
8.1.3 Resultados dos testes de cura parasitológicos	35
8.1.4 Número de clones obtidos	36
8.2 Análise biológica, histopatológica e molecular dos clones isolados	36
8.2.1 Análise biológica dos clones isolados	36
8.2.1.1 Parasitemia	37



Clones da cepa Colombiana	37
Clones da cepa 21SF	37
8.2.1.2 Mortalidade cumulativa	37
8.2.2 Análise histopatológica	38
8.2.3 Análise molecular do k-DNA dos clones isolados	38
8.2.3.1 Amplificação pela PCR	39
8.2.3.2 Análise pelo polimorfismo no comprimento dos fragmentos de restrição (RFLP)	39
9 Discussão	40
10 Conclusões	47
11 Referências	59
ANEXOS	57 a 92

## RESUMO

### **CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DE POPULAÇÕES CLONAIS DE CEPAS DO *Trypanosoma Cruzi* : 21SF – BIODEMA TIPO II, E COLOMBIANA – BIODEMA TIPO III, ISOLADOS DE CAMUNDONGOS INFECTADOS, TRATADOS COM BENZONIDAZOL E NÃO CURADOS**

ISA RITA BRITO DE MORAIS

As cepas e clones do *Trypanosoma cruzi* apresentam diferentes aspectos de resistência e susceptibilidade aos quimioterápicos. Vários estudos vem sendo desenvolvidos para avaliar a resposta de diversas drogas em diferentes cepas protótipos dos Biodemas tipos I, II e III, de acordo com a caracterização biológica. Resultados vêm demonstrando que cepas protótipos do Biodema Tipo I (cepas Y e Perunana) apresentam uma alta susceptibilidade ao tratamento com Benzonidazol e Nifurtimox; cepas do Biodema Tipo II (protótipo: cepa 21SF) demonstram média susceptibilidade; as cepas do Biodema Tipo III (cepa Colombiana) são altamente resistentes. Considerando que as cepas do *T.cruzi* são populações multiclonais complexas, que diferem nas suas características genéticas e biológicas, clones de duas cepas do *T.cruzi* foram avaliadas com o objetivo de investigar se o uso da quimioterapia anti-*T.cruzi* poderia estar levando à seleção de clones resistentes que poderão ou não diferir nos seus caracteres biológicos e moleculares. No presente trabalho investigamos os caracteres biológicas e moleculares de clones da cepa Colombiana (Biodema Tipo III) e 21SF (Biodema Tipo II) do *T. cruzi*, isolados de animais *tratados e não curados* em comparação com clones isolados de animais não tratados, com o intuito de investigar se estes clones resistentes à quimioterapia apresentavam diferenças em suas características que pudessem estar justificando tal resistência. Para isto, 18 clones foram isolados de camundongos infectados da cepa Colombiana e 8 clones foram isolados de camundongos infectados com a cepa 21SF. Os resultados mostraram que as características biológicas dos clones isolados da cepa Colombiana foram mantidas; clones da cepa 21SF mostraram diferentes níveis de parasitemia quando comparados com a cepa parental. As características moleculares foram avaliadas a partir dos fragmentos do k-DNA de cada clone isolado, que foram submetidos à técnica de RFLP, utilizando as enzimas de restrição RSA I, HINF I e ECO RI. A análise dos fragmentos de restrição das cepas parentais e dos respectivos clones demonstrou grande similaridade entres os mesmos. A possibilidade de investigar a estrutura molecular utilizando outras técnicas moleculares, poderá contribuir para demonstrar diferenças na resistência dos clones isolados de animais tratados e não não curados, como visto na discussão.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*; Clones; K-DNA; Esquizodemas.

## ABSTRACT

### **BIOLOGICAL AND MOLECULAR CHARACTERIZATION OF CLONAL POPULATIONS OF *Trypanosoma cruzi*: 21SF – BIODEME TYPE II AND COLOMBIAN STRAIN – BIODEME TYPE III, ISOLATED FROM INFECTED MICE, TREATED WITH BENZONIDAZOLE AND NOT CURED.**

ISA RITA BRITO DE MORAIS

Different strains and clones of *Trypanosoma cruzi* present different degrees of susceptibility to treatment with chemotherapeutic drugs. Several studies have been developed to evaluate the response to different drugs concerning the strains prototypes of the Biodemes Types I, II and III according to the biological characterization. Results have shown that the strains prototypes of the Biodeme Type I (Y and Peruvian strains) disclosed a high susceptibility to treatment with Benznidazole and Nifurtimox; strains of the Biodeme Type II (prototype: the 21SF strain) showed a medium susceptibility; the strains of the Biodeme Type III (Colombian strain) were highly resistant. However a variability was detected according to the phase of infection in which the clones were isolated, and varied from 0% to 23,5% for the clones isolated in an early phase and 0% to 16.0% for those isolated in a late phase of infection. This indicates that the clonal populations could differently respond in different phases of treatment. In the present study we investigated the biological and molecular characters of clones of the 21SF strain (Biodeme Type II) and of the Colombian strain (Biodeme Type III) isolated from mice treated with Benznidazole, but not cured, in comparison with clones isolated from untreated mice, with the objective of to investigate possible differences in the biological and molecular characteristics of these resistant clones. For that 18 clones were isolated from mice infected with the Colombian strain and 08 clones isolated from those infected with the 21SF strain. Results have shown that the biological characteristics were maintained in the Colombian strain; clones of the 21SF strain showed different levels of parasitemia as compared with the parental strain. This behavior is peculiar to clones isolated from the 21SF as shown in previous studies with clones isolated from untreated mice. The molecular characteristics were evaluated through the restriction fragment length polymorphism (RFLP) of the k DNA for each isolate clone, using restriction enzymes RSA I, HINF I and ECO RI. Analysis of restriction fragments from the clones and from the parental strains demonstrated a high similarity between them. The possibility of to investigate the molecular structure through other molecular techniques could contribute to disclose differences in the resistant clones isolated from treated uncured mice as seen in the discussion.

Key words: *Trypanosoma cruzi*; Clones; K-DNA; Esquizodemes.

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 A Doença de Chagas

A Doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, é caracterizada por apresentar duas fases com curso clínico bastante variável: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda pode ser sintomática ou assintomática, e inicia-se através das manifestações locais, quando o *T. cruzi* penetra na conjuntiva ocular (Sinal de Romana) ou na pele (chagoma de inoculação). Estas lesões aparecem em 50% dos casos agudos dentro de quatro a dez dias após a picada do inseto, regredindo em um ou dois meses. As manifestações gerais são representadas por febre, edema localizado e generalizado, esplenomegalia, poliadenia, hepatomegalia e, às vezes, insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas. Após a fase aguda, os sobreviventes passam por um longo período assintomático, que é chamada de fase crônica indeterminada (latente) e é caracterizada pelos seguintes parâmetros: positividade de exames sorológicos e/ou parasitológicos; ausência de sintomas e da doença; eletrocardiograma normal; coração, esôfago e cólon radiologicamente normal. Porém, cerca de 30 a 40% destes pacientes, após permanecerem assintomáticos por vários anos, apresentam sintomatologia relacionada com o sistema cardiocirculatório (forma cardíaca), trato digestivo (forma digestiva), ou ambos (forma cardiodigestiva) (NEVES, 2005).

## 1.2 - O *Trypanosoma cruzi*

Após o centenário da sua descoberta por Carlos Chagas em 1909, o *Trypanosoma cruzi*, ainda tem sido encontrado em boa parte dos países americanos. As zonas de maior endemicidade estão na América do Sul, onde os países mais afetados são: Brasil, Argentina, Equador e Venezuela. Estima-se que existam 16-18 milhões de pessoas infectadas com *T.cruzi* e mais de 100 milhões vivem em risco de adquirir a doença em todo o mundo (World Health Organization, 2002).

Este protozoário conhecido por causar alterações celulares, tissulares, patológicas e imunológicas no hospedeiro vertebrado, pertence à Ordem Kinetoplastida > Família Trypanosomatidae > Gênero *Trypanosoma* < secção Stercoraria> Subgênero Schyzotripanum (MYLER, 1993), e apresenta em seu ciclo vital, as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota (Figura 01).

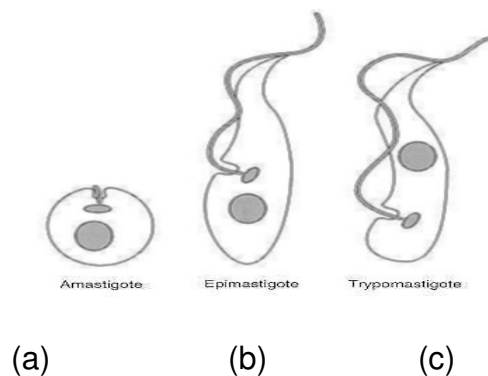


Figura 01- Representação esquemática das formas evolutivas do *T.cruzi*. (a) forma amastigota; (b) forma epimastigota; (c) forma tripomastigota.

Fonte: <http://parasitology.informatik.uni-wuerzburg.de>

Em hospedeiros vertebrados ocorrem tripomastigotas sanguíneas e amastigotas intracelulares, enquanto que em hospedeiros invertebrados e em

meios de cultura predominam as formas epimastigotas que depois passam a tripomastigotas metacíclicos. Quando o inseto suga um vertebrado, ingere formas tripomastigotas sanguícolas, iniciando-se assim o ciclo de desenvolvimento característico da espécie. Na porção anterior do intestino médio do hemíptero, os tripomastigotas sanguícolas transformam-se em epimastigotas. Ao chegarem à porção posterior do intestino médio, encontram um meio favorável, onde se instalam e mantêm a infecção durante toda a vida do inseto, restabelecendo a capacidade reprodutiva do flagelado, através de uma multiplicação ativa por divisão binária. Quando os epimastigotas chegam ao intestino posterior do triatomíneo, depois de algum tempo, sofrem nova diferenciação retomando a forma tripomastigota. A transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (metaciclônogênese) é um passo crucial no ciclo de vida do *T. cruzi* (REY, 2002).

### **1.3 HETEROGENEIDADE DO *Trypanosoma cruzi***

Vários estudos sobre a biologia do *T. cruzi* apontam para uma grande diversidade de comportamento, podendo essa espécie ser encontrada em diferentes hemípteros, reservatórios silvestres e domésticos. Estudos da biologia molecular deste parasito indicam que a reprodução sexuada não ocorre, ou ocorre muito raramente, apontando para o fato de que variações biológicas e genéticas encontradas podem ser explicadas pela evolução independente de múltiplas linhagens clonais (TIBAYRENC et al., 1986).

A observação de formas tripomastigotas no sangue de animais infectados, indica a existência de um polimorfismo no *T. cruzi*. Estudos observaram a existência de cepas que apresentam um predomínio de formas delgadas, outras com predomínio de formas largas e outras, em que, à medida que a infecção se prolonga as formas largas passam a predominar (ANDRADE, 1974).

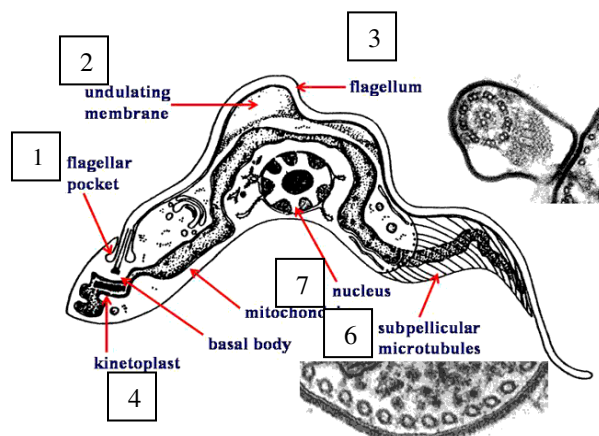


Figura 02 – Representação esquemática da seção longitudinal de um tripomastídeo. (1) Bolsa flagelar; (2) membrana ondulante; (3) flagelo; (4) cinetoplasto; (5) corpo basal; (6) mitocôndria; (7) núcleo; (8) microtúbulos.

Fonte: [www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br)

#### 1.4 - O GENOMA DO *T. cruzi*

Como uma característica de organismos eucariontes, o *Trypanosoma cruzi* apresenta dois genomas: o nuclear e o mitocondrial, sendo este último denominado de K-DNA ou DNA do cinetoplasto (Figura 02).

Uma característica peculiar do genoma do *T. cruzi* é a diploidia no seu número de cromossomos, apesar da reprodução ser basicamente clonal

(TIBAYRENC et al, 1986 ). Nos tripanossomas, esses cromossomos não se condensam completamente durante a divisão celular, o que dificulta a análise citogenética (SOLARI, 1995), devido a diferenças encontradas na histona H1 desses organismos: é menor, dissocia-se facilmente da cromatina e apresenta propriedades hidrofílicas peculiares (ASLUND et al., 1994).

#### **1.4.1- O DNA DO CINETOPLASTO (K-DNA)**

Assim como em outros organismos eucariontes, o *T. cruzi* apresenta em seu compartimento mitocondrial, moléculas circulares de DNA que codificam RNAs ribossômicos e as enzimas envolvidas na respiração celular. Entretanto, diferentemente dos outros eucariontes, o compartimento mitocondrial dos tripanossomas apresenta uma rede formada por milhares de moléculas circulares de DNA denominada cinetoplasto (SIMPSOM, 1987).

O K-DNA é composto por dois tipos de moléculas circulares, que diferem em tamanho e função, denominadas de minicírculos e maxicírculos. Os minicírculos são compostos por regiões conservadas e variáveis, que não codificam peptídeos, e podem variar entre cepas ou isolados do parasito (Figura 03). Estudos demonstraram que sequências variáveis são transcritas gerando pequenos RNAs denominados de RNA guias, que estão envolvidos no processo de editoração dos RNAs das enzimas mitocondriais. Entretanto, nas sequências que compõem os maxicírculos são encontrados os genes que codificam proteínas e rRNAs mitocondriais, assemelhando-se com o DNA mitocondrial dos demais eucariotos (MACINA et al., 1986; SIMPSOM, 1987).



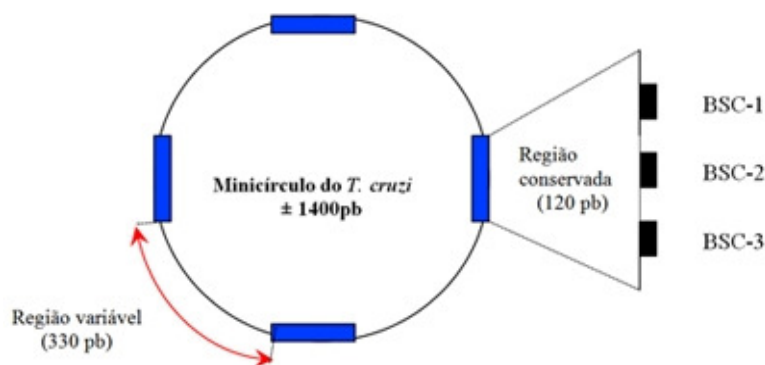


Figura 03 – Representação esquemática do minicírculo mostrando a organização das quatro regiões conservadas (retângulos em azul), de aproximadamente 120 pares de base (pb) cada, contendo os blocos de seqüências mais conservadas da molécula: BSC-1, BSC-2 e BSC-3 (retângulos em preto). As regiões com seqüências hiper-variáveis dos minicírculos de 330 pb (seta em vermelho) encontram-se intercaladas com as regiões conservadas.

FONTE: [www.fiocruz.br](http://www.fiocruz.br)

### 1.5 CEPAS DO *T. cruzi*

São denominadas “cepas” do *Trypanosoma cruzi* amostras isoladas de animais naturalmente infectados, de insetos vetores e de pacientes de diferentes áreas geográficas, que sejam mantidas no laboratório em hospedeiros vertebrados, em insetos vetores, em meios de cultura ou em criopreservação (ANDRADE, 1974). LUMSDEN (1970) definiu “*cepa*”, como “*uma população derivada de um isolado, mantida em cativeiro em reprodução contínua por passagens seriadas, quer mecânica ou cíclica, em cultura ou em animais de laboratório*”.

As cepas do *T. cruzi* são populações multiclonais complexas (TIBAYRENC et al., 1986) que diferem nas suas características genéticas e biológicas, e também no seu comportamento em diferentes hospedeiros vertebrados. Estas cepas representam subespécies, baseada em características intrínsecas como composição antigênica (ANDRADE et al. 1981), suscetibilidade a quimioterápicos ( ANDRADE & FIGUEIRA, 1977 ), padrões isoenzimáticos ( MILES et al., 1980; ANDRADE et al., 1983; TIBAYRENC & AYALA 1988 ) e perfil genômico do kDNA ( MOREL et al., 1980; ÁVILA et al., 1980 ).

#### **1.5.1 CLONES DO *T.cruzi***

O termo *clone* em relação ao *Trypanosoma cruzi*, é utilizado para identificar um isolado originado através da diferenciação mitótica de um único parasito.

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. CAMANDARROBA et al., (2001) analisando sete clones isolados da cepa Colombiana do *T. cruzi*, 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. ANDRADE em 1999, já havia sugerido a presença de clones principais numa mesma área endêmica,

concluindo que os mesmos pudessem ser responsáveis pelas manifestações da doença e resposta quimioterápica em pacientes destas áreas.

CAMPOS & ANDRADE (1996), avaliaram clones e sub- clones da cepa 21SF após longo período de permanência em laboratório com passagens sucessivas, confirmando a estabilidade da cepa e homogeneidade clonal da mesma. Entretanto, mais adiante em 2005, CAMPOS et al. estudando a susceptibilidade à quimioterapia com Benzonidazol de clones desta mesma cepa, observaram uma variabilidade de resposta ao tratamento das populações clonais, sugerindo que esta variabilidade estaria relacionada à resposta quimioterápica com Benzonidazol e Nifurtimox das cepas deste biodema.

#### **1.6 - CARACTERIZAÇÃO DAS CEPAS DO *T.cruzi***

Com o objetivo de compreender as variações de comportamento biológico e o perfil genético das cepas do parasito, diversos estudos que envolvem a caracterização de cepas do *T. cruzi* vêm sendo desenvolvidos por diferentes autores, como serão descritos adiante.

### **1.6.1 - BIODEMAS: CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA DO *Trypanosoma cruzi***

A classificação biológica foi a primeira correlação feita de uma série específica de caracteres morfológicos e comportamentais no *T.cruzi*, sendo recomendada pela World Health Organization em 1986.

Os Biodemas representam Tipos morfológicos e histopatológicos de cepas do *T.cruzi*, descritos por ANDRADE (1974), e que apresentam caracteres biológicos comuns, tropismo tissular diferenciado e lesões histopatológicas características em animais experimentais (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

A classificação das cepas do *T.cruzi* em três diferentes Tipos biológicos foi baseada em diferentes parâmetros como: perfil parasitêmico, morfologia dos parasitos no sangue periférico, virulência, patogenicidade e tropismo tissular. Inicialmente designados apenas como Tipos I, II e III, passaram a partir de 1997 a serem designados como Biodemas Tipos I, II e III. Em resumo, as três características básicas dos três Biodemas são: *Tipo I* – macrofagotropismo na fase inicial da infecção, alta virulência com 100% de mortalidade até 12 dias, máximo de parasitemia do 7º ao 12º dia e predominância de formas delgadas na fase inicial da infecção; *Tipo II* – miotropismo com envolvimento predominante do miocárdio na fase aguda, predominância de formas largas, mas com percentagem significativa de formas delgadas no sangue periférico, piques parasitêmicos do 12º ao 20º dias de infecção, quando a mortalidade atinge o máximo; *Tipo III* – miotropismo, com parasitismo e lesões predominantes em músculo esquelético, predominância de formas largas;

piques parasitêmicos do 25º ao 30º dia pós-infecção ou mais tardiamente e mortalidade baixa até 30 dias.

### **1.6.2 - ZIMODEMAS: ESTUDO ISOENZIMÁTICO DE CEPAS DO *Trypanosoma cruzi***

Os Zimodemas representam três grupos de cepas, baseados no perfil eletroforético de suas enzimas definido por MILES et al. (1980). A partir deste trabalho, caracterizaram mais de 250 cepas isoladas de vários hospedeiros, no Nordeste e Centro do Brasil, pela combinação do padrão eletroforético de ASAT (aspartato aminotransferase), ALAT (alanina aminotransferase), PGM (fosfoglutomutase), GPI (glicose fosfoisomerase), ME (enzima málica) e G6PD (glicose 6-fosfato desidrogenase). A identificação das variações isoenzimáticas das cepas, permitiu caracterizar grupos isoenzimáticos, depois designados como “Zimodemas” (BARRETT et al. 1980, MILES et al. 1980), sendo estabelecidos os Zimodemas 1, 2 e 3 (Z1, Z2, Z3).

ANDRADE et al. (1983), correlacionando os padrões de isoenzimas propostos por MILES et al. (1980) para as enzimas PGM, GPI, ALAT e ASAT, aos Tipos biológicos ou Biodemas, demonstraram que a caracterização biológica tem correspondência com os perfis isoenzimáticos, sendo as cepas Tipo II e Tipo III pertencentes aos zimodemas Z2 e Z1, respectivamente. As cepas do Tipo I não foram enquadradas dentro da classificação proposta por MILES et al. (1980), sendo posteriormente identificadas ao zimodema Z2b .

### 1.6.3 ESQUIZODEMAS: ANÁLISE MOLECULAR DO *Trypanosoma cruzi*

Esquizodema corresponde ao padrão eletroforético das bandas representativas de fragmentos do DNA do cinetoplasto do *T. cruzi*, obtidos pelo tratamento e digestão com endonucleases de restrição do K-DNA. O termo “Esquizodema” foi criado por MOREL et al. (1980) a partir do vocábulo grego: *skhizo*, que corresponde ao português: *esquizar* = separar, dividir, e *demo* = população.

De acordo com MOREL et al. (1986), os perfis eletroforéticos dos esquizodemas, pelo polimorfismo do tamanho de fragmentos de restrição ou RFLP (*restriction fragments length polymorphism*), são marcadores bioquímicos estáveis que podem ser usados para diferenciar populações muito relacionadas de parasitos. Os perfis eletroforéticos são formados por bandas nítidas que diferem no peso molecular e na intensidade, e são derivadas, principalmente, dos minicírculos do K-DNA.

Como citado anteriormente, os primeiros trabalhos foram realizados na década de 80, onde cepas isoladas de diferentes áreas endêmicas foram caracterizadas pelos perfis de isoenzimas em diferentes zimodemas por MILES et al. (1980) e perfil genômico do K-DNA por MOREL (1980). Neste último, foram estabelecidas as características moleculares das cepas do *T. cruzi*, através do estudo eletroforético dos minicírculos do k-DNA, com o uso de enzimas de restrição; o que permitiu estabelecer os esquizodemas, cujos perfis podem diferenciar as cepas, mas não estabelece nenhuma classificação por este método.

#### **1.6.4 - GENÓTIPOS DE ACORDO COM TAXONOMIA DE 1999: *T.cruzi* I *T.cruzi* II**

Durante o simpósio comemorativo dos 90 anos da descoberta da Doença de Chagas na FIOCRUZ do Rio de Janeiro em 1999, foi realizado um “*Satellite Meeting*”, em que uma classificação consensual foi proposta com o objetivo de estabelecer uma distribuição geral das cepas do *T.cruzi* (ANONYMOUS, 1999).

Representantes de diferentes grupos de pesquisa propuseram uma nova classificação para o em *T.cruzi T.cruzi I e T.cruzi II*, procurando incluir além dos parâmetros biológicos, bioquímicos e moleculares já consolidados, as classificações filogenéticas baseadas na análise de multiloci enzimáticos (TIBAYRENC & AYALA, 1988), e as classificações em diferentes linhagens baseadas no DNA ribossomal (SOUTO et al. 1996) e nos genes do mini-exon (FERNANDES et al. 1999a;b).

#### **1.6.5 - GENÓTIPOS DE ACORDO COM TAXONOMIA PROPOSTA EM 2009**

No ano de 2009, em um esforço para atualizar a nomenclatura do *T. cruzi* e melhorar a comunicação dentro da comunidade científica, foi realizado o segundo “*Satellite Meeting*” onde um novo consenso foi proposto para a taxonomia das cepas do *T. cruzi*, baseadas nas DTU's (*discrete typing units*) referidas como *T.cruzi* I a VI, propostas por Tibayrenc (1983) e Brisse (1980) (Zingales et al., 2009).

## 1.7 QUIMIOTERAPIA NA DOENÇA DE CHAGAS

As principais drogas utilizadas no tratamento da Doença de Chagas são o Nifurtimox (nitrofurânico) e o Benzonidazol (nitroimidazólico).

O mecanismo de ação do nifurtimox [3-metil-4(5') nitrofurfurilideno-amino tetrahidro 4H-1, 4-tiazine 1,1 dióxido] envolve a redução do grupo nitro em radicais nitroânions instáveis, que por sua vez reagem para produzir metabólitos de oxigênio altamente tóxicos. O *T.cruzi* tem sido considerado deficiente em mecanismos de desintoxicação para metabólitos do oxigênio, particularmente peróxido de hidrogênio (DOCAMPO, 1990; MARR & DOCAMPO, 1986).

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 à macromoléculas (proteínas, lipídeos, RNA, DNA), diminuindo a sua síntese e aumentando sua degradação (MARR & DOCAMPO, 1986).

Experimentos realizados em epimastigotas da cepa Tulahuén do *T. cruzi* demonstraram que na presença do benzonidazol, metabólitos altamente reativos formam ligações covalentes no nDNA, kDNA, proteínas e lipídeos (DIAZ DE TORANZO et al., 1988).

GOIJMAN & STOPPANI (1985) demonstraram que o benzonidazol é capaz de inibir a síntese de DNA, quebrando a fita de DNA do cinetoplasto e nuclear, formando ligações covalentes com o kDNA, diminuindo a síntese de macromoléculas. A reversão das alterações nas fitas de DNA nuclear e do



cinetoplasto pode ser observada após a incubação em meio de cultura na ausência da droga (GOIJMAN et al., 1985).

### **1.7.1 SUSCEPTIBILIDADE DE CEPAS E CLONES DO *T. cruzi* AOS QUIMIOTERÁPICOS**

A susceptibilidade quimioterápica representa um importante parâmetro para caracterização de cepas, tendo em vista que as mesmas respondem de modo diferente à ação dos quimioterápicos.

Diversos estudos demonstram que cepas e clones do *T. cruzi* apresentam diferentes aspectos de resistência e susceptibilidade aos quimioterápicos. ANDRADE et al. (1975); ANDRADE & FIGUEIRA (1977), ao estudarem a susceptibilidade de cepas ao nifurtimox, demonstraram que cepas de diferentes biotipos respondiam de modo diferente ao tratamento, e que as cepas do Tipo III eram altamente resistentes a este quimioterápico. Posteriormente, o estudo comparativo da resposta quimioterápica de diferentes cepas dos biotipos Tipo I, II e III, demonstrou 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. Um outro estudo realizado numa área endêmica na região central do Brasil, demonstrou que houve falha no tratamento realizados em pacientes infectados com cepas do Tipo III, em contraste com o realizados em pacientes infectados com cepas do Tipo II, indicando que a falha no tratamento pode ter sido causada pela presença de clones resistentes ao tratamento quimioterápico, na cepa do *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1992).

ANDRADE et al, (1985) avaliando a resposta ao Benzonidazol e Nifurtimox de diferentes cepas protótipos de biodemas Tipos I, II e III demonstraram que as cepas do Tipo I apresentaram susceptibilidade que variou de 50% a 100%, enquanto que as cepas do tipo II apresentaram susceptibilidade que variou de 12,5 % a 100%, e as do tipo III, de 0% a 16%. Entretanto, quando os camundongos foram infectados com a cepa Colombiana (Tipo III) e submetida ao tratamento com MK-436 (2,5-nitroimidazole) os índices de animais curados variaram de 80 a 100% (ANDRADE et al,1997). TOLEDO et al. (1997) estudando cepas isoladas de pacientes humanos, de triatomíneos e de marsupiais didelfídeos do Paraná e de outras regiões do Brasil, mostraram que as cepas apresentaram um gradiente de susceptibilidade que variou de 0% a 100%.

ANDRADE et al. (1992) demonstraram que havia uma correlação de 81,8% entre os resultados do tratamento em pacientes e camundongos, quando fizeram um estudo comparativo das respostas quimioterápicas de pacientes procedentes da região central do Brasil e de camundongos infectados com a cepa destes pacientes.

Os resultados da quimioterapia em camundongos imunossuprimidos e tratados com a droga SCH 56592 (posaconazole) mostraram que a droga foi capaz de induzir cura parasitológica de 50 a 60% independente da cepa, em comparação aos animais tratados com Benzonidazol (MOLINA et al., 2000). Respondem de modo diferente ao Benzonidazol, os isolados obtidos de cães infectados por longo tempo com as cepas Berenice e Colombiana estudados no modelo murino experimental. Os isolados da cepa Berenice exibiram diferentes graus de susceptibilidade, enquanto que os isolados da cepa

Colombiana (Col-A e Col-B) não responderam ao tratamento (VELOSO et al., 2001).

Entretanto, clones isolados da cepa Colombiana do *T. cruzi* altamente resistente ao Benzonidazol em duas diferentes fases da infecção e tratados com o Benzonidazol respondem com diferentes índices de cura variando entre 0% a 23,5% para os isolados na fase precoce (CAMADARROBA & ANDRADE, 2005), e entre 0% e 16,7% nos isolados na fase tardia (CAMANDARROBA et al., 2003), indicando que as populações clonais permanecem resistentes durante o curso da infecção, com aumento discreto do índice de cura quando tratamento foi feito na fase precoce (10º dia de infecção).

Ao analisar o resultado da quimioterapia com Benzonidazol, VELOSO et al. (2001) obtiveram 0% de cura para os isolados da cepa Colombiana, obtidos de cães infectados, e diferentes graus de susceptibilidade para os isolados da cepa Berenice.

Recentemente foi analisada a susceptibilidade ao Benzonidazol de sete clones da cepa Colombiana do *T. cruzi* (biodema Tipo III), verificado que os mesmos apresentaram alta resistência ao Benzonidazol, comparável ao obtido com a cepa parental, sugerindo a predominância de um clone principal muito resistente à quimioterapia nesta cepa (CAMANDARROBA et al., 2003).

CAMPOS et al. (2005) investigando a susceptibilidade ao Benzonidazol de cinco clones da cepa 21SF (biodema Tipo II) observaram que os índices de cura variaram de 30% a 100% para os clones, e 25% para a cepa parental, confirmando achados anteriores que demonstram que cepas e clones pertencentes a este biodema apresentam uma média susceptibilidade ao tratamento com este quimioterápico.

Como citado anteriormente, as drogas nitroheterocíclicas como Benzonidazol inibem a síntese de DNA, RNA e proteínas (GOIJMAN & STOPPANI, 1985) e causam lesão reversível no DNA (GOIJAMAN et al, 1985); portanto é do nosso interesse investigar se clones isolados da cepa Colombiana do *T.cruzi* resistentes ao Benzonidazol, apresentam polimorfismos nas suas seqüências, localizadas nas regiões variáveis dos minicírculos do K-DNA.

MARRETTO & ANDRADE (1994) com o intuito de observar se cepas após tratamento quimioterápico poderiam apresentar alterações nos seus padrões enzimáticos, analisaram o padrão de isoenzimas de cepas protótipos dos biotemas Tipos I, II e III isoladas de camundongos tratados com Benzonidazol e não curados, em comparação com os isolados dos controles não tratados, e comprovaram que os perfis isoenzimáticos eram idênticos nos dois grupos, demonstrando que não houve seleção clonal detectável ou alterações nos marcadores genéticos do parasito. No presente trabalho, selecionamos clones de animais infectados com a cepa Colombiana e 21SF tratados com Benzonidazol e não curados, com o intuito de observar se esses clones que ultrapassaram a barreira quimioterápica apresentam polimorfismos no padrão do K-DNA, em comparação com clones isolados de animais controles não tratados, através da técnica de RFLP

## **2. HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO**

Considerando as cepas do *T.cruzi* como policlonais e a homogeneidade ou a heterogeneidade dos clones, com a presença de um clone principal, levanta-se a hipótese de que o uso de quimioterápicos anti -*T.cruzi* poderá levar à seleção de clones resistentes que poderão ou não diferir da cepa parental nos seus caracteres biológicos e moleculares.

### 3. JUSTIFICATIVA

A cepa Colombiana do *T. cruzi* tem mostrado uma alta resistência aos quimioterápicos, o que já foi comprovado anteriormente por ANDRADE & FIGUEIRA (1970); ANDRADE & MAGALHÃES (1997). Entretanto, observa-se que os animais infectados com diferentes cepas do *T. cruzi* e tratados, apresentam logo após início do tratamento uma queda da parasitemia a qual no espaço de três dias chega a níveis muito baixos ou sub-patentes. Apesar disso, em alguns animais não há cura parasitológica, indicando a persistência de parasitos que não respondem ao tratamento. Achamos que, a queda inicial da parasitemia pode significar que existam clones que respondem bem ao tratamento, permanecendo aqueles que são altamente resistentes. Desse modo, é de interesse investigar se os parasitos que permanecem durante o período prolongado de tempo pós-tratamento, apresentariam diferenças moleculares quando comparados com os clones não tratados.

Em trabalho anterior, MARRETO & ANDRADE (1994) investigando as características isoenzimáticas do *T. cruzi* em camundongos infectados e tratados com Benzonidazol e Nifurtimox, demonstraram que não havia diferenças fenotípicas das isoenzimas entre os grupos tratados e os controles não tratados.

No presente trabalho, utilizaremos os clones isolados da cepa Colombiana e 21SF do *T. cruzi*, procurando verificar os caracteres genéticos de parasitos isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados.

O presente estudo permitirá esclarecer se os clones embora biologicamente semelhantes, podem apresentar diferenças genéticas responsáveis pela maior ou menor resistência ao tratamento.

Estudos experimentais chamam a atenção para a resistência e/ou susceptibilidade das cepas e clones do *T.cruzi*. ANDRADE et al (1992), em estudo clínico experimental de onze cepas do *T.cruzi*, isoladas por xenodiagnóstico e por subinoculação a partir de pacientes desta mesma região (central do Brasil), e que foram submetidos à quimioterapia, revelou uma taxa similar entre pacientes e camundongos, uma coincidência de 80%.

Neste tocante, os achados dessa investigação poderão contribuir para uma melhor interpretação dos estudos experimentais, assim como, dos casos clínicos observados nas manifestações da doença de Chagas.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os caracteres biológicos e moleculares de clones da cepa Colombiana e da cepa 21SF do *T. Cruzi* isolados de camundongos tratados com Benzonidazol e não curados, em comparação aos clones isolados de animais controles não tratados.

### 4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

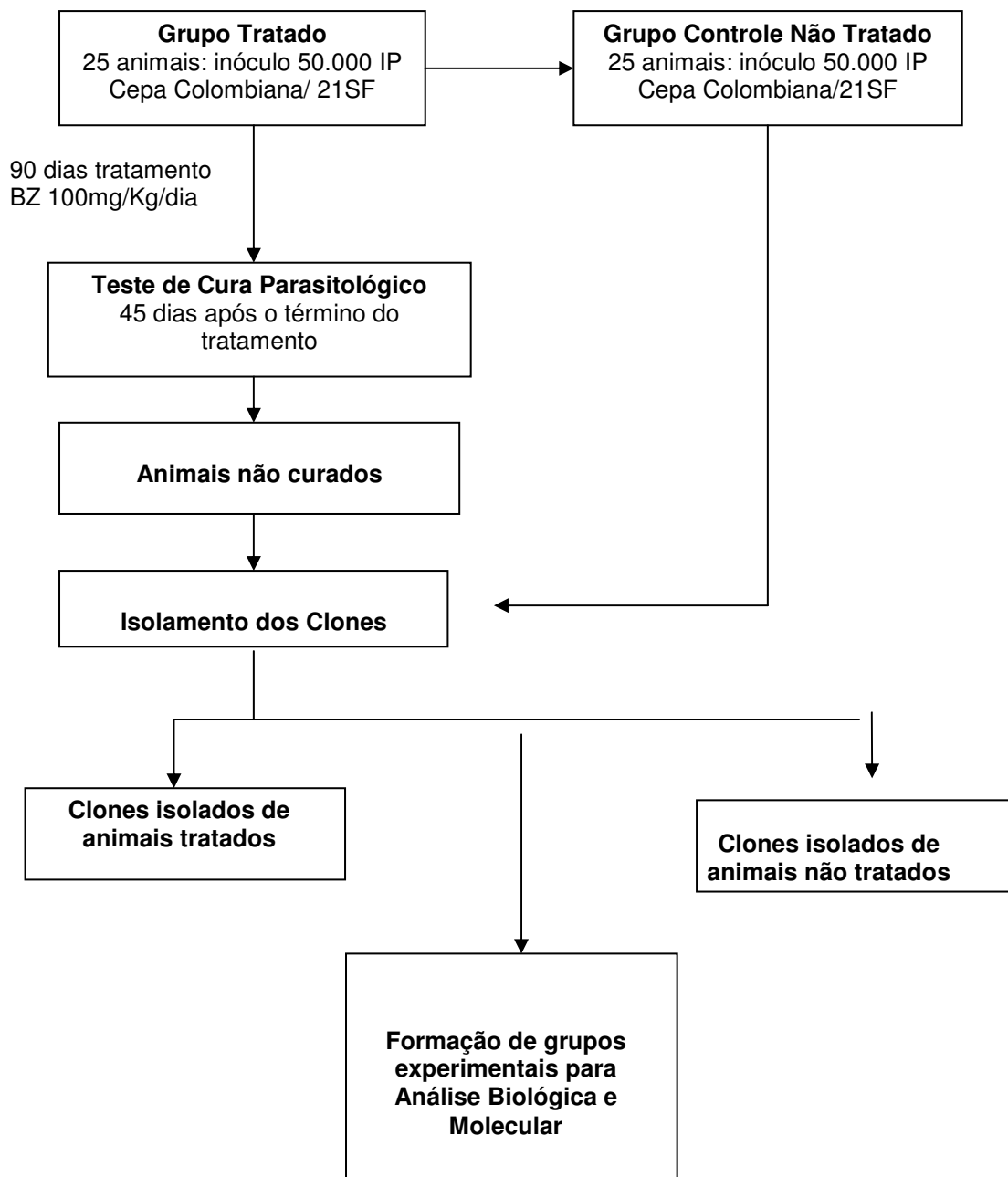
- Submeter ao tratamento com Benzonidazol os camundongos inoculados com a cepa Colombiana, assim como os inoculados com a cepa 21SF do *T. cruzi* e avaliar os índices de cura dos mesmos.
- Obter clones das sub-populações parasitárias de camundongos infectados com a cepa Colombiana e com a cepa 21SF, tratados e não curados; assim como dos animais controles não tratados.
- Fazer a caracterização biológica dos clones isolados.
- Isolar o K-DNA dos clones e determinar a presença de polimorfismo genético entre os mesmos através da técnica do RFLP.



## **5. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

Para realização do presente estudo, o projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA), do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ – Unidade Bahia, sendo seu nº de protocolo 005/2009. Todas as atividades relacionadas ao uso e manipulação desses animais estão de acordo com as normas éticas exigidas pelo referido comitê.

## 6. DESENHO EXPERIMENTAL



## **7. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **7.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS**

Foram utilizados nos grupos experimentais, camundongos suíços albino, não isogênicos, de ambos os sexos com 20 a 25g de peso corporal, mantidos em gaiolas e alimentados com ração padronizada. Esses animais foram cedidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Unidade Bahia. O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA – Protocolo nº 005/2009).

### **7.2 CEPAS DO *Trypanosoma cruzi***

A cepa Colombiana e 21SF do *T. cruzi* utilizadas no presente estudo são mantidas pelo Laboratório de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular. Estas cepas são mantidas tanto por passagens sucessivas em camundongos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/CPqGM/FIOCRUZ, como por criopreservação em nitrogênio líquido.

### **7.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS**

Camundongos previamente infectados com a cepa Colombiana e animais infectados com a cepa 21SF do *T. cruzi* foram eutanasiados. Vinte e cinco camundongos suíços, ambos os sexos, não isogênicos, recém desmamados de 21 dias, foram inoculados via intraperitoneal (IP) com 50.000

formas tripomastigotas sanguícolas da cepa Colombiana do *T.cruzi*. O mesmo foi feito para a cepa 21SF. Estes animais foram submetidos ao tratamento a partir do 18º dia após infecção (animais infectados com a cepa colombiana), e 14º dia (animais infectados com a cepa 21SF), durante 90º dias, administrando 100 mg/Kg/dia de Benzonidazol, por entubação esofágica. Para a formação do grupo controle não tratado, foram utilizados vinte e cinco camundongos suíços, não isogênicos com idade entre 27 a 30 dias de nascidos – foram utilizados animais mais velhos com o objetivo de poder avaliá-los ainda com vida ao final de 90 dias de infecção. Estes animais pertencentes a cada grupo controle (Colombiana e 21SF) foram inoculados via intraperitoneal (IP) com 50.000 formas tripomastigotas sanguícolas das respectivas cepas do *T.cruzi*.

### **7.3.1 Testes de cura parasitológicos**

Os animais após tratamento foram submetidos à parasitemia direta para observação dos parasitos sanguícolas circulantes. Os animais que apresentaram negatificação parasitêmica foram tratados com duas doses de ciclofosfamida (CyCL - 250 mg/Kg/dia). Após a administração das duas doses de CyCL, os animais que apresentaram negatificação parasitêmica foram submetidos ao xenodiagnóstico, e tiveram o sangue coletado para cultura em meio Warren e sub-inoculação em camundongos recém-nascidos.

### **7.3.2 Parasitemia Direta**

Todos os animais sobreviventes foram avaliados quanto à presença de parasitos circulantes durante 30 dias, em 5µL de sangue periférico.

### **7.3.3 Xenodiagnóstico**

Os animais que não positivaram após injeção da dose do imunossupressor ciclofosfamida (CyCL), foram submetidos ao xenodiagnóstico, utilizando 3 ninfas de *Rhodinus prolixus* não infectadas por animal. Ao término do repasto com o sangue de cada animal, e após 45 dias do mesmo, as fezes dos barbeiros foram submetidos a exame direto no microscópico entre lâmina e lamínula, e o material que apresentasse formas do parasito, representava a não cura do animal.

### **7.3.4 Hemocultura Diagnóstica e Sub-inoculação**

Os animais que apresentaram negativação parasitêmica foram eutanasiados após anestesia com Ketamina- Xilasina 1:1, coletado durante o sacrifício aproximadamente 500µl de sangue por punção cardíaca e distribuído em três tubos contendo previamente meio de cultura Warren estéril para pesquisar a presença de parasitos durante 60 dias. Destes mesmos animais, coletou-se mais sangue e inoculou 0,1µl de sangue em camundongos recém-nascidos com 10 dias de vida aproximadamente

## **7.4 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS**

### **7.4.1 Inóculo**

Para a obtenção das formas tripomastigotas sanguíneas, destinadas à formação dos grupos de estudo, foi utilizado o método de PIZZI & PRAGUER (1952), que consiste na análise de 5µl de sangue espalhado entre lâmina e lamínula 22 mm X 22 mm, fazendo-se a contagem das formas tripomastigotas em 100 campos microscópicos, multiplicando-se o número obtido por 37 que corresponde ao fator de conversão do microscópio ótico, previamente estabelecido através da medida do diâmetro do campo microscópico 400 X e da área de cada campo com o uso de uma lâmina micrométrica, e multiplicando-se, também, por uma constante 20.

Os inóculos obtidos tanto para a formação dos grupos para tratamento quimioterápico com Benzonidazol, quanto para a formação dos grupos correspondentes a cada clone isolado para estudo biológico e molecular, foram de  $5 \times 10^5$  tripomastigotas sanguíneas.

### **7.4.2 Parasitemia**

O cálculo do número de formas tripomastigotas sanguíneas foi realizado em sangue coletado da cauda dos camundongos que formavam os grupos de estudos experimentais (quimioterapia e comportamento biológico), sendo determinado em uma amostra de no mínimo, cinco animais, por exame direto entre lâmina e lamínula, ao microscópio ótico. A contagem foi realizada em dias

alternados, até 90 dias para os grupos de estudo para tratamento quimioterápico (grupo tratado e grupo controle não tratado), até 30 dias para os grupos de estudos de cada clone avaliado, sendo os resultados representados pelas médias das contagens realizadas.

#### **7.4.3 Mortalidade Cumulativa**

Foi avaliada a mortalidade cumulativa pela contagem diária dos animais que morreram espontaneamente até 90 para os grupos experimentais que correspondiam aos animais tratados e não tratados com Benzonidazol. Para os grupos experimentais que correspondiam à caracterização biológica e molecular dos clones isolados, a mortalidade foi avaliada até 30 dias de infecção.

#### **7.4.4 Obtenção dos Parasitos Após Tratamento Quimioterápico**

Dos animais que positivaram após a análise parasitêmica, alguns foram selecionados ao acaso, para a obtenção dos parasitos resistentes. Estes animais foram eutanasiados após anestesia com ketamina- xilasina 1:1, e o sangue coletado foi inoculado em camundongos jovens para expansão parasitária.

#### **7.4.5 Isolamento dos Clones**

Após expansão parasitária, os animais inoculados com os parasitos de animais positivados após o tratamento, foram eutanasiados coletando-se o sangue para ser utilizado na seleção clonal através da técnica de DVORAK (1985). Em seguida, os clones selecionados foram inoculados em camundongos recém nascidos para expansão clonal e representaram os clones das sub-populações parasitárias que resistiram ao tratamento com Benzonidazol.

Os animais que representavam o grupo controle não tratado, após 90 dias de infecção, foram submetidos a tratamento com CyCL (250 mg/Kg/dia) para a reativação da parasitemia. Após positividade, os mesmos foram eutanasiados, e o sangue coletado foi utilizado para o isolamento dos clones controles. Cada clone isolado foi inoculado em camundongos recém nascidos para expansão clonal e representaram os clones controles isolados de animais não tratados.

### **7.5 CARACTERIZAÇÃO BIOLÓGICA E MOLECULAR DOS CLONES**

#### **7.5.1 Caracterização Biológica**

Do total de clones isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados, foram escolhidos ao acaso 7 clones para que fossem formados grupos experimentais de caracterização biológica (5 clones da cepa Colombiana e 2 clones da cepa 21SF). O mesmo foi feito com os 4 clones



isolados de animais controles não tratados – 2 clones controles de cada cepa. Para cada grupo representado por um clone, eram utilizados 20 camundongos suíços não isogênicos, com 21 dias de nascidos, ambos os sexos. O inóculo utilizado para a formação de cada grupo foi de 50.000 formas parasitárias. Cada grupo foi acompanhado durante 30 dias de infecção, quanto à parasitemia e mortalidade, sendo que alguns animais ao longo deste período eram eutanasiados para a coleta dos órgãos para estudo histopatológico.

### **7.5.2 Histopatologia**

Fragmentos de coração e músculo esquelético dos camundongos infectados com os clones da cepa Colombiana foram fixados em formol à 10% e incluídos em parafina para obtenção de secções de 5µm, corados em Hematoxilina e Eosina para estudo histopatológico. Os camundongos infectados com os clones da cepa 21SF não foram avaliados quanto à histopatologia.

### **7.5.3 Análise Molecular do K- DNA**

#### **7.5.3.1 Coleta e Preservação das Amostras**

Vinte e quatro amostras de sangue foram coletadas de camundongos infectados com cada clone isolado, na fase aguda da infecção. Para a preservação das amostras, primeiramente foi preparada uma solução num tubo de ensaio contendo EDTA (K<sub>3</sub>) líquido, o qual foi adicionado 1,6 ml de PBS 1x

pH 7,0. Num tubo *ependorf* foi adicionado aproximadamente 50µl da solução, 0,45 ml da amostra de sangue, e em seguida conservado no *freezer* a – 70°C, por até 6 meses.

### **7.5.3.2 Extração do K-DNA**

Uma alíquota de 500 µl de sangue foi utilizada para a extração do K-DNA. As células foram tratadas com 100µg de proteinase K durante 2h a 65°C. Posteriormente foi adicionado UltraPure™ Fenol: Clorofórmio: Álcool isoamílico (Invitrogen™) à uma proporção de (25:24:1, v/v) e o DNA da fase aquosa foi precipitado com etanol absoluto e lavado com etanol 70%. O DNA foi quantificado e a sua qualidade foi avaliada em gel de agarose 1%.

### **7.5.3.3 Amplificação da região variável dos minicírculos do DNA do cinetoplasto pela PCR**

O DNA proveniente do cinetoplasto foi submetido à reação de amplificação composta por 0,75 U de Taq DNA Polimerase; 10 mM de Tampão pH 8,3; 50 mM KCl; 50 µmol de cada “primer” (oligonucleotídeo sintético); 5,0 mM de MgCl<sub>2</sub>; 200 µM da mistura de dNTPs (deoxinucleotídeos Trifosfatos); água ultra pura estéril, suficiente para o volume final de 50µl. A cada reação foi acrescida 2 µl de DNA, que correspondeu aproximadamente 50 ng/µl. A reação foi realizada em Termociclador (*Eppendorf*) e consistiu de um ciclo inicial de desnaturação de 5 minutos à 95° C, seguido por 35 ciclos compostos de 45 segundos à 94°C para desnaturação do DNA, 30 segundos à 60°C para o

anelamento dos “primers”, 30 segundos à 72°C para extensão da fita de DNA e uma etapa final de 10 min à 72°C.

#### **7.5.3.4 Oligonucleotídeos sintéticos (“primers”)**

Oligonucleotídeos sintéticos utilizados como “primers” foram os seguintes:

**P35:** 5` AAA TAA TGT ACG GGG AGA TGC ATG A 3`

**P36:** 3` GGG TTC GAT TGG GGT TGG TGT 5`

Estas seqüências amplificam um fragmento de 330pb da região variável do minicírculo, o qual representa uma região variável mini-repitida do minicírculo da molécula do K-DNA (ÀVILA et al., 1990).

#### **7.5.3.5 Eletroforese em gel de agarose**

Os fragmentos obtidos foram analisados através da eletroforese em gel de agarose a 1% (*Sigma-Aldrich*®), em 100 ml de tampão TAE 1x (40 mM Tris-acetato e 1mM de EDTA pH 8,0), e coloração em brometo de etídio (10 mg/ml) (*Sigma-Aldrich*®), e azul de bromofenol (0,25% [vol./vol.] xilenocianol em 40% da solução aquosa de sacarose) com tampão de corrida TAE, durante 1h a 80 volts. O DNA foi visualizado sob luz ultravioleta e fotografado no sistema “*Quantity one*”. O tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 330pb e o padrão utilizado como marcador de pares de bases foi o *Ladder* de 100 pb (*Invitogen*®). Durante a realização de cada experimento foram incluídos controles negativos em reação sem DNA. Todas as amostras positivas foram

testadas pelo menos duas vezes, confirmando a ausência dos fragmentos nos controles negativos.

#### **7.5.3.6 Corte com enzimas de Restrição**

Após a amplificação pela PCR, o produto gerado correspondente a amostra de cada clone isolado, foi submetido à corte com enzimas de restrição, para o estudo do RFLP (*restriction fragment length polymorphism*), utilizando as enzimas *Rsa I*, *Hinf I* e *Eco RI*, de acordo com o procedimento do fabricante (marca). Os fragmentos de DNA foram separados por eletroforese vertical em gel de poliacrilamida à 7%, corado com brometo de etídio e visualizado no sistema *Quantity One*. Todas as imagens foram analisadas no GEL COMPARE II, versão 4.0, uma matriz de similaridade foi construída, utilizando o coeficiente de Dice.

## **8. RESULTADOS**

Os resultados foram avaliados através da análise de diferentes parâmetros, com o objetivo de estudar clones isolados de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, assim como da cepa 21SF nestas mesmas condições; em comparação com clones da mesma cepa isolados de animais não tratados. Os parâmetros utilizados foram análise da parasitemia, mortalidade cumulativa e testes de cura parasitológicos, sendo que a caracterização molecular permitiu analisar possíveis diferenças nos clones isolados de animais tratados não curados, em comparação com clones isolados de animais não tratados.

### **8.1 GRUPO TRATADO COM BENZONIDAZOL E CONTROLE NÃO TRATADO PARA ISOLAMENTO DOS CLONES**

#### **8.1.1 Análise da Parasitemia**

##### **Cepa Colombiana**

Como está expresso na figura (1), os camundongos infectados com a cepa Colombiana submetidos ao tratamento com Benzonidazol 100 mg/Kg/dia durante 90 dias, apresentaram uma curva parasitêmica crescente a partir do 8º dia de infecção, atingindo pico elevado em torno do 18º dia, ocorrendo diminuição brusca dos parasitos no sangue circulante a partir do 19º dia, que coincide com o período do início do tratamento quimioterápico, com negatificação parasitêmica até o final do tratamento. Em comparação, os

camundongos infectados com a cepa Colombiana e não tratados, apresentaram uma curva parasitêmica com ascensão inicial a partir do 8º dia de infecção, com pico parasitêmico no 20º dia de infecção, diminuindo o número de formas a partir deste dia, atingindo níveis muito baixos da parasitemia após o 30º dia de infecção.

### **Cepa 21SF**

Como está expresso na figura (2), os camundongos infectados com a cepa 21SF submetidos ao tratamento com Benzonidazol 100 mg/Kg/dia durante 90 dias, apresentaram uma curva parasitêmica crescente a partir do 8º dia de infecção, atingindo pico elevado em torno do 14º dia, ocorrendo diminuição brusca dos parasitos no sangue circulante a partir do 15º dia, que coincide com o período do início do tratamento quimioterápico, com negatificação parasitêmica até o final do tratamento. O grupo controle não tratado apresentou pico parasitêmico em torno do 16º dia, ocorrendo diminuição gradativa da parasitemia após este período.

### **8.1.2 Mortalidade Cumulativa**

#### **Cepa Colombiana**

A mortalidade cumulativa dos animais foi avaliada até 90 dias de infecção. Nos camundongos tratados com Benzonidazol foi observada uma

mortalidade em torno de 10%; em comparação ao grupo controle não tratado que foi em torno de 30% ao final de 90 dias de infecção (Figura 3).

### **Cepa 21SF**

A mortalidade cumulativa dos animais foi avaliada até 90 dias de infecção. Nos camundongos tratados com Benzonidazol foi observada uma mortalidade em torno de 15%; em comparação ao grupo controle não tratado que foi em torno de 40% ao final de 90 dias de infecção (Figura 4).

### **8.1.3 Resultados dos Testes de Cura Parasitológicos**

Os camundongos infectados com cada cepa e tratados durante 90 dias com Benzonidazol, foram submetidos aos testes de cura parasitológicos após 45 dias do término do tratamento. Dos animais sobreviventes após o período de tratamento, apenas 13,04% apresentaram cura parasitológica (grupo infectado com a cepa Colombiana) [Tabela1]. Os animais sobreviventes infectados com a cepa 21SF apresentaram 40,0% de cura parasitológica [Tabela 2]. Os camundongos infectados com cada cepa, não submetidos ao tratamento quimioterápico, obtiveram 0,0% de cura parasitológica.

### **8.1.4 Clones Obtidos**

Dos animais não curados após tratamento quimioterápico, o sangue coletado de animais selecionados ao acaso foram submetidos à técnica de clonagem, obtendo um total de 20 clones (16 clones Colombiana e 4 clones

21SF) ao final da clonagem. Ao final de 90 dias de infecção, foram isolados também 6 clones a partir da cepa dos animais infectados com as respectivas cepas e não tratada (2 clones Colombiana e 4 clones 21SF). Estes últimos clones serviram de controles para as análises comparativas com os clones isolados de animais tratados e não curados (Tabela 3 e 4).

## **8.2 ANÁLISE BIOLÓGICA, HISTOPATOLÓGICA E MOLECULAR DOS CLONES ISOLADOS**

### **8.2.1 Análise biológica dos clones isolados**

Sete clones obtidos dos animais tratados e não curados, foram escolhidos ao acaso para análise biológica, com intuito de observar se os mesmos apresentavam comportamento semelhante ao da cepa parental – 5 clones correspondiam ao grupo infectado com a cepa Colombiana, e 2 correspondiam ao grupo infectado com a cepa 21SF. Quatro clones controles isolados de animais não tratados também foram analisados quanto ao comportamento biológico, sendo que 2 correspondiam ao grupo infectado com a cepa Colombiana, e a outra metade correspondia ao grupo infectado com a cepa 21SF. Para isso, foram feitos para cada clone, grupos experimentais com 20 camundongos suíços, de 21 dias de nascidos, ambos os sexos; avaliando o comportamento destes clones durante 30 dias de infecção.



### **8.2.1.1 Parasitemia**

#### **Clones da Cepa Colombiana**

Os animais infectados com cada um dos clones (tanto os isolados dos animais tratados e não curados, quanto os isolados dos animais controle não tratados), apresentaram curva parasitêmica típica da cepa Colombiana, com picos parasitêmicos que variaram entre o 19º e 25º dia de infecção, como mostrado na figura 5.

#### **Clones da Cepa 21SF**

Os animais infectados com cada um dos clones (tanto os isolados dos animais tratados e não curados, quanto os isolados dos animais controle não tratados), apresentaram curva parasitêmica muito divergente da cepa parental, com picos mais tardios e irregulares, como mostrado na figura 6.

### **8.2.1.2 Mortalidade Cumilativa**

A mortalidade cumulativa dos clones isolados dos dois grupos analisados variaram bastante ao final de 30 dias, como mostrado nas figuras 7 e 8. Apenas um grupo de animais inoculados com um dos clones da cepa Colombiana, não apresentou mortalidade ao final deste período.

### **8.2.2 Análise Histopatológica**

Os cinco clones escolhidos aleatoriamente, isolados de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, foram avaliados quanto à histopatologia dos fragmentos de coração e músculo esquelético. Os camundongos infectados com cada clone apresentaram na maioria dos casos alterações inflamatórias intensas, com destruição de fibras, constatando a presença de lesões necróticas de células cardíacas, correspondendo a densos infiltrados inflamatórios com presença de ninhos e por vezes restos parasitários. Em músculo esquelético houve também presença de grandes infiltrados inflamatórios, presença de ninhos parasitários, destruição de fibras musculares, além de algumas áreas de necrose (Figuras 9 a 13). Não foram avaliados quanto à histopatologia os camundongos infectados com os clones da cepa 21SF.

### **8.2.3 Análise molecular do K-DNA dos clones isolados**

Todos os 26 clones isolados, assim como as cepas parentais, foram avaliados quanto ao perfil do k-DNA. Para esta investigação foi extraído o DNA mitocondrial das amostras de sangue de cada isolado.

#### **8.2.3.1 Amplificação pela PCR (Reação em Cadeia da Polimerase)**

A amplificação pela PCR revelou a presença de fragmentos de 330pb da amplificação dos fragmentos dos minicirculos do K-DNA, para todos os clones

isolados. O controle negativo não apresentou aparecimento de bandas, demonstrando que não houve contaminação por DNA exógeno (Figura 14, 15 e 16).

### **8.2.3.2 Análise pelo Polimorfismo no Comprimento dos Fragmentos de Restrição (RFLP)**

Os perfis das bandas dos minicírculos do K-DNA (fragmentos de restrição), dos clones isolados de animais infectados pela cepa Colombiana, gerados a partir dos cortes com as enzimas de restrição *Eco RI*, *Hinf I* e *RSA I* estão demonstrados nas Figuras 17, 18 e 19. Os fragmentos dos clones isolados de animais infectados com a cepa 21SF foram gerados pelas enzimas de restrição *Eco RI* e *Hinf I* (Figuras 20 e 21). As imagens dos géis foram submetidas ao programa de análise *GEL COMPAR@*, e as amostras dos clones isolados de animais tratados e não curados apresentaram 99,99% de similaridade, quando comparados entre si e quando comparados com as amostras dos clones controles isolados de animais não tratados com Benzonidazol.

## 9. DISCUSSÃO

A quimioterapia da doença de Chagas desde a década de 50 tem sido baseada na utilização de fármacos das classes dos nitrofuranos (Nifurtimox) e nitroimidazólicos (Benzonidazol), desenvolvidos empiricamente há décadas atrás. Estes compostos têm atividade na fase aguda e na fase crônica (ANDRADE et al, 1992), apesar de existirem poucos estudos que indique se o tratamento específico é eficiente na fase crônica da doença; com exceção do Projeto BENEFIT que está em andamento (COURA & BORGES-PEREIRA, 2011) o qual congrega numerosas equipes internacionais que desenvolvem um estudo multicêntrico no sentido de avaliar o efeito do tratamento específico em indivíduos na fase crônica da doença, com o Benzonidazol. Entretanto, devemos considerar que a eficácia do tratamento quimioterápico varia em diferentes regiões geográficas, provavelmente devido às diferenças de susceptibilidade nas diferentes cepas do *T.cruzi* (ANDRADE et al., 1985; FILARDI & BRENER, 1987).

Pesquisas que envolvem a quimioterapia combinada anti-parasitária em diversas parasitoses vem sendo coordenadas por VANNIER-SANTOS na Fundação Gonçalo Moniz / FIOCRUZ. Atualmente, trabalho em colaboração do Laboratório de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular e do Laboratório de Biomorfologia Parasitária (CPqGM / FIOCRUZ) vem sendo desenvolvido, avaliando a associação do Benzonidazol e outros fármacos com ação anti-*T.cruzi* no tratamento da doença de Chagas experimental.

Como já citado anteriormente, a classificação utilizada até então para nortear os trabalhos que envolvam o estudo de cepas do *T.cruzi* foi feita por

ANDRADE em 1974, onde cepas foram agrupadas quanto às suas características biológicas em diferentes Biodemas (I, II e III), identificando as cepas do Biodema Tipo I como susceptíveis ao tratamento quimioterápico, as do Biodema Tipo II como medianamente susceptíveis, e as dos Biodema Tipo III como resistentes.

Um dos primeiros trabalhos onde houve a observação do desenvolvimento de resistência quimioterápica em cepas do *T.cruzi* foi referido por AMREIN em 1964. Desde então, diferentes estudos buscam investigar quais os mecanismos envolvidos na susceptibilidade quimioterápica que pudessem estar justificando tal resistência em diferentes cepas do *T.cruzi*. Em seu estudo, AMREIN tratou culturas da cepa Tulauhen com doses gradualmente crescentes de Nitrofurazona, observando a resistência destas cepas aos nitrofurânicos, mesmo após passagem em triatomíneos artificialmente alimentados com formas de cultura, ou após passagem em meios de cultura. Em nosso trabalho, utilizamos a cepa Colombiana que é altamente resistente ao tratamento quimioterápico e a cepa 21SF que apresenta média susceptibilidade, e obtivemos apenas 13,04% de cura parasitológica para a cepa Colombiana e 40% de cura na cepa 21SF quando tratamos com Benzonidazol durante 90 dias, resultados compatíveis com outros trabalhos utilizando estas mesmas cepas como referência.

Em 1977, ANDRADE et al. procurando investigar o grau de resistência da cepa Colombiana em comparação com a resistência inicial que a mesma apresentava, inoculou a cepa em camundongos os quais foram submetidos a tratamento com o mesmo quimioterápico da primeira passagem (Bay 2502, Nifurtimox) e após 4 passagens sem nenhum tratamento, observando nítida

acentuação da resistência desta cepa, não só na primeira passagem como após 4 passagem em camundongos sem tratamento. Estudo realizado com cepas isoladas de pacientes da região Central do Brasil (Montalvânia MG), as quais foram analisadas após infecção experimental de camundongos (ANDRADE et al., 1992), demonstraram que houve falha no tratamento realizado em pacientes infectados com a cepa do Biodema Tipo III, confirmando em humanos a resistência deste Biodema, enquanto os pacientes em que as cepas foram caracterizadas como Biodema Tipo II houve índice elevado de cura.

Em nosso estudo, conseguimos realizar o isolamento clonal na cepa Colombiana (protótipo do Biodema Tipo III), e na cepa 21SF (protótipo do Biodema Tipo II), incluídas na Taxonomia proposta em 1999 como *Tcruzi I* e *Tcruzi II* respectivamente, de acordo com ANONYMOUS (1999).

Foram obtidos 18 clones da cepa Colombiana, sendo que destes, 16 clones altamente resistentes foram isolados de animais infectados tratados e não curados, e 2 clones isolados de animais infectados não tratados. Na cepa 21SF, protótipo do Biodema Tipo II, *T. cruzi II* de acordo com Anonymus (1999), foram isolados 8 clones, sendo que destes, 4 isolados de animais tratado e não curados, e 4 isolados de animais não tratados. O fato de não identificarmos na literatura outro trabalho que fizesse o isolamento de clones que ultrapassaram a barreira quimioterápica, provavelmente nos permitirá investigar se estes clones podem representar uma seleção de clones resistentes, responsáveis por conferir a resistência às cepas Colombiana e 21 SF, sendo, portanto, importante o conhecimento das características biológicas e estrutura molecular destes isolados. Em 1994 MARRETTO & ANDRADE

analisaram o padrão isoenzimático de cepas protótipos dos Biodemas Tipos I, II e III isoladas de camundongos tratados com Benzonidazol e não curados, em comparação com os isolados dos controles não tratados, e comprovaram que os perfis isoenzimáticos eram idênticos nos dois grupos.

Diversos estudos experimentais vêm demonstrando uma grande similaridade no comportamento de clones e da cepa parental, em especial os da cepa Colombiana, o que nos impulsiona a estudar mais detalhadamente quais seriam as características intrínsecas que permitem alguns clones sobreviverem após um estresse oxidativo pelo Benzonidazol, conferindo assim a resistência à cepa Colombiana. Um estudo que avaliou a variação da susceptibilidade quimioterápica da cepa Colombiana em 7 isolados do *T. cruzi*, demonstrou que houve uma homogeneidade fenotípica e uma alta similaridade com a cepa parental (CAMANDARROBA et al., 2003). CAMPOS & ANDRADE (1996) analisando o comportamento biológico e isoenzimático de clones e sub- clones da cepa 21SF do *T. cruzi*, demonstraram que houve similaridade no comportamento biológico dos clones quando comparados com a cepa parental, apresentando uma pequena variabilidade nos perfis parasitêmicos e no padrão isoenzimáticos dos mesmos. Em nosso estudo, os clones isolados de animais infectados com cepa 21SF, tratados e não curados, apresentaram divergência nos perfis parasitêmicos quando comparados com a cepa parental.

Em nosso estudo, selecionamos aleatoriamente alguns clones para que fossem avaliados quanto ao comportamento biológico, chegando à conclusão de que os clones isolados da cepa Colombiana apresentaram características biológicas compatíveis com as características das cepas parentais. Isto ficou confirmado com o estudo histopatológico dos órgãos e tecidos dos animais

infectados com os clones isolados de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, cujas lesões histopatológicas eram bem acentuadas no miocárdio e musculatura esquelética, bem características do Biodema Tipo III.

Buscando compreender os diferentes comportamentos das cepas do *T.cruzi* e conseqüentemente o que estaria levando à maior ou menor susceptibilidade destas cepas aos tratamentos quimioterápicos, diversos estudos passaram a incluir em suas investigações o estudo molecular destes parasitos, tentando correlacionar esta análise às características fenotípicas apresentadas nos diferentes isolados. Portanto, em nosso trabalho, investigamos o K-DNA dos diferentes clones isolados, através dos fragmentos gerados na digestão enzimática pelas enzimas *RSA I*, *ECO RI* e *Hinf I*, chegando à conclusão de que não foram detectadas diferenças nos fragmentos gerados por cada um dos 26 clones testados, que pudessem estar justificando uma maior resistência quimioterápica ao Benzonidazol, considerando que a maior parte destes clones resistiu à barreira quimioterápica deste fármaco altamente tóxico à estrutura do *T. cruzi*.

A utilização de enzimas de restrição na caracterização de diferentes cepas e clones do *T.cruzi* vem sendo adotada desde a década de 80, e representa uma ferramenta eficiente na detecção de diferenças em isolados deste parasito. Um dos pioneiros nesta investigação foi o trabalho realizado por Morel et al. (1980), os quais denominaram os perfis eletroforéticos obtidos com cepas de diferentes procedências como *Esquisodemas*, que representa o padrão de restrição dos minicírculos do K-DNA, gerados a partir da digestão com enzimas de restrição. Analisando produtos de digestão das enzimas *RSA I*



e *HINF I* do K-DNA de clones e da cepa parental 21SF, CAMPOS et al. (1999) encontram um alto grau de similaridade entre os fragmentos destes isolados, que variou de 80 a 100%. VELAZQUEZ et al. (2008) analisaram a diversidade destas regiões hipervariáveis do minicírculo do K-DNA do *T. cruzi* e sua influência nos tipos de cepas, utilizando como ferramenta de investigação tanto as enzimas de restrição, quanto clonagem plasmidial seguida de PCR semi-quantitativa, e verificaram uma frequência de 40% destas sequências na cepa CL-Brener, com 97% de identidade entre elas. Em estudo anterior, TELLERIA et al. (2006) já haviam utilizado clonagem plasmidial para segregar 170 seqüências de regiões hipervariáveis do K-DNA, obtidas de 19 isolados do *T. cruzi*. Os produtos da clonagem foram submetidos à técnica de seqüenciamento, mostrando padrões de seqüências que apareciam numa frequência de 40% na cepa CL-Brener, com 97% de identidade entre as mesmas.

Levando em consideração outros estudos moleculares os quais também buscavam elucidar os mecanismos de resistência de cepas aos fármacos comumente utilizados no tratamento de doenças causadas por tripanossomatídeos, WILKINSON e colaboradores (2007) demonstraram que tripanossomos apresentam uma enzima mitocondrial nitroredutase tipo I (NTR I) que tem a capacidade de metabolizar um grande número de drogas nitroheterocíclicas, e que a redução na atividade desta enzima pode conferir resistência tanto no *T. cruzi* como no *Trypanosoma brucei* para agentes tripanocidas como o Benzonidazol e Nifutimox.

Portanto, a importância da elucidação dos mecanismos envolvidos na maior ou menor resistência quimioterápica em cepas do *T. cruzi*, nos conduz a

prossequir nas investigações buscando diferentes ferramentas moleculares que nos permitam maior sensibilidade na detecção de possíveis diferenças no material biológico dos diferentes isolados aqui segregados. Mais adiante, faremos o estudo destas regiões do k-DNA utilizando as técnicas de clonagem através de plasmídeo, seguida de seqüenciamento de DNA. Serão feitas também técnicas que permitam identificar em diferentes linhagens os isolados do *T. cruzi*, através da técnica de investigação do rRNA e gene do mini-exon (ZINGALES et al., 1998; FERNANDES et al., 1999).

Portanto, apesar de não terem sido detectadas diferenças nos clones através das técnicas moleculares aqui realizadas, que pudesse estar justificando uma maior resistência quimioterápica nestes isolados; a indicação na diferença do padrão de parasitemia entre os clones da cepa 21SF e a cepa parental, poderá nos permitir investigar se existe alguma relação destes clones com a composição clonal de cepas resistentes à quimioterapia, haja vista que os mesmos apresentaram curvas parasitêmicas características das cepas do biotema Tipo III.

## 10. CONCLUSÕES

1) Os clones do *Trypanosoma cruzi* isolados de camundongos experimentalmente infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Biodema Tipo III) tratados e não curados, com o Benzonidazol, mantiveram os caracteres biológicos correspondentes à evolução parasitêmica, aos índices de mortalidade e ao quadro histopatológico da cepa parental.

2) As características moleculares dos clones isolados dos camundongos infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, apresentaram os perfis de RFLP conservados, através da digestão das enzimas de restrição *RSA I*, *ECO RI* e *HINF I*, não diferindo da cepa parental.

3) Os clones do *Trypanosoma cruzi* isolados de camundongos experimentalmente infectados pela cepa 21SF do *T. cruzi* (Biodema Tipo II) tratados com o Benzonidazol e não curados, apresentaram diferenças quanto ao comportamento biológico correspondente à evolução parasitêmica em comparação com a cepa parental, apresentando curvas parasitêmicas características de cepas do biodema Tipo III, altamente resistentes à quimioterapia.

4) A análise molecular dos clones isolados dos camundongos infectados com a cepa 21SF, tratados e não curados, demonstrou os perfis de RFLP conservados, através da digestão das enzimas de restrição *ECO RI* e *HINF I*.

5) Novos estudos empregando técnicas que permitam identificar diferentes linhagens do *T. cruzi* através da caracterização dos diferentes genótipos presentes na sua composição (Zingales et al. 2009)

, bem como o sequenciamento dos componentes dos clones isolados, serão necessários para demonstrar fatores intrínsecos capazes de esclarecer a resistência ao tratamento quimioterápico em diferentes cepas do *T. cruzi*.

## 11. REFERÊNCIAS

- 1- AMIEN, Y.U. Genetic transfer in trypanosomes. I – Syngamy in *Trypanosoma cruzi*. Exptl. Parasitol.17: 261-263, 1965.
- 2 - ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano.(Contribuição ao estudo da patologia geral da Doença de Chagas em nosso meio). Rev. Pat. Trop., 1: 65-121, 1974.
- 3 - ANDRADE, S.G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Suppl. I: 185-187, 1999.
- 4 - ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V., MAGALHÃES, J.B.; BARRAL- NETTO, M. Immunological response of swiss mice to infection with three different strains. Am J. Trop. Med. Parasitol. 79: 397-407, 1985.
- 5 - ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; ROCHA FILHO, F.D.; BARRAL NETTO, M. Análise antigênica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*: Rev Med Trop São Paulo, 23: 245-250, 1981.
- 6 - ANDRADE, S.G.; FIGUEIRA, R.F. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa no Bay 2502. Ver Inst Med Trop São Paulo 19: 124-129,1977.
- 7 - ANDRADE, S.G.; FIGUEIRA, R.M.; CARVALHO, M.L.; GORINI, D.F. Reaction of *Trypanosoma cruzi* strain to the experimental therapeutical response to Bay 2502 (results of long term treatment). Rev Inst Med Trop São Paulo 17: 380-399, 1975.

8 - ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanonoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.* 30: 27-35, 1997.

9 - 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. Worl Health Orga.* 65: 625-633, 1987.

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

11 - ANDRADE, V; BRODSKYN, C; ANDRADE, SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behavior of different strains of *Typanosoma cruzi*. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg* 77: 796-799, 1983.

12 - ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst. Oswaldo Cruz* 94 ( Supl. II): 429-432, 1999.

13 - ASLUND, L.; CARLSSON, L.; HENRIKSON, J.; RYDAKER, M.; TORO, G.C.; GALANTI, N.; PETERSON, U. A gene family encoding heterogeneous histone H1 protein in *Trypanossoma Cruzi*: *Mol. Biochem Parasitol*, 65: 317-330, 1994.

14 - 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, 1980.

15 - 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.

16 - CAMANDARROBA, E.L.P.; ANDRADE, S.G. Análise fenotípica e genotípica de clones da cepa colombiana do *T. cruzi*, isolados na fase aguda, precoce e avançada da infecção. Investigação da resposta à quimioterapia. 2005.

17 - CAMANDARROBA, ELP; CAMPOS, RF; MAGALHÃES, JB; ANDRADE, SG. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* colombian strain (biodeme type III): biological isoenzymic and histopatological analysis of seven isolates clones. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop* 34: 151-157, 2001

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

19 - CAMPOS, R.F & ANDRADE, S.G. Characterization of subpopulations (clones and subclones) of the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* after long lasting maintenance in the laboratory. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, 91(6): 795-800, 1996.

20 - CAMPOS, R.F.; GONÇALVES, M.S.; REIS, E.A.G.; REIS, M.G.; 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. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 94(1): 23-29, 1999.

21 - CAMPOS, RF; GUERREIRO, ML; SOBRAL, KS; LIMA, RC; ANDRADE, SG. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from

21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biodeme type II, *Trypanosoma cruzi* II).  
Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 38(2): 142-146, 2005.

22 - COURA, J.R.; BORGES-PEREIRA, J. Chronic phase chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol.106(6): 641-645, 2011.

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

24 - DIAZ DE TARANZO, E.G.; CASTRO, J.A.; FRANK DE CAZZULO, J.J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, protein and lipids from *Trypanosoma cruzi*. Experientia 44: 880-881.

25 - 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 satate (Brazil) revealed by non-transcribed spacer of the mini-exon gene. Parasitol 118: 161-166, 1999.

26 - FILARDI, L.S.; BRENER, Z.; Nitroimidazole-thiadiazole derivate with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Ann Trop Med Parasitol 76: 293-297.

27 - 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.



28 - GOIJMAN, S.G.; STOPPANI, A.O.M. Effects of nitroheterocyclic drugs on macromolecule synthesis and degradation in *trypanosoma cruzi*. *Biochem Pharmacol.* 34: 1331-1339, 1985.

29 - LUMSDEN, W.H.R. Biological aspects of trypanosomiasis research, 1965; a retrospect 1969. *Advances Parasitol* 8: 228-249, 1970.

30 - MACINA, R.A.; SANCHEZ, D.O.; GLUSCHANKAF, D.; BURRONE, O.; FRASEH, A.C.C. Sequence diversity in the kinetoplast minicircles of *T.cruzi*. *Mol. Biochem Parasitol*, 21: 25-32, 1986.

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

32 - MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; PÒVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, 74: 221-237, 1980.

33 - MOREL, C.; CHARI, E.; CAMARGO, E.P.; MATTEI, D.M.; ROMANHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6810-6814, 1980.

34 - MOREL C.M., DEANE, M.P., GONÇALVES, A.M. the complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitol Today* 2(4): 97-101, 1986.

35 - MOLINA, J.; MARTINS-FILHO, O.; BRENER, Z.; ROMANHA, A.J.; LOEBENBERG, D.; UBINA, J.A. Activities of the triazole derivate SCH 56592

(posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. *Antimicrob Agents Chemother* 44: 150-155, 2000.

36 - MYLLER, P.J. Molecular Variation in Trypanosomes. *Acta Trop.*, V. 53, p.205-225, 1993.

37 - NEVES, D.P. *Parasitologia Humana*. 11<sup>ed.</sup>, São Paulo: Atheneu, 2005.

40 - PIZZI & PRAGUER, R.S. Imunidade a la sobreinfección inducida mediante cultivos de *Trypanosoma cruzi* de virulência atenuada. *Bol. Inf. Parasitol. Chilenas*, 7: 20-21, 1952.

38 - REY, L. *Parasitologia*. 3<sup>a</sup> ed. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, RJ, 2002.

39 - SIMPSON, L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Ann Rev. Microbiol*, 41: 363-382, 1987.

40 - SOLARI, A.J. Mitoses and genome partition in Trypanosomes. *Biocell*, 19: 65-84, 1995.

41 - SOUTO, R.P.; FERANDES, 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.

42 - TELLERIA, J.; LAFAY, B.; VIRREIRA, M.; BARNABÉ, C.; TIBAYRENC, M.; MICHAL, S. *Trypanosoma cruzi*: sequence analysis of variable region of kinetoplast minicircles. *Experimental Parasitology* 114: 279-288, 2006.

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

44 - TIBAYRENC, M; BRENIERE, SF. *Trypanosoma cruzi* .major clones rather than zymodemes. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 83(supl 1): 249-255, 1988.

45 - TIBAYRENC, M.; WARDS P.; MOYA, A.; AYALA F.J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 83: 115-119, 1986.

46 - TOLEDO, M.J.O.; GUILHERME, A.L.F.; GASPERI, M.V.; MENDES, A.P.; GOMES, M.L.; ARAÚJO, S.M. *Trypanosoma cruzi*: Chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from different endemic areas of Brasil. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo*, 39: 283-290, 1997.

47 - VELAZQUEZ, M.; DIEZ, C.N.; MORA, C.; DIOSQUE, P. MARCIPAR, I.S. *Trypanosoma cruzi*: na analysis of minicircles hypervariable regions diversity and its influence on strain typing. *Exp. Parasitology*, 120: 235-241, 2008.

48 - VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; TOLEDO, M.J.O.; LANA, M. CHIARI, E.; TAFURI, W.L.; BAHIA, M.T. Variation in Susceptibility to Benznidazole in Isolates Derived from *Trypanosoma cruzi* parental strains. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 96: 1005-1011, 2001.

49 - WILKINSON, S.R.; TYLOR, M.C.; HORN, D.; KELLY, M.J.  
CHEESEMAN, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and  
benznidazole in trypanosomes. PNAS, 2007.

50 - World Health Organization. Control of Chagas' Disease. Report of a  
WHO Expert Committee. WHO Technical Report Series, 2002.

51 - ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S, CAMPBELL, D.A.,  
CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E., MACEDO,  
A.M.; MACHADO, C.R; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURN, N.R.;  
TIBAYRENC, M.; SHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi*  
intraespecific nomenclature: second revision meeting recommends Tc I to  
TcVI. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104(7): 1051-1057,  
2009.

52 - ZINGALES, B.; SOUTO MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL,  
D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. Molecular epidemiology  
of American trypanosomiasis in Brasil: Basis on dimorphism of rRNA and  
mini-exon gene sequences. Int. J. Parasitol 28: 105-112, 1998.

## **ANEXOS**

Figura 1 – Curva parasitêmica de camundongos infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/Kg/dia durante 90 dias, e grupo controle não tratado.

Figura 2 - Curva parasitêmica de camundongos infectados com a cepa 21SF do *Trypanosoma cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/Kg/dia durante 90 dias, e grupo controle não tratado.

FIGURA 1

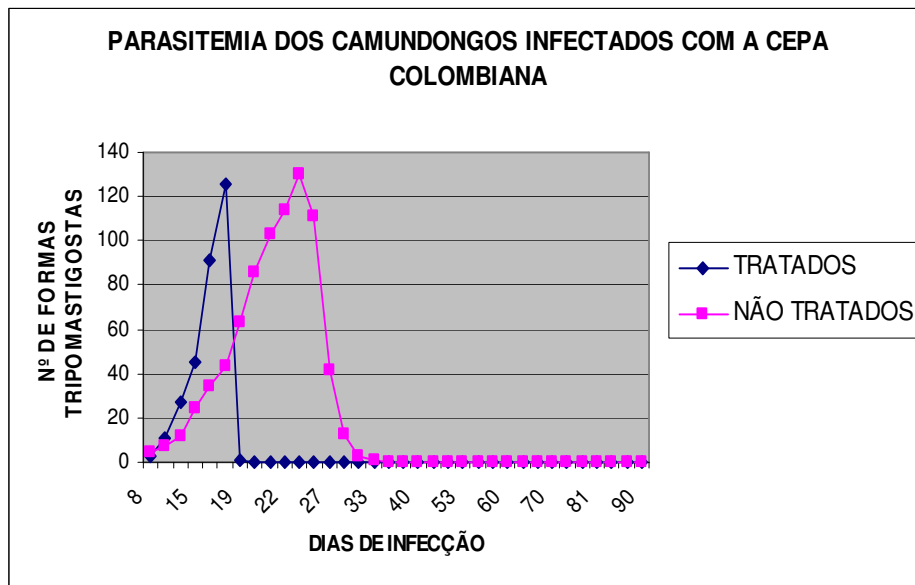


FIGURA 2

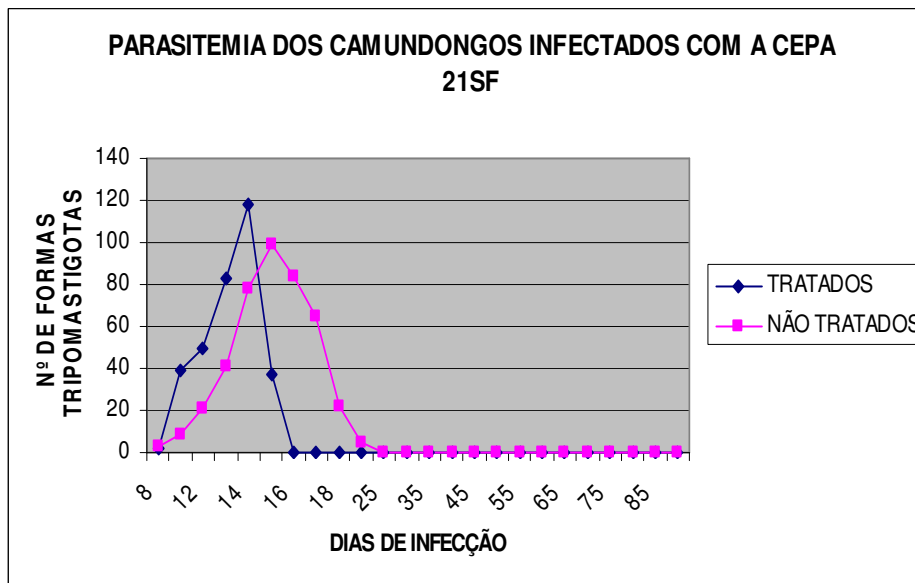


Figura 3 – Mortalidade cumulativa dos animais infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/Kg/dia durante 90 dias, e grupo controle não tratado.

Figura 4 - Mortalidade cumulativa dos animais infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, grupo tratado com Benzonidazol 100mg/Kg/dia durante 90 dias, e grupo controle não tratado.



FIGURA 3

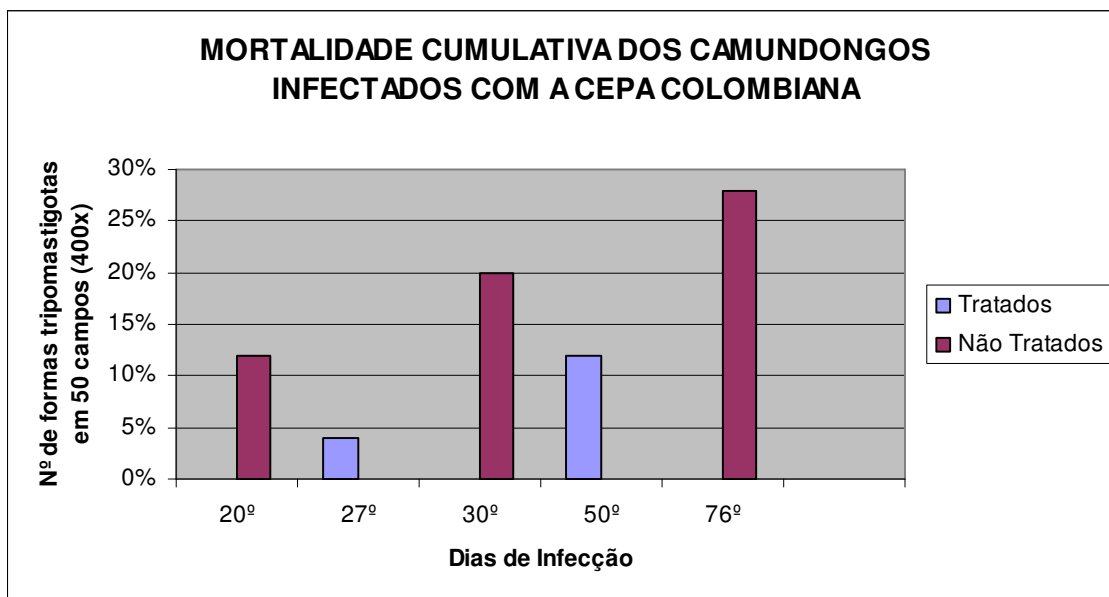


FIGURA 4

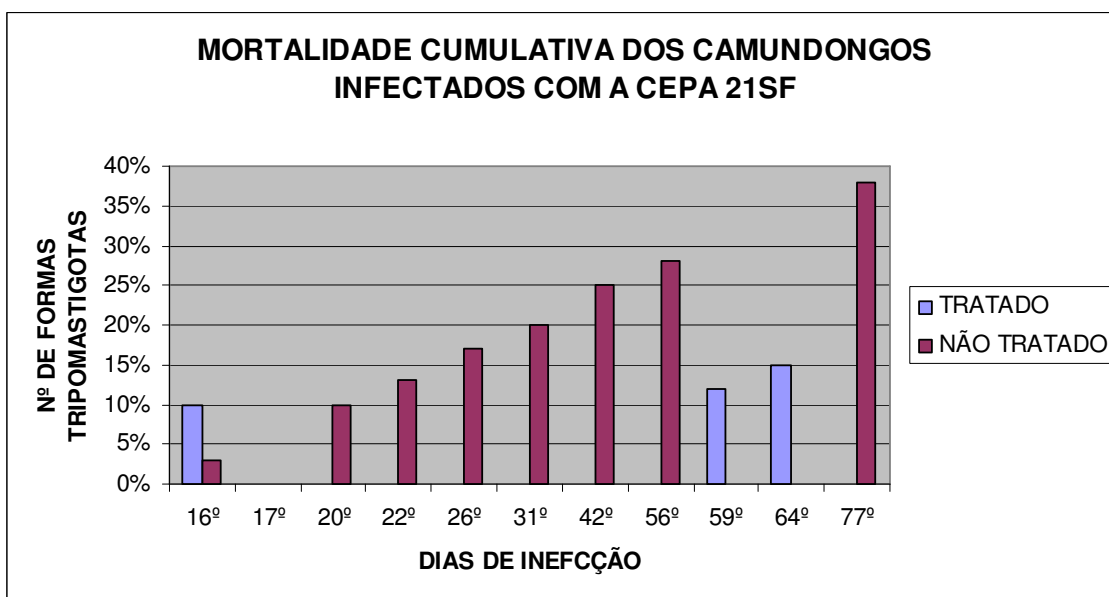


Tabela 1 – Testes de cura parasitológico dos animais infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, sobreviventes após o período de tratamento com Benzonidazol 100mg/Kg/dia, 45 dias após o término do tratamento.

Tabela 2 - Testes de cura parasitológico dos animais infectados com a cepa 21SF do *Trypanosoma cruzi*, sobreviventes após o período de tratamento com Benzonidazol 100mg/Kg/dia, 45 dias após o término do tratamento.

Tabela 1 – Teste de cura parasitológico da cepa Colombiana.

<b>RESULTADOS DOS TESTES DE CURA PARASITOLÓGICOS*</b>					
<b>CEPA COLOMBIANA</b>					
<b>Ident.**</b>	<b>Pasasit.***</b>	<b>Xeno.***</b>	<b>Subinocu.***</b>	<b>Hemocult.***</b>	<b>Resultado</b>
<b>A</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>B</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>C</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>D</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>E</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>F</b>	Neg	Neg	Neg	Neg	<b>Negativo</b>
<b>G</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>H</b>	Neg	Posit	Neg	Posit	Positivo
<b>I</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>J</b>	Neg	Posit	Neg	Neg	Positivo
<b>L</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>M</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>N</b>	Neg	Posit	Neg	Neg	Positivo
<b>O</b>	Neg	Neg	Neg	Neg	<b>Negativo</b>
<b>P</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>Q</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>R</b>	Neg	Posit	Neg	Neg	Positivo
<b>S</b>	Neg	Posit	Neg	Neg	Positivo
<b>T</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>U</b>	Neg	Neg	Neg	Neg	<b>Negativo</b>
<b>V</b>	Neg	Posit	Neg	Neg	Positivo

\* 45 dias pós-término do tratamento.

\*\* Identificação dos camundongos submetidos à tratamento quimioterápico.

\*\*\* Testes avaliados após dose quimioterápica de Ciclofosfamida.

Legenda: Posit (positivo); Neg. (negativo); NR: Não realizado

Tabela 2- Teste de cura parasitológico da cepa 21SF.

RESULTADOS DOS TESTES DE CURA PARASITOLÓGICOS*					
CEPA 21SF					
Ident.**	Pasasit.***	Xeno.***	Subinocu.***	Hemocult.***	Resultado
<b>A</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>B</b>	Neg	NR	NR	NR	<b>Negativo</b>
<b>C</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>D</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>E</b>	Neg	NR	NR	NR	<b>Negativo</b>
<b>F</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>G</b>	Neg	NR	NR	NR	<b>Negativo</b>
<b>H</b>	Neg	NR	NR	NR	<b>Negativo</b>
<b>I</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo
<b>J</b>	Posit	NR	NR	NR	Positivo

\* 45 dias pós-término do tratamento.

\*\* Identificação dos camundongos submetidos à tratamento quimioterápico.

\*\*\* Testes avaliados após dose quimioterápica de Ciclofosfamida.

Legenda: Posit (positivo); Neg. (negativo); NR: Não realizado

Tabela 3 – Número de clones obtidos da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados, e animais controles não tratados.

Tabela 4 - Número de clones obtidos da cepa 21SF do *Trypanosoma cruzi*, isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados, e animais controles não tratados.

Tabela 3 – Número de clones obtidos da cepa Colombiana, isolados de animais infectados tratados com Benzonidazol e não curados e animais controles não tratados.

<b>IDENTIFICAÇÃO DOS CLONES ISOLADOS DA CEPA COLOMBIANA</b>	
<b>Identificação do Animal</b>	<b>Clones</b>
<b>A*</b>	<b>CI-COL / T1**</b>
	<b>CL-COL / T2**</b>
	<b>CL-COL / T3**</b>
	<b>CL-COL / T4**</b>
	<b>CL-COL / T5**</b>
<b>B*</b>	<b>CL-COL / T6**</b>
	<b>CL-COL / T7**</b>
<b>C*</b>	<b>CL-COL / T8**</b>
	<b>CL-COL / T9**</b>
	<b>CL-COL / T10**</b>
	<b>CL-COL / T11**</b>
	<b>CL-COL / T12**</b>
<b>D*</b>	<b>CL-COL / T13**</b>
	<b>CL-COL / T14**</b>
<b>E*</b>	<b>CL-COL / T15**</b>
	<b>CL-COL / T16**</b>
<b>Controle Não Tratado***</b>	<b>CL-COL / NT1****</b>
	<b>CL-COL / NT2****</b>
<b>Total</b>	<b>18 Clones</b>

\* Animais infectados tratados com Benzonidazol 100 mg/Kg/dia durante 90 dias e não curados.

\*\* Clones isolados dos respectivos animais tratados com Benzonidazol e não curados.

\*\*\* Animais controles infectados e não tratados.

\*\*\*\* Clones isolados de animais controles não tratados após 90 dias de infecção.

Tabela 4 – Número de clones obtidos da cepa 21SF, isolados de animais infectados tratados com Benzonidazol e não curados e animais controles não tratados.

<b>IDENTIFICAÇÃO DOS CLONES DA CEPA 21SF</b>	
<b>IDENTIFICAÇÃO DO ANIMAL</b>	<b>CLONES</b>
<b>A*</b>	<b>CL-21SF/ T1** CL-21SF/T2**</b>
<b>B*</b>	<b>CL-21SF/T3**</b>
<b>C*</b>	<b>CL- 21SF/T4**</b>
<b>CONTROLE NÃO TRATADO***</b>	<b>CL-21SF/NT1**** CL-21SF/NT2**** CL- 21SF/NT3**** CL- 21SF/NT4****</b>
<b>TOTAL:</b>	<b>8 CLONES</b>

\* Animais infectados tratados com Benzonidazol 100 mg/Kg/dia durante 90 dias e não curados.

\*\* Clones isolados dos respectivos animais tratados com Benzonidazol e não curados.

\*\*\* Animais controles infectados e não tratados.

\*\*\*\* Clones isolados de animais controles não tratados após 90 dias de infecção.

Figura 5 – Curva parasitêmica dos animais infectados com os clones da cepa Colombiana isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados. Clones isolados de animais tratados não curados: CL-COL/T2, CL-COL/T5, CL-COL/T7, CL-COL/T9 e CL-COL/T10. Clones isolados de animais não tratados: CL-COL/NT1 e CL-COL/NT2.

Figura 6 - Curva parasitêmica dos animais infectados com os clones da cepa 21SF isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados. Clones isolados de animais tratados não curados: CL- 21SF/T1 e CL-21SF/T2. Clones isolados de animais não tratados: CL- 21SF/NT1 e CL-21SF/NT2.



FIGURA 5

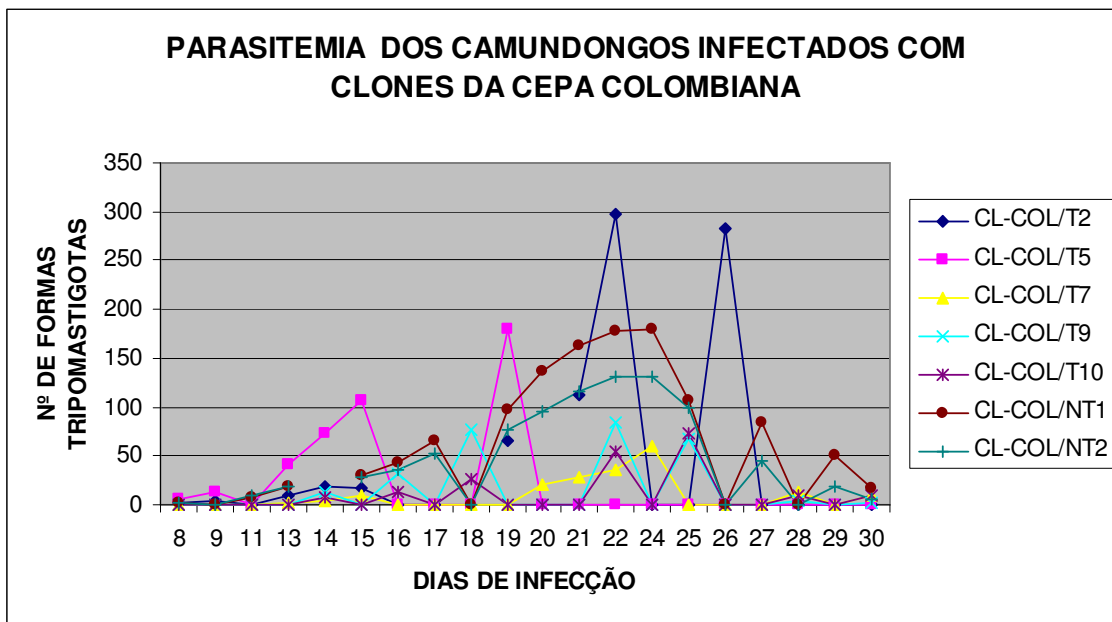


FIGURA 6

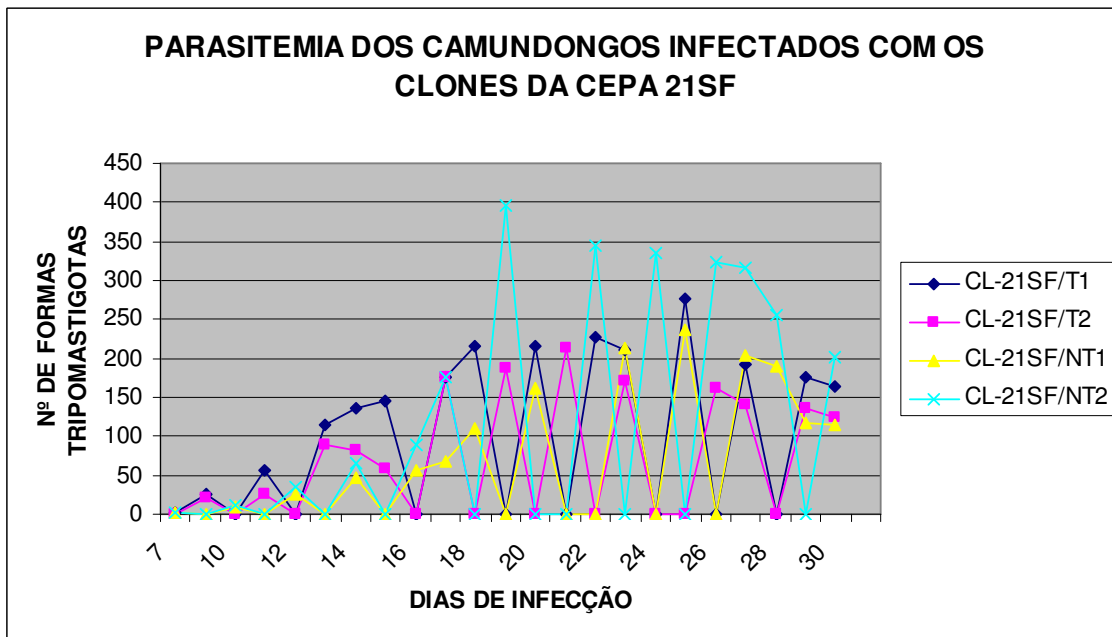


Figura 7 – Mortalidade cumulativa dos camundongos infectados com os clones da cepa Colombiana isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados, e clones isolados de animais controles não tratados. Clones isolados de animais tratados não curados: CL-COL/T2, CL-COL/T5, CL-COL/T7, CL-COL/T9 e CL-COL/T10. Clones isolados de animais não tratados: CL-COL/NT1 e CL-COL/NT2.

Figura 8 - Mortalidade cumulativa dos camundongos infectados com os clones da cepa 21SF isolados de animais tratados com Benzonidazol e não curados, e clones isolados de animais controles não tratados. Clones isolados de animais tratados não curados: CL- 21SF/T1 e CL-21SF/T2. Clones isolados de animais não tratados: CL- 21SF/NT1 e CL-21SF/NT2.

FIGURA 7

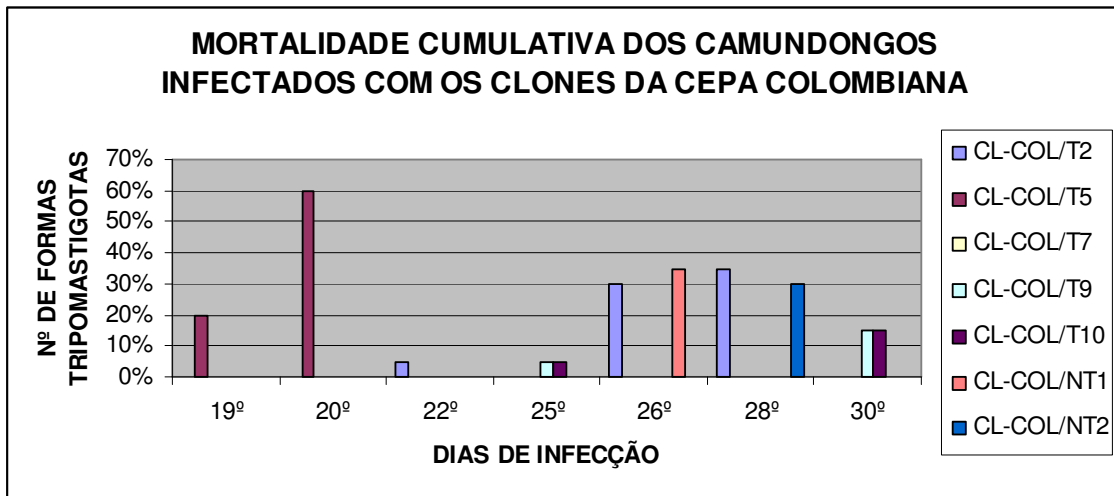


FIGURA 8

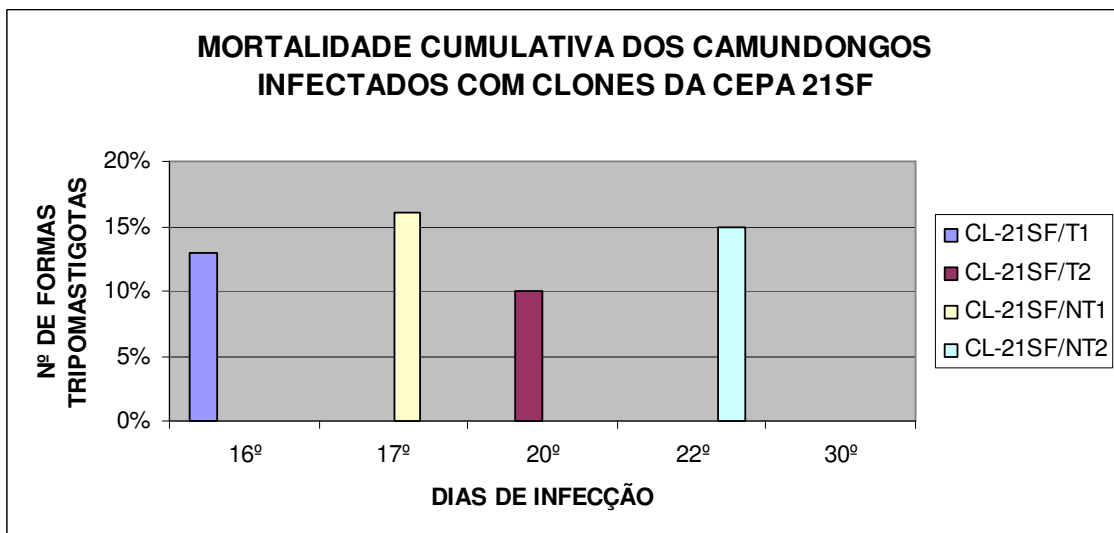
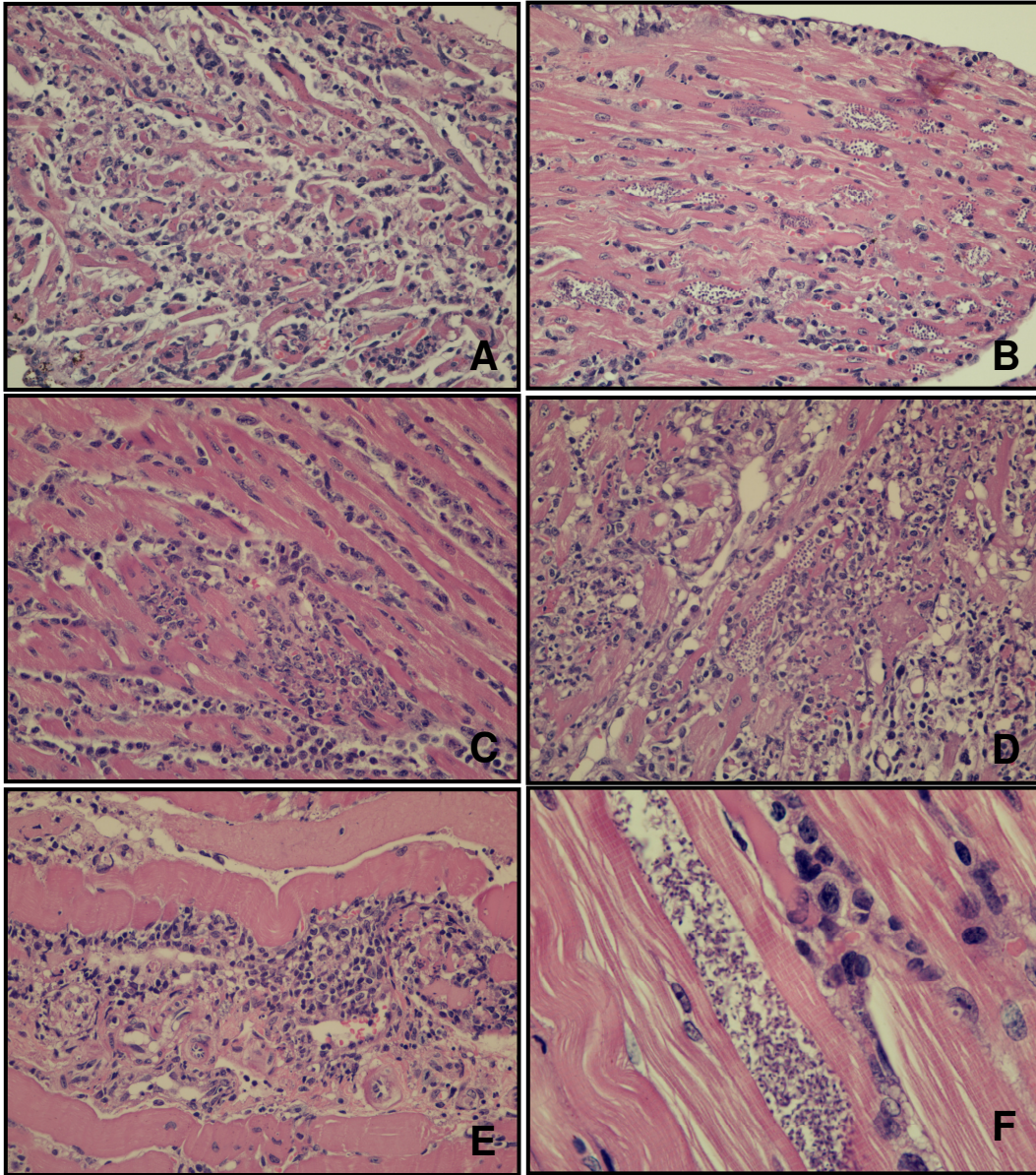


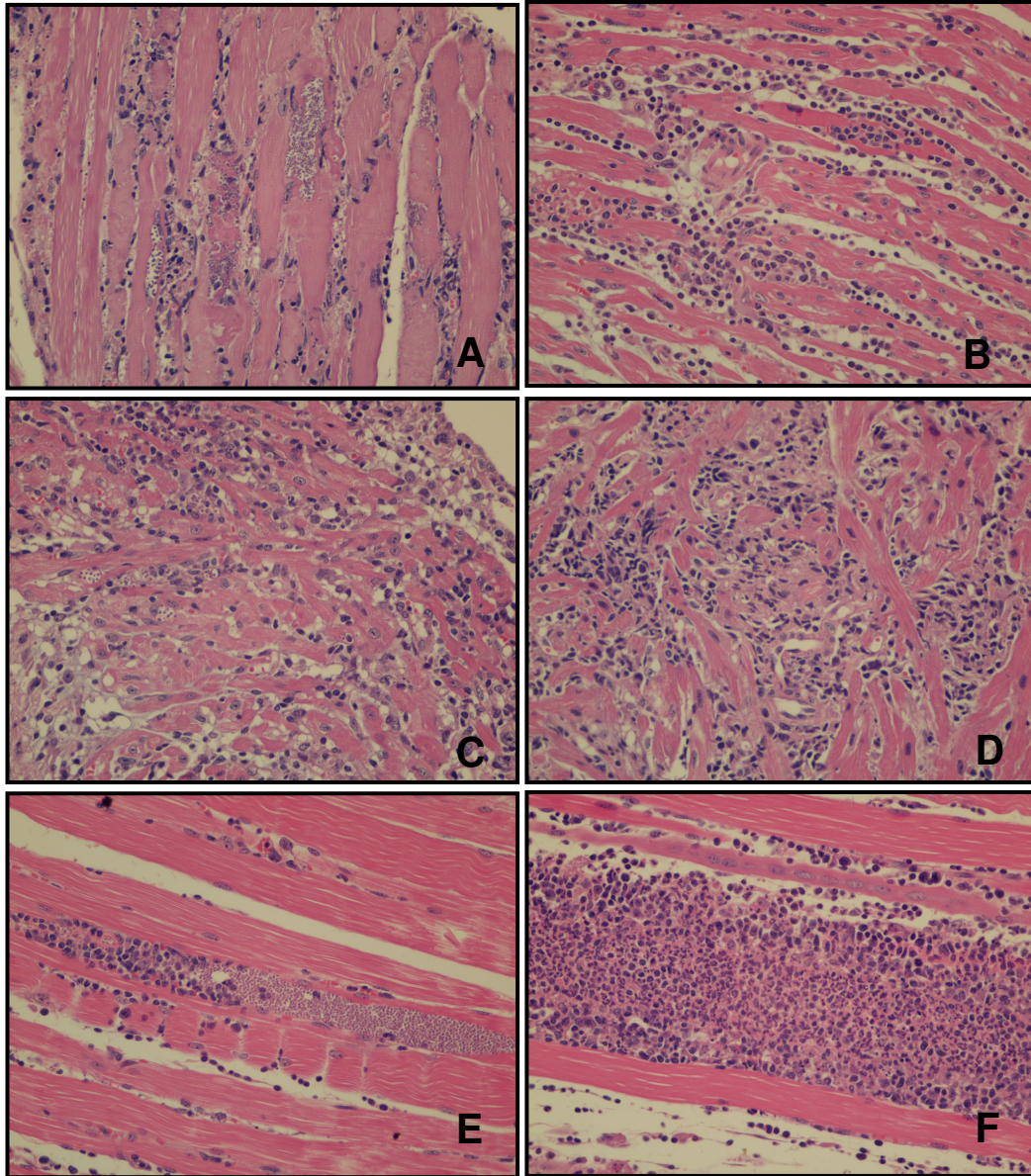
Figura 9 - Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone **CL- COL/T5**, isolado de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, sacrificados no 20<sup>º</sup> dia de infecção, corados com H & E (400X) – Miocárdio – **A**: secções de tecido cardíaco apresentando destruição tecidual, com presença de muitos ninhos parasitários e infiltrado inflamatório intenso e difuso. **B e D**: miocárdio com presença de ninhos parasitários, e infiltrados inflamatório intenso e difuso. **C**: presença de ninho parasitário sendo destruído pelo infiltrado inflamatório – Musculatura Esquelética – **E**: fibras musculares totalmente destruídas com presença de ninhos parasitários. **F**: infiltrado inflamatório focal e difuso, com presença de parasitos.



**PRANCHA 1**

Figura 10 - Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone **CL- COL/T10**, isolado de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, sacrificados no 20º dia de infecção, corados com H & E (400X) – Miocárdio - **A**: secções de miocárdio com presença de muitos ninhos parasitários, com infiltrado inflamatório intenso e difuso, tecido cardíaco totalmente destruído; **B**: secções de miocárdio com presença de infiltrado inflamatório difuso, com muitos ninhos parasitários; **C**: presença de ninho parasitário sendo destruído pelo infiltrado inflamatório; **D**: infiltrado inflamatório difuso com presença de ninhos parasitários. Musculatura Esquelética: **E**, **F**: infiltrado inflamatório com destruição tecidual e presença de ninhos parasitários.

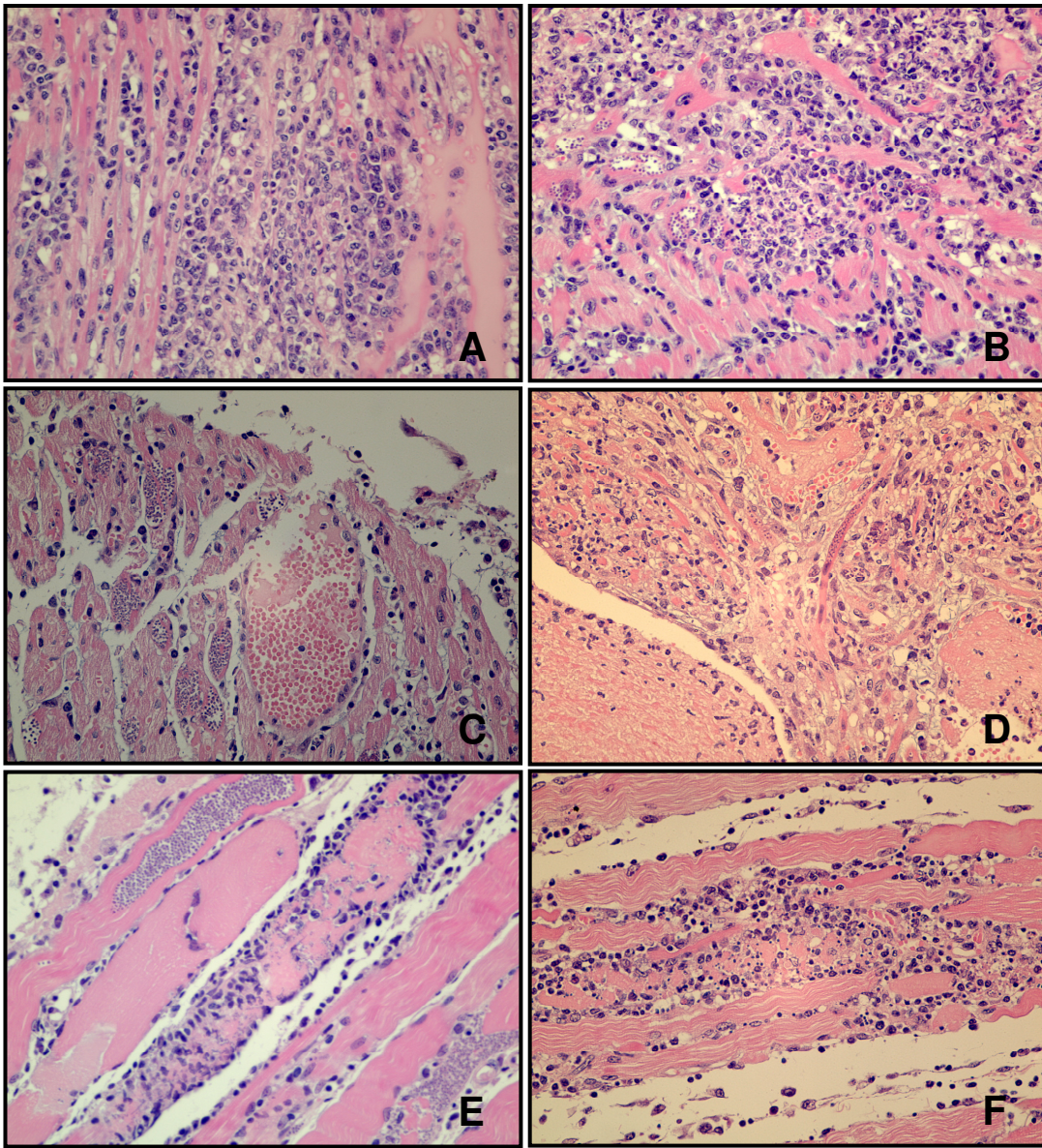




**PRANCHA 2**

Figura 11- Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone **CL- COL/T2**, isolado de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, sacrificados no 20<sup>º</sup> dia de infecção, corados com H & E (400X) – Miocárdio – **A**; **B**: miocárdio totalmente destruído com presença de parasitos; **C**: infiltrado inflamatório focal e difuso, com presença de muitos parasitos; **D**: grande região de necrose, com focos inflamatórios difusos – Musculatura Esquelética – **E**: grande região de necrose, com presença de foco inflamatório; **F**: infiltrado inflamatório poli e mononuclear com restos parasitários e presença de células sarcolemas.

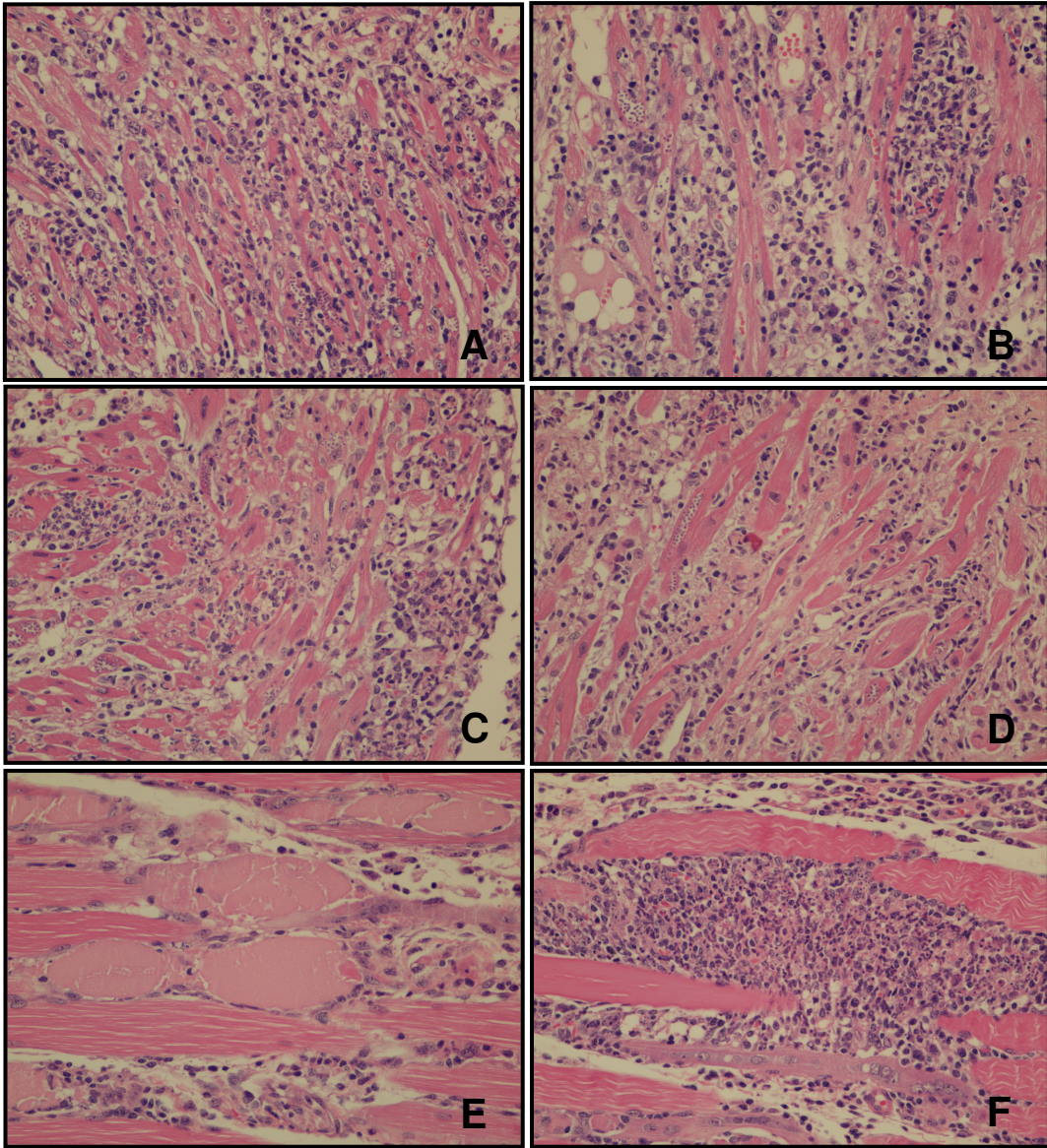




**PRANCHA 3**

Figura 12 – Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone **CL-COL/T2**, isolado de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, sacrificados no 20<sup>o</sup> dia de infecção, corados com H & E (400X) – Miocárdio – **A**; **B**: infiltrado inflamatório difuso, com presença de ninhos parasitários e destruição tecidual; **C**: infiltrado inflamatório perivascular com presença de parasitos; **D**: infiltrado inflamatório com destruição tecidual - Musculatura Esquelética - **E**: infiltrado inflamatório difuso, com fibras musculares destruídas em processo de calcificação; **F**: infiltrado inflamatório focal polimorfonuclear.

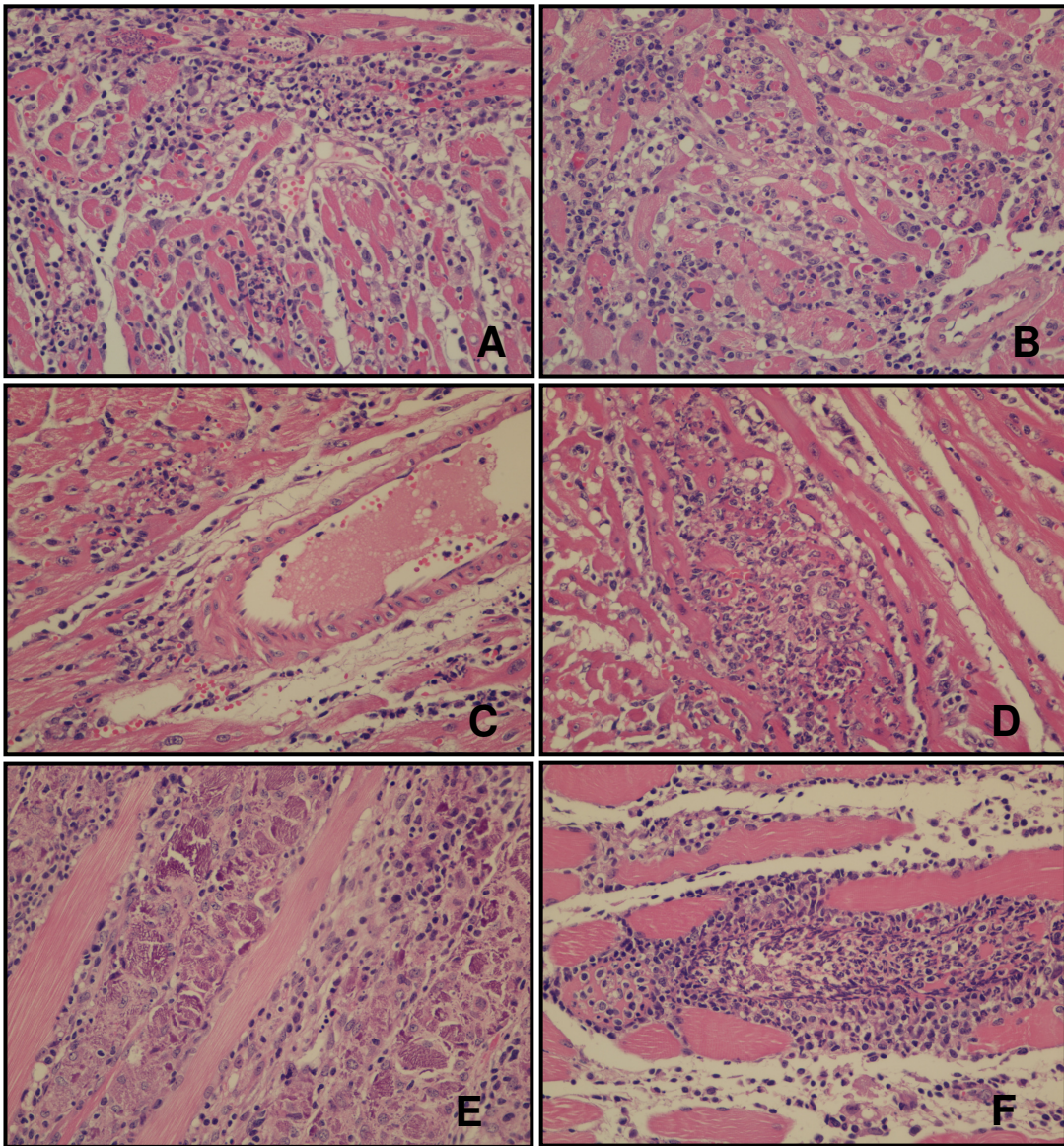




**PRANCHA 4**

Figura 13 - Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos infectados com o clone **CL- COL/T9**, isolado de animais infectados com a cepa Colombiana, tratados e não curados, sacrificados no 20<sup>º</sup> dia de infecção, corados com H & E (400X) – Miocárdio - **A**: secções de miocárdio com infiltrado inflamatório focal e presença de parasitos; **B**: secções de tecido cardíaco com grande infiltrado difuso e focal; **C** e **D**: infiltrado inflamatório difuso com presença de necrose – Musculatura Esquelética - **E**: secções de tecido muscular com infiltrado inflamatório poli e mononuclear; **F**: grande infiltrado inflamatório com presença de restos parasitários.





**PRANCHA 5**

Figura 14 – Amplificação pela PCR e revelação em gel de agarose: K-DNA das amostras dos clones isolados dos animais infectados com a cepa Colombiana. Amostras dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL-COL (T1 a T16). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL- COL (NT1 e NT2).

Figura 15 - Amplificação pela PCR e revelação em gel de agarose: K-DNA das amostras dos clones isolados dos animais infectados com a cepa Colombiana. Amostras dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL- COL (T13 a T16). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL- COL (NT1 e NT2) – Melhor demonstradas.

Figura 14

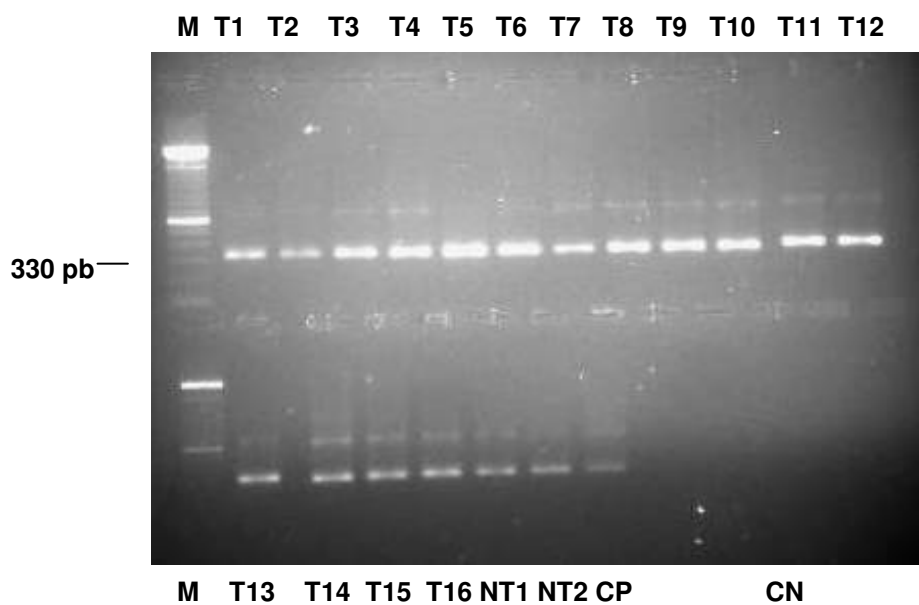
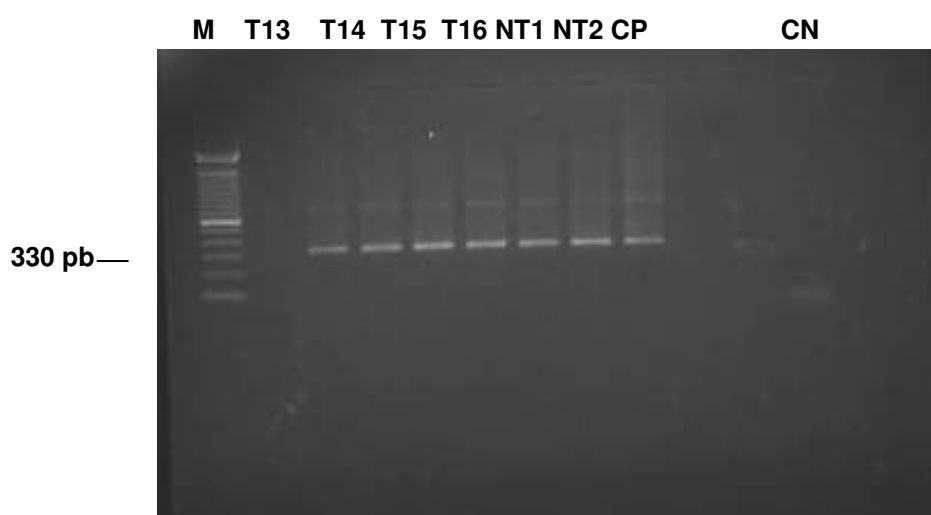


Figura 15



PCR; M = Marcador 100 pb ; T1 a T16 = Clones Cepa Colombiana isolados de animais tratados não curados; NT1 e NT2 = Clones cepa Colombiana isolados de animais não tratados ; CP = Cepa Parental ; CN = Controle Negativo

Figura 16 - Amplificação pela PCR e revelação em gel de agarose: K-DNA das amostras da cepa 21SF e dos clones isolados dos animais infectados com a cepa 21SF. Amostra dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL- 21SF (T1 a T4). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL-21SF (NT1 E NT2). Cepa parental: CP.



Figura 16

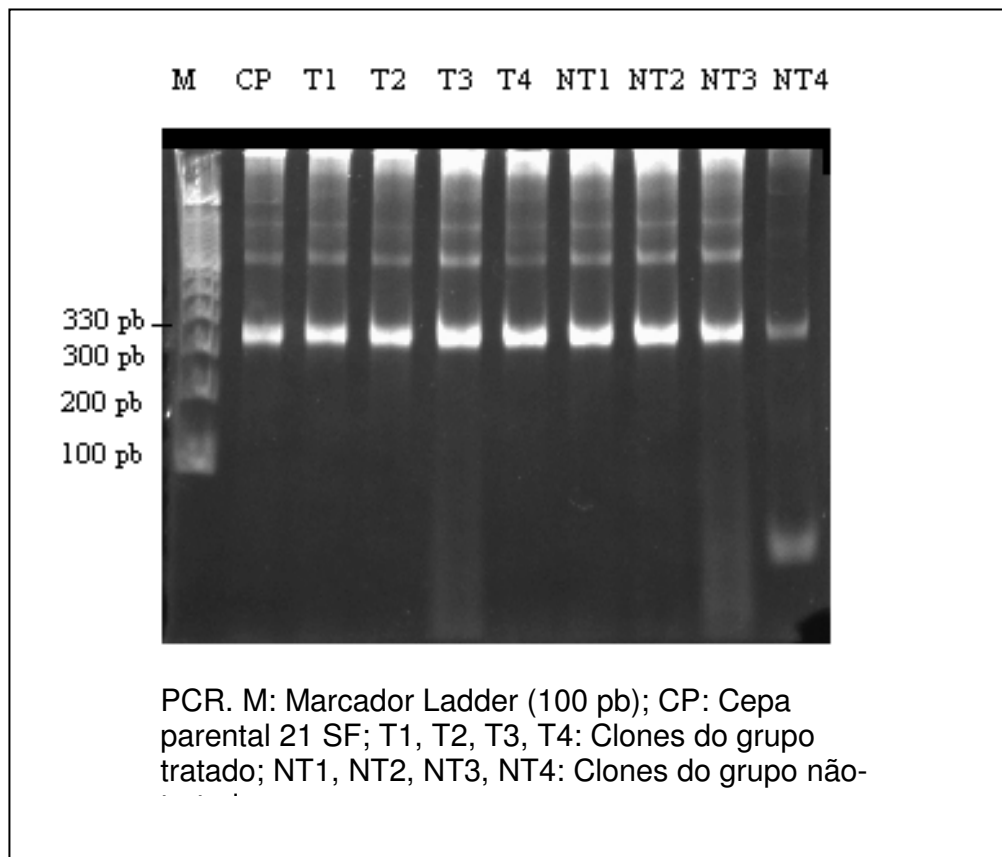


Figura 17 – Revelação em gel de poliacrilamida dos fragmentos de restrição do K-DNA dos clones isolados da cepa Colombiana, pela técnica de RFLP, utilizando a enzima ECO R1. Amostras dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL-COL (T1 a T16). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL- COL (NT1 e NT2).

Figura 17

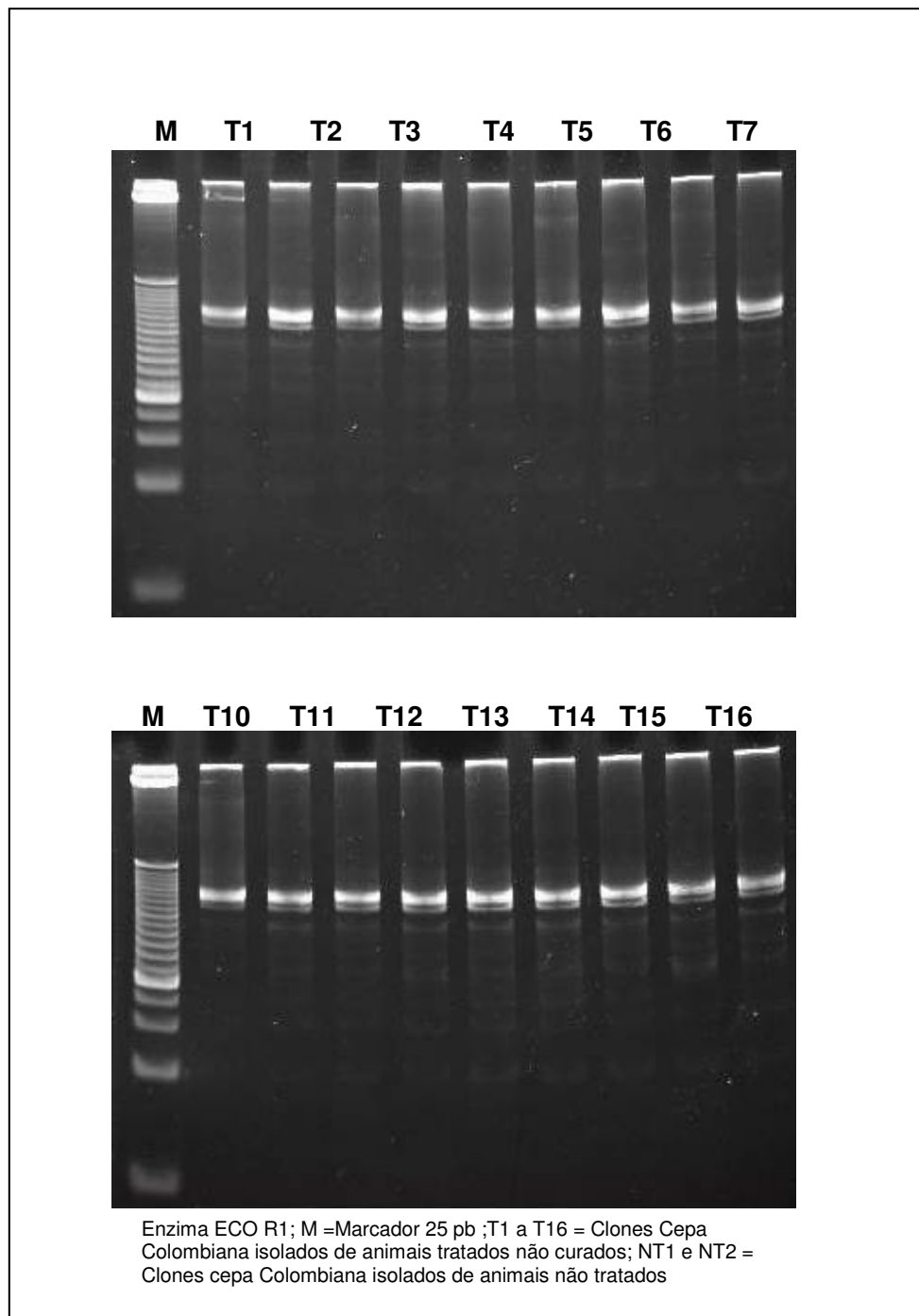


Figura 18 - Revelação em gel de poliacrilamida dos fragmentos de restrição do K-DNA dos clones isolados da cepa Colombiana, pela técnica de RFLP, utilizando a enzima HINF 1. Amostras dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL-COL (T1 a T16). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL- COL (NT1 e NT2).

Figura 18

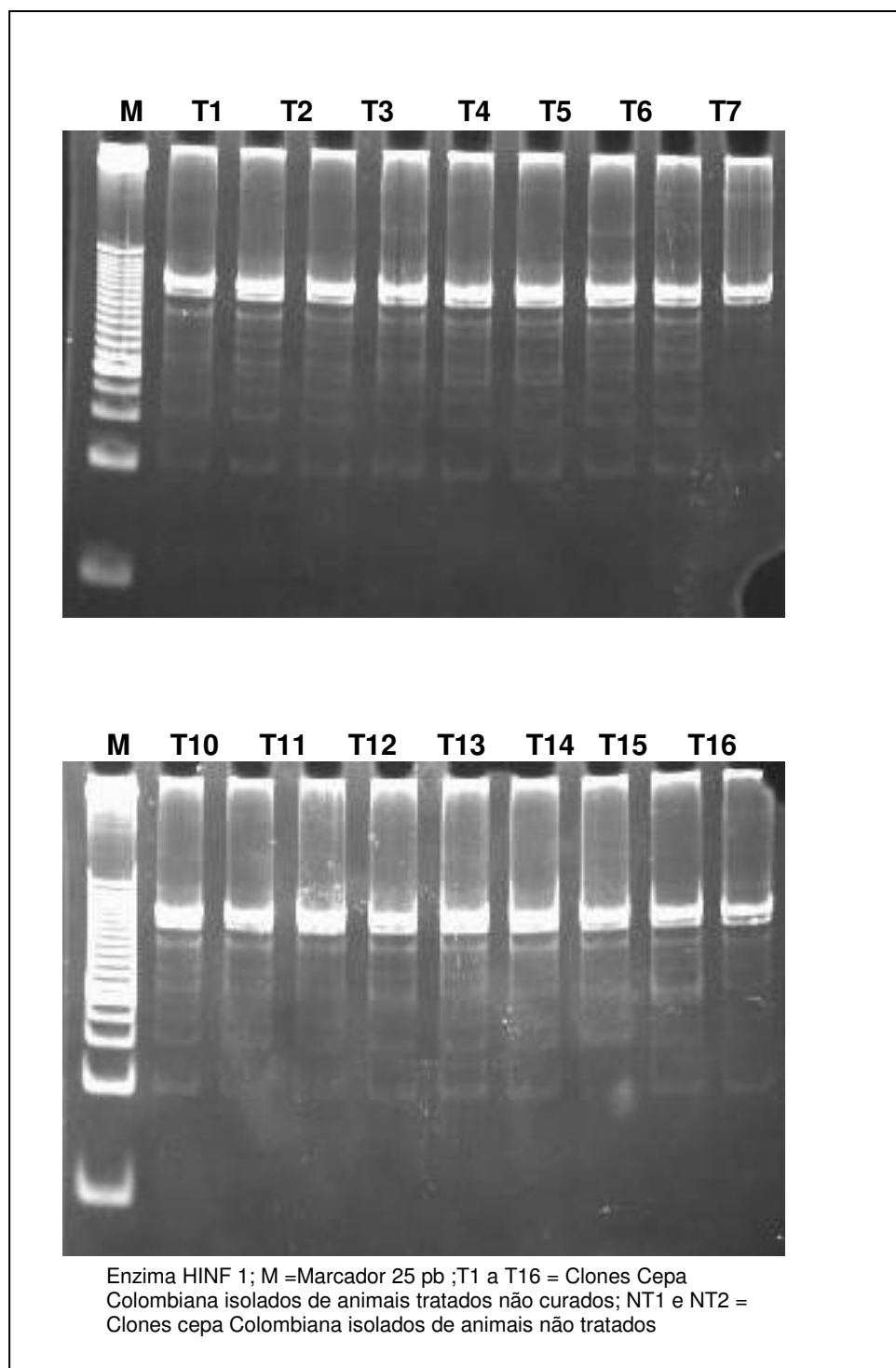


Figura 19 - Revelação em gel de poliacrilamida dos fragmentos de restrição do K-DNA dos clones isolados da cepa Colombiana, pela técnica de RFLP, utilizando a enzima RSA 1. Amostras dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL-COL (T1 a T16). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL- COL (NT1 e NT2).

Figura 19

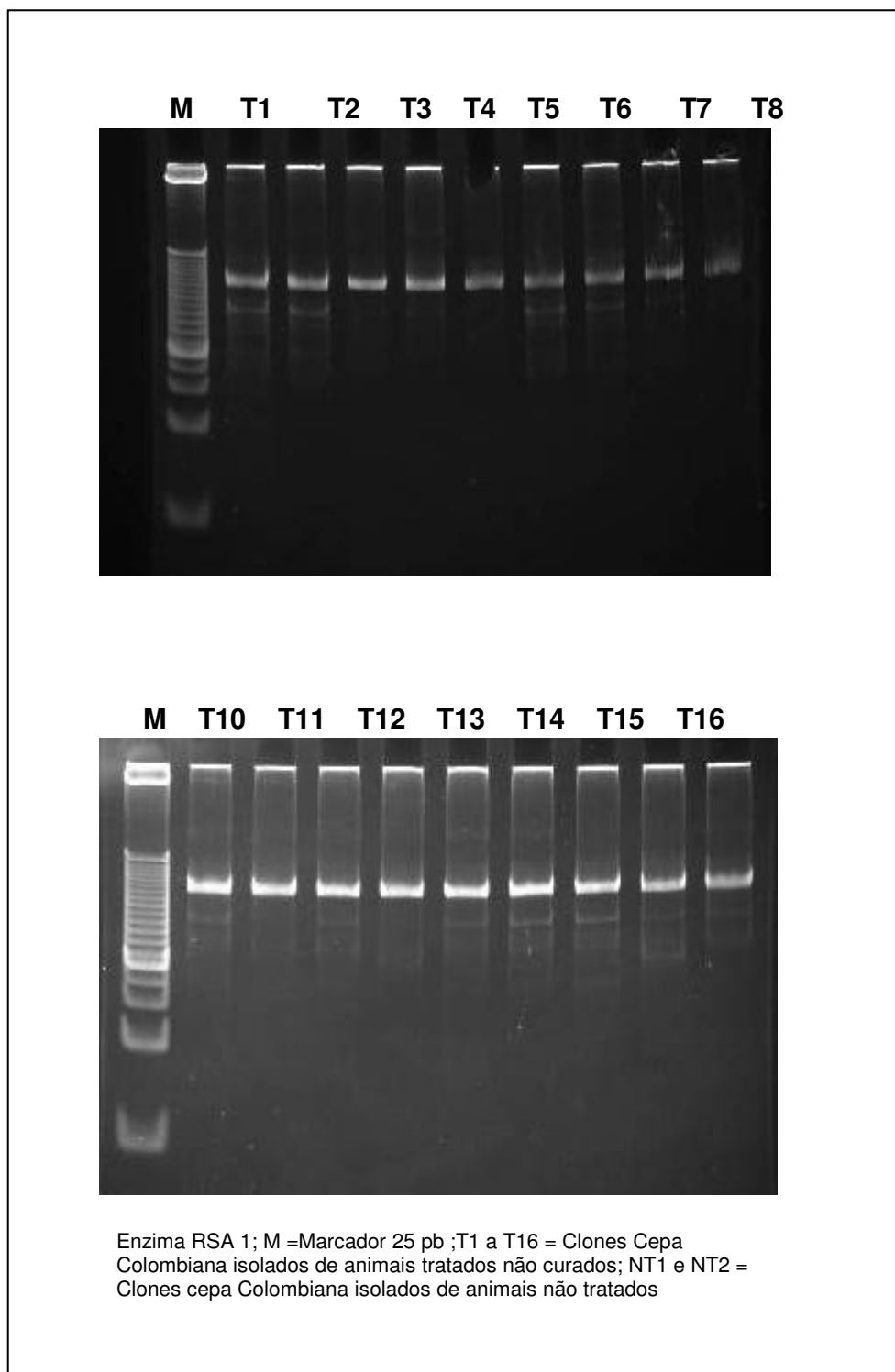


Figura 20 – Revelação em gel de poliacrilamida dos fragmentos de restrição do K-DNA da cepa Colombiana, pela técnica de RFLP, utilizando as enzimas ECO R1, HINF 1 e RSA1.



Figura 20

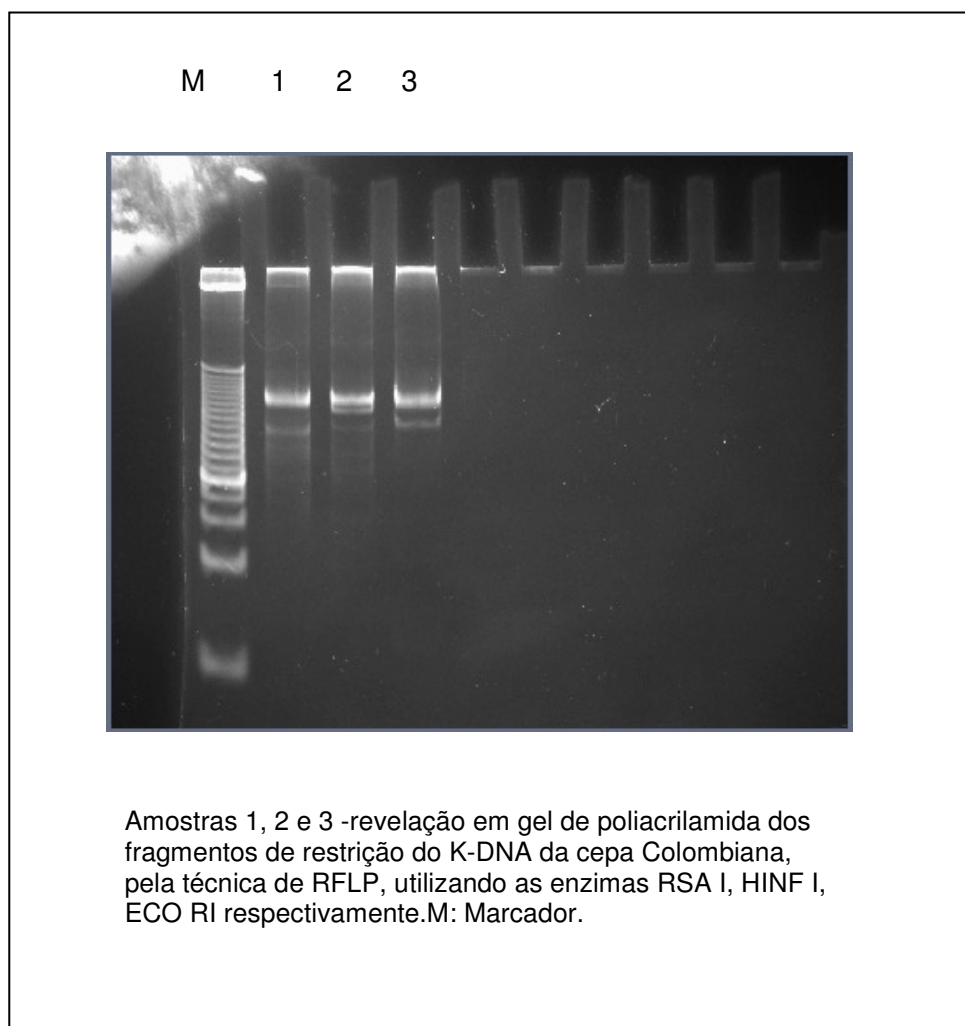


Figura 21 - Revelação em gel de poliacrilamida dos fragmentos de restrição do K-DNA dos clones isolados da cepa 21SF, pela técnica de RFLP, utilizando a enzima ECO R1. Amostra dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL- 21SF (T1 a T4). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL-21SF (NT1 E NT2). Cepa parental: CP.

Figura 22 - Figura 20 – Revelação em gel de poliacrilamida dos fragmentos de restrição do K-DNA da cepa 21SF, pela técnica de RFLP, utilizando a enzima HINF I. Amostra dos clones isolados de animais tratados e não curados: CL- 21SF (T1 a T4). Amostras dos clones isolados de animais não tratados: CL- 21SF (NT1E NT2). Cepa parental: CP.

Figura 21

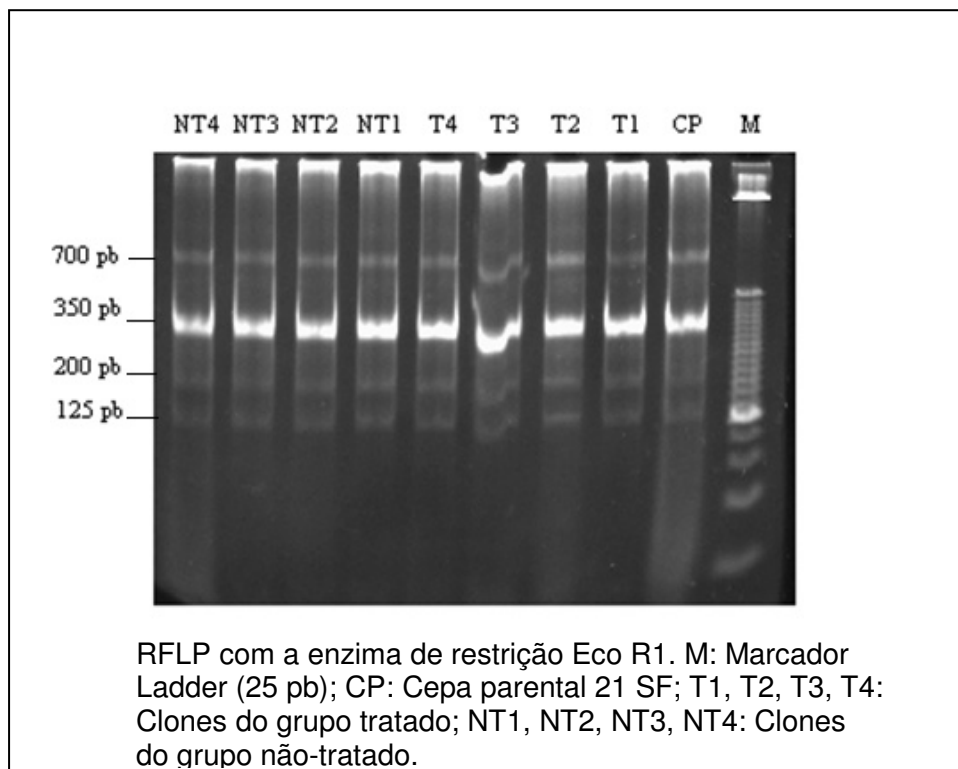


Figura 22

