UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas
prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas
com benzonidazol**

Larissa Alves dos Reis Dias

Ribeirão Preto
2014

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas
prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas
com benzonidazol**

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do título de
Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientada: Larissa Alves dos Reis Dias

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de
Albuquerque

Versão corrigida da Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia em 27/06/2014. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2014

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Dias, Larissa Alves dos Reis

Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol. Ribeirão Preto, 2014.

151 folhas.

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP - Área de concentração: Toxicologia.

Orientador: Albuquerque, Sérgio de

1. Doença de Chagas.
2. qPCR.
3. Benzonidazol.
4. Imunofluorescência.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Larissa Alves dos Reis Dias

Título: Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Toxicologia

Orientador: Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque

Aprovado em: 27/06/2014

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Assinatura: _____

Á Deus pela força e coragem durante toda caminhada, minha mãe Maura, pelo incentivo diário e meu pai Domingos. Obrigada por acreditarem na minha capacidade e esforço. E também pela compreensão e apoio durante todo percurso.

Agradeço a Deus, pois sem Ele eu não teria forças para seguir nessa longa jornada.

À minha família, por acreditar e investir em mim. Mãe, agradeço pelo cuidado, dedicação e consolo tanto nas horas difíceis e quantos nas lágrimas derramadas. Você me deu coragem para chegar até o fim. Pai, agradeço pela presença e segurança.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Sérgio de Albuquerque, por acreditar na minha competência, pela oportunidade dada, ensinamento e paciência. Obrigada por ser um exemplo do caminho a ser trilhado.

À Profa. Dra. Ana Patrícia Yatsuda Natsui, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP - USP, por permitir o uso do espectrofotômetro para quantificação de DNA das amostras utilizadas neste trabalho.

Ao seu pós-graduando Luiz Miguel Pereira, pelas sugestões e conselhos para a execução e cálculos da técnica de Real Time PCR.

Ao Prof. Dr. Sérgio Akira Uyemura e à pós-graduanda Fernanda Gomes Cardoso, do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas da FCFRP – USP, por permitir o uso do termociclador e pela assessoria essencial para a execução de etapas deste trabalho.

Aos funcionários do laboratório, especialmente à Inara, pela amizade e companheirismo e ao Georgius, pelo auxílio na manipulação dos animais utilizados neste trabalho.

Aos pós-graduandos do laboratório de Parasitologia da FCFRP - USP, especialmente ao Luiz Gustavo e Gisele pelo companheirismo, cumplicidade e amizade.

À Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP - USP pela oportunidade.

Aos funcionários da Pós- Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – FCFRP- USP, especialmente a Rosemary, a Rose, por ter me aturado todo esse tempo, seja para resolver meus problemas particulares ou os do EVTOX. Obrigada pela amizade, pelos conselhos e conversas. À Rosana por atender meus telefonemas fora do horário. E ao Henrique pelo atendimento sempre cortial, muito obrigada.

Aos amigos que fiz no decorrer deste período: Bruno, pelas longas conversas, passeios, compras e amizade verdadeira. Airton pela oportunidade da amizade

e convivência. As Anas, Ana Cláudia e Ana Débora e também a Juçara pela amizade e consolo. A Gabi pela longa amizade e convivência. E a Greyce por ter me permitido conhece-la verdadeiramente deixando os julgamentos de lado.

Aos animais utilizados neste trabalho que se sacrificaram inocentemente em prol desta pesquisa.

À CAPES, pelo suporte financeiro e pela bolsa de estudo concedida.

À Fapesp pelo suporte financeiro.

A todos que alguma forma contribuiu direta ou indiretamente para conclusão deste trabalho.

Muito Obrigada.

RESUMO

DIAS, L.A.R. Avaliação de possíveis alterações teciduais de camundongas prenhas infectadas oralmente por *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol. 2014. 151f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

A transmissão oral ganhou destaque devido aos recentes surtos que ocorreram no Brasil com a ingestão de alimentos contaminados, além dessa via outra de grande importância é a transmissão transplacentária, sendo assim o presente trabalho associou as duas formas de transmissão da doença, juntamente com o tratamento com o benzonidazol único medicamento disponível no Brasil para o tratamento da doença. O medicamento é adotado somente para o tratamento da fase aguda, porém alguns pesquisadores mostraram alguns benefícios da terapia com benzonidazol na fase crônica da doença podendo o medicamento diminuir o avanço da doença e prolongar a soro conversão negativa em pacientes intermediários. Assim o objetivo deste trabalho foi de investigar a eficácia do tratamento tanto na fase aguda quanto na fase crônica da doença, bem como o efeito do tratamento em fêmeas de fase crônica. Utilizou-se camundongos Balb/c infectados com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *T. cruzi* administrado via oral. Os animais de fase aguda tratados receberam 50mg/Kg/dia de benzonidazol por 16 dias enquanto que aos animais de fase crônica o tratamento se iniciou ao 3º dia de gestação sendo administrado pelo mesmo período. O curso da parasitemia sanguínea foi verificada bem como ao fim do tratamento a parasitemia tecidual em baço, fígado e coração; placenta e feto, quando havia, empregando-se as técnicas de qPCR, com dois distintos métodos de cálculos matemáticos, imunofluorescência em microscopia confocal e análise histopatológica por coloração HE. A administração de benzonidazol proporcionou a diminuição das cargas parasitárias de baço, fígado e coração elucidando a eficácia do medicamento também em fase crônica. Porém em placenta e feto o medicamento gerou aumento de parasitas teciduais nos grupos que receberam tratamento em detrimento aos que não receberam. Deste modo, podemos sugerir que o tratamento com benzonidazol pode ser indicado para minimizar a carga de parasitas ou até mesmo para sua completa erradicação em indivíduos em fase crônica. Bem como, sugerimos que o medicamento deve ser ofertado por maior tempo aos indivíduos chagásicos tanto na fase aguda quanto na fase crônica visto que apresenta melhores resultados com o prolongamento da terapia. Entrementes dissuadimos o tratamento durante o período gestacional visto que, pode induzir a diminuição das barreiras imunológicas maternas e/ou facilitar a migração parasitária para os tecidos placentários e fetais.

Palavras-chave: Doença de Chagas; Infecção oral; gestação; qPCR; Benzonidazol; Imunofluorescência.

ABSTRACT

DIAS, L.A.R. **Evaluation of possible tissue changes _ in pregnant mice infected orally with *T. cruzi* and treated with benznidazole.** 2014. 151f. Dissertation (Master). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2014.

Chagas' disease affect millions of people around the world and the benznidazole is the only drug for the treatment in Brazil, but it is used basically for the acute phase of the disease. Some researchers showed many benefits of benznidazole therapy in chronic phase like reduction of the progression of the disease. Therefore, the objective of this work was investigate the efficacy of treatment in both acute and chronic phase of this disease, as well as the effect of treatment of female mouse in chronic phase. Balb/c mice were infected with 2×10^5 trypomastigotes forms of RC strain of *Trypanosoma cruzi* by oral route. Mice in acute phase were treated with 50mg/Kg/day Benznidazole for 16 days. Some chronically-infected mice were treated by 3rd to 18th day of gestation with the same dose. Blood parasitaemias were determined by microscopic examination of tail vein blood amount. Tissues parasitism were determined by qPCR with two different mathematical forms, immunofluorescence confocal microscopy and histopathology by HE staining. Administration of benznidazole promoted decrease of parasites in spleen, liver and heart indicating the efficacy of the drug in the chronic phase. However in placenta and fetus the drug caused tissues parasites increased in the groups that received treatment. Therefore, we suggest that the treatment with benznidazole would be indicated to minimize the number of parasites or eliminate them in individuals in chronic phase. As well, we suggest that the drug should be offered for longer chagasic individuals to both acute and chronic phase because it shows better results with prolonged therapy. However, our results indicate the treatment do not be offered during pregnancy because it can induce the decrease of maternal immunological barriers and facilitate the parasite migration to the placental and fetal tissues.

Keywords: Chagas Disease; Oral infection; pregnancy; qPCR; benznidazole; Immunofluorescence.

Figura 1: Delineamento experimental.....	17
Figura 2: Programa de temperaturas no termociclador.	22
Figura 3: Parasitemia fase aguda em camundongas balb/c não prenhas infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa rc de <i>Trypanosoma cruzi</i> do 5° ao 24° dia após a infecção. resultados com n= 10 animais/grupo experimental...27	27
Figura 4: Curva padrão gerada com 7 diluições seriadas do DNA extraído de cultura de epimastigotas da cepa RC do <i>Trypanosoma cruzi</i> . (A) Curva de amplificação de <i>T. cruzi</i> proveniente de 10^6 a 1 cópia do gene. (B) Demonstração dos pontos de diluição para <i>T. cruzi</i> em relação ao ciclo de amplificação (ct). (C) Gráfico de amplificação ($\Delta Rn \times$ ciclo) do DNA de <i>T. cruzi</i> , <i>Threshold</i> = 331 e <i>Baseline</i> com ajuste automático.	29
Figura 5: Curva padrão gerada com 6 diluições seriadas do DNA extraído de coração de camundongo Balb/c sadio. (A) Curva de amplificação de GAPDH proveniente de 10^5 a 1 cópia do gene. (B) Demonstração dos pontos de diluição para GAPDH em relação ao ciclo de amplificação (ct). (C) Gráfico de amplificação ($\Delta Rn \times$ ciclo) do DNA de GAPDH, <i>Threshold</i> = 495 e <i>Baseline</i> com ajuste automático.	31
Figura 6: Número de cópias de <i>T. cruzi</i> / GAPDH em baço de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.....	33
Figura 7: Número de parasitas/tecido em baço de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey, onde: a) NPI vs NPIB b) NPI vs INPPB 60 c) NPIB vs INPP 60 d) INPP 60 vs INPPB 60, $p < 0,0001$	34
Figura 8: Número de cópias de <i>T. cruzi</i> / GAPDH em baço de fêmeas fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> . comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de <i>Mann-Whitney</i> , $p = 0,0003$	35
Figura 9: Número de parasitas/tecido em baço de fêmeas fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> . Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de <i>Mann-Whitney</i> , $p < 0,05$	36
Figura 10: Número de cópias de <i>T. cruzi</i> / GAPDH em baço de fêmeas fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de	

Trypanosoma cruzi. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. ...37

Figura 11: Número de parasitas/tecido em baço de fêmeas fase crônica infectadas infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. ...38

Figura 12: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em fígado de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.....39

Figura 13: Número de parasitas/tecido em fígado de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.....40

Figura 14: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em fígado de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p = 0,0005$41

Figura 15: Número de parasitas/tecido em fígado de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,005$42

Figura 16: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em fígado de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. ...43

Figura 17: Número de parasitas/tecido em fígado de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. ...44

Figura 18: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em coração de camundongas balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.....45

Figura 19: Número de parasitas/tecido em coração de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de

Trypanosoma cruzi, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey, $p < 0,05$46

Figura 20: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$47

Figura 21: Número de parasitas/tecido em coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$48

Figura 22: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em coração de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. ...49

Figura 23: Número de parasitas/tecido em coração de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. ...50

Figura 24: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em placenta de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Ahitney*, $p < 0,0001$51

Figura 25: Número de parasitas/tecido em placenta de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. ...52

Figura 26: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p = 0,001$53

Figura 27: Número de parasitas/tecido em feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*.....54

Figura 28: Número de cópias de <i>T. cruzi</i> / GAPDH em tecidos de baço, fígado e coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.	55
Figura 29: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado e coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.	56
Figura 30: Número de cópias de <i>T. cruzi</i> / GAPDH em tecidos de baço, fígado e coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.	57
Figura 31: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado e coração de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.	58
Figura 32: Número de cópias de <i>T. cruzi</i> / GAPDH em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.	59
Figura 33: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.	60
Figura 34: Número de cópias de <i>T. cruzi</i> / GAPDH em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> e tratadas com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.	61
Figura 35: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , e tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. . Análise estatística pelo teste de Tukey.	62
Figura 36: Baço de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , Grupo NPI. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.	64

- Figura 37:** Baço de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, grupo NPIB. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 x.65
- Figura 38:** Baço de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.66
- Figura 39:** Baço de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.67
- Figura 40:** Fígado de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo NPI. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.69
- Figura 41:** Fígado de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, Grupo NPIB. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.70
- Figura 42:** Fígado de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.71
- Figura 43:** Fígado de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.72
- Figura 44:** Coração de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo NPI. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.74
- Figura 45:** Coração de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, Grupo NPIB. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.75
- Figura 46:** Coração de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60.

Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.
.....76

Figura 47: Coração de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.....77

Figura 48: Placenta de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.
.....79

Figura 49: Placenta de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.....80

Figura 50: Feto de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.
.....82

Figura 51: Feto de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X.....83

Figura 52: Seção Histopatológica de baço de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol. Grupo NPIB. Hematoxilina e eosina (100x).84

Figura 53: Seção Histopatológica de baço de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo INPP 60. Hematoxilina e eosina (400x).85

Figura 54: Seção Histopatológica de fígado de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, com infiltrado inflamatório. Grupo NPI. Hematoxilina e eosina (100x).86

Figura 55: Fotomicrografias de fígado de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, com infiltrado inflamatório (A) Grupo NPI (B) Grupo NPIB. Hematoxilina e eosina (400x).
.....87

- Figura 56:** Fotomicrografias de fígado de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* com infiltrado inflamatório (A) Grupo INPP 60 (B) Grupo INPPB 60. Hematoxilina e eosina (400x).88
- Figura 57:** Seção Histopatológica de coração de fêmea de fase aguda infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, tratadas com benzonidazol com infiltrado inflamatório Grupo NPIB. Hematoxilina e eosina (100x).....89
- Figura 58:** Fotomicrografias de coração de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* grupo INPP 60. (a) Corte com pericardite (b) Corte com infiltrado inflamatório. Hematoxilina e eosina (400x).90
- Figura 59:** Seção histopatológica de coração de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, tratada com benzonidazol. grupo INPPB 60. (a) Corte com pericardite (b) Corte com infiltrado inflamatório. Hematoxilina e eosina (400x).90
- Figura 60:** Fotomicrografias de coração de fêmea de fase aguda infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo NPI. (A) Corte com pericardite (B) Corte com infiltrado inflamatório. Hematoxilina e eosina (400x).....91
- Figura 61:** Fotomicrografias de coração de fêmea de fase aguda infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol. Grupo NPIB. (A) Corte com infiltrado inflamatório. (B) Corte com pericardite. Hematoxilina e eosina (400x).91
- Figura 62:** Seção Histopatológica de placenta de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo INPP 60. Hematoxilina e eosina (100x).....92
- Figura 63:** Fotomicrografias de placenta de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo INPP 60. Hematoxilina e eosina (400x).....93
- Figura 64:** Fotomicrografias de seção histopatológica de feto de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, tratada com benzonidazol. Grupo INPPB 60. Hematoxilina e eosina (100x).....94

Tabela 1: Preparo das soluções para eletroforese.	19
Tabela 2: Sequências iniciadoras dos <i>Primers Cruzei 1</i> , <i>Cruzei 2</i> e sonda <i>Cruzei 3</i>	20
Tabela 3: Sequências iniciadoras dos <i>Primers GAPDH forward</i> e <i>reverse</i>	20
Tabela 4: Volume de <i>Primers</i> e Sonda adicionada na preparação do mix utilizado na amplificação de <i>T. cruzi</i> . * Mix (2x): <i>TaqMan PCR Master Mix</i> contendo DNA-polimerase <i>AmpliTaq Gold</i> , glicosilase DNA-Uracil e dTNPs com dUTP.	21
Tabela 5: Volume de <i>Primes</i> e sonda adicionado à preparação do mix utilizado na amplificação do normalizador GAPDH. * Mix (2x): <i>TaqMan PCR Master Mix</i> contendo DNA- polimerase <i>AmpliTaq Gold</i> , glicosilase DNA-Uracil e dTNPs com dUTP.	21
Tabela 6: Número de cópias do gene e concentração DNA de <i>T. cruzi</i> da curva padrão.	28
Tabela 7: Valores Curva padrão.	29
Tabela 8: Número de cópias do gene e concentração DNA de camundongo da curva padrão.	30
Tabela 9: Valores Curva padrão.	32
Tabela 10: Representação da Reprodutibilidade das triplicatas das reações de RT-PCR na quantificação de DNA de <i>T. cruzi</i> e do normalizador GAPDH nos cinco diferentes tecidos estudados nesse trabalho.	32
Tabela 11: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em baço de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , nos grupos experimentais: Fêmeas fase aguda (NPI), Fêmeas fase aguda e tratadas com benzonidazol (NPIB), Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10.	63
Tabela 12: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em fígado de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , nos grupos experimentais: Fêmeas fase aguda (NPI), Fêmeas fase aguda e tratadas com benzonidazol (NPIB), Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10.	68
Tabela 13: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em coração de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de <i>Trypanosoma cruzi</i> , nos grupos experimentais: Fêmeas fase aguda (NPI), Fêmeas fase aguda e tratadas com benzonidazol (NPIB), Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10.	73

Tabela 14: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em placenta de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, nos grupos experimentais: Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10.78

Tabela 15: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em feto de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, nos grupos experimentais: Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10.81

CDC – Centro de Controle e Prevenção de Doenças

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

Ct – *Threshold cycle*

DDG – Dia de gestação

DDI – Dia de infecção

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DTUs – Unidades de Tipagens Distintas

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

ELISA – Teste imunoenzimático

EPIs – Equipamentos de Proteção Individual

et al. – e colaboradores

FCFRP – Faculdade de Ciência Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz

GAPDH – Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase

HAI – Hemaglutinação indireta

HE – Hematoxilina-Eosina

IBMQ – *Integrated Bayesian Modeling of eQTL*

ICC – Insuficiência Cardíaca Congestiva

IFI – Imunofluorescência indireta

IgG – Imunoglobulina do tipo G

IgM – Imunoglobulina do tipo M

INPP 60 – Fêmeas infectadas em fase crônica prenhes

INPPB 60 – Fêmeas infectadas em fase crônica prenhes tratadas com benzonidazol

IOC – Instituto Oswaldo Cruz

NADH – Dinucleótido de nicotinamida e adenina

NPI – Fêmeas infectadas não prenhes

NPIB – Fêmeas infectadas não prenhes tratadas com benzonidazol

PCR – Reação em cadeia da polimerase

qPCR – Reação em cadeia da polimerase quantitativa

RT-PCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo Real

T CD8⁺ – Linfócito T com receptor CD8⁺

TAE – Tampão Tris-Acetato-EDTA

TBS – Tampão Tris Salina

TNF- α – Fator de necrose tumoral α

USP – Universidade de São Paulo

OMS – Organização Mundial da Saúde

% – Porcentagem

® - Marca Registrada

°C – Graus Celsius

pH – Potencial hidrogeniônico

R – Coeficiente de correlação

Rpm – Rotações por minuto

TM – Marca Registrada

Vs – *Versus*

Δ – Delta

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	xiii
Lista de Abreviaturas e Siglas	xvi
Lista de Símbolos	xix
1. Introdução	1
1.1. Aspectos morfológicos	2
1.2. Transmissão	3
1.2.1. Transmissão vertical	5
1.2.2. Transmissão oral	6
1.3. Fases, formas da doença e quadro clínico	7
1.4. Diagnóstico laboratorial	8
1.5. Tratamento	9
2. Objetivos	13
2.1. Objetivo geral	13
2.2. Objetivos específicos	13
3. Materias e métodos	15
3.1. Comitê de ética	15
3.2. Animais	15
3.3. Cepa de <i>Trypanosoma cruzi</i> e inóculo	15
3.4. Delineamento experimental	16
3.5. Avaliação parasitemica sanguínea e obtenção tecidual	18
3.5.1. Observação da parasitemia sanguínea	18
3.5.2. Técnica de dissecção tecidual	18
3.6. PCR em tempo real para quantificação de parasitos teciduais (qPCR)	18
3.6.1. Extração do DNA	18
3.6.2. Avaliação da integridade do DNA	19
3.6.3. Curvas padrão para qPCR	19
3.6.4. Preparo de <i>primers</i> e sonda	20
3.6.5. Preparo das reações e ciclo do qPCR	21
3.6.6. Normalização e eficiência da amplificação	22
3.7. Avaliação por imunofluorescência em microscopia confocal	23

3.8. Avaliação histológica	24
3.8.1. Técnica histológica	24
3.8.2. Determinação do índice de infecção tecidual e alterações histopatológicas.....	24
3.9. Análise estatística.....	25
4. Resultados	27
4.1. Parasitemia.....	27
4.2. Curvas padrão da qPCR.....	27
4.2.1. Curva padrão da qPCR para <i>T. cruzi</i>	27
4.2.2. Curva padrão da qPCR para GAPDH.....	30
4.3. Reprodutibilidade da amplificação	32
4.4. Baço	33
4.4.1. Baço nº de cópias.....	33
4.4.2. Baço nº parasitas.....	34
4.4.3. Baço NPI X NPIB nº de cópias	35
4.4.4. Baço NPI X NPIB nº de parasitas	36
4.4.5. Baço INPP 60 X INPPB 60 nº de cópias.....	37
4.4.6. Baço INPP 60 X INPPB 60 nº de parasitas.....	38
4.5. Fígado	39
4.5.1. Fígado nº de cópias.....	39
4.5.2. Fígado nº de parasitas.....	40
4.5.3 Fígado NPI X NPIB nº de cópias	41
4.5.4. Fígado NPI X NPIB nº de parasitas	42
4.5.5. Fígado INPP 60 X INPPB 60 nº de cópias.....	43
4.5.6. Fígado INPP 60 X INPPB 60 nº de parasitas.....	44
4.6. Coração	45
4.6.1. Coração nº de cópias.....	45
4.6.2. Coração nº de parasitas	46
4.6.3. Coração NPI X NPIB nº de cópias	47
4.6.4. Coração NPI X NPIB nº de parasitas	48
4.6.5. Coração INPP 60 X INPPB 60 nº de cópias	49
4.6.6. Coração INPP 60 X INPPB 60 nº de parasitas	50
4.7. Placenta.....	51
4.7.1. Placenta nº de cópias	51

4.7.2 Placenta nº de parasitas	52
4.8. Feto	53
4.8.1. Feto nº de cópias	53
4.8.2. Feto nº parasitas.....	54
4.9. Grupo NPI.....	55
4.9.1. Grupo NPI nº de cópias	55
4.9.2. Grupo NPI nº de parasitas	56
4.10 Grupo NPIB	57
4.10.1 Grupo NPIB nº de cópias	57
4.10.2 Grupo NPIB nº de parasitas.....	58
4.11. Grupo INPP 60	59
4.11.1. Grupo INPP 60 nº de cópias	59
4.11.2. Grupo INPP 60 nº de parasitas	60
4.12. Grupo INPPB.....	61
4.12.1. Grupo INPPB 60 nº de cópias.....	61
4.12.2. Grupo INPPB 60 nº de parasitas	62
4.13. Resultados da imunofluorescência em microscopia confocal	63
4.13.1. Intensidade do parasitismo no baço	63
4.13.2. Intensidade do parasitismo no fígado	68
4.13.3. Intensidade do parasitismo no coração	73
4.13.4. Intensidade do parasitismo na placenta.....	78
4.13.5. Intensidade do parasitismo no feto	81
4.14. Resultados histopatológicos	84
4.14.1. Baço	84
4.14.2. Fígado	86
4.14.3 Coração	89
4.14.4. Placenta e feto.....	92
5. Discussão.....	96
6. Conclusões	104
7. Referências bibliográficas	106
8. Anexo	117

1. INTRODUÇÃO

Descrita há 104 anos, pelo médico e pesquisador Carlos Ribeiro Justiniano Chagas, do Instituto Oswaldo Cruz (IOC), a doença de Chagas está presente na história da humanidade há cerca de 9.000 anos, sendo já detectada em múmias pré-colombianas em diferentes partes do Continente Americano (AUFDERHEIDE et al., 2004; HUEB, 2006).

Durante pesquisa sobre a malária, outra moléstia que assolava a população naquela época, Carlos Chagas realizou em seus estudos uma tripla descoberta, encontrando o vetor, o parasita e posteriormente identificando a patologia da nova enfermidade por ele descrita. Também caracterizou sua epidemiologia, meios de transmissão, profilaxia, sintomatologia, anatomia patológica, etiologia e suas formas clínicas (FERNANDES, 2005; KROPF, 2006).

No decorrer da pesquisa, encontrou formas flageladas de um tripanosoma no intestino de um inseto hemíptero. O inseto ocultava-se da claridade do dia, nas frestas das paredes de barro batido, das casas de pau-a-pique, e à noite saía para se alimentar, picando os moradores, principalmente na região da face. Esse hemíptero hematófago era conhecido vulgarmente como “barbeiro” (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; LANA et al., 2000). Após estudo verificou ser uma nova espécie de protozoário flagelado, denominando-o de *Trypanosoma cruzi* (*Schizotrypanum cruzi*), em homenagem ao mestre, Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1909).

Ainda em 1909, após analisar o sangue de uma menina de dois anos, Berenice, que apresentava sintomas clínicos agudos, Chagas encontrou o parasito, confirmando assim a descoberta de uma nova enfermidade humana (FERNANDES, 2005; LANA et al., 2000).

Mais de um século se passou desde sua descrição, porém poucos avanços foram dados após anos de pesquisa (TARLETON et al., 2012). Com incidência inicial do sul dos Estados Unidos à Argentina, a doença ganhou espaço atualmente, tanto nas demais áreas da América do Norte quanto na Europa e Ásia (SILVA et al., 2006; CUCUNUBÁ et al., 2012; BARRY et al., 2012).

O *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC) assim como a Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que existam cerca de 10 milhões de pessoas infectadas pelo *Trypanosoma cruzi* em todo o mundo.

Na América Latina estão cerca de 7,5 milhões e destas 5 milhões apenas no Brasil. Nos Estados Unidos este número é de cerca de 1 milhão (HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; BARRY et al., 2012; CDC, 2012; CARVALHO et al., 2011; WHO, 2012).

A doença possui uma incidência de 200.000 casos por ano (RASSI et al., 2012). Destes 14.000 são em países não endêmicos, e em torno de 13.000 pessoas morrem a cada ano, além de 28 milhões de pessoas encontrarem-se em risco de contrair a doença em quinze diferentes países. A alta incidência mundial é devido à globalização que facilitou a locomoção populacional entre a América Latina e os demais continentes em razão das migrações em busca de melhores condições sociais (CORTEZ et al., 2012; SILVA et al., 2012; HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; SHIKANAI-YASUDA et al., 2012; PÉREZ-MOLINA et al., 2012).

A enfermidade é característica da camada mais pobre da população, estando relacionada com o subdesenvolvimento e condições precárias de habitação (CHIPPAUX et al., 2010; BARRETT et al., 2012).

A doença de Chagas é um exemplo típico da consequência que as alterações produzidas pelo ser humano ao meio ambiente podem provocar. O hemoflagelado até então restrito a vida silvestre, presente apenas entre os mamíferos selvagens, passou a fazer parte do leque de doenças humanas quando o homem tomou posse de ecótopos, permitindo assim se incluir no ciclo epidemiológico da zoonose ocorrendo a sinantropia. (CORTEZ et al., 2012; LANA et al., 2000; WHO, 2002).

1.1. ASPECTOS MORFOLÓGICOS

O ciclo da doença envolve dois hospedeiros – intermediário e definitivo. No hospedeiro intermediário passam três formas morfológicas distintas de *T. cruzi*. Ao se alimentar de sangue infectado, o barbeiro ingere a forma tripomastigota sanguínea que ao atingir o intestino se converte em epimastigota, forma replicativa.

Após algumas semanas estas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos, forma não replicativa, que é eliminada nas fezes (CHAGAS, 1909).

No hospedeiro definitivo estão presentes duas formas do parasita, o tripomastigota e o amastigota. O tripomastigota metacíclico proveniente do vetor invade o tecido e as células próximas ao local do contato inicial, se convertem em formas amastigotas, replicam-se e em seguida transformam-se em tripomastigotas sanguíneas ainda no interior dessas células. No último estágio ocorre a explosão das células infectadas e as novas formas são enfim são liberadas, estas podem penetrar em novas células locais ou alcançar a corrente sanguínea atingindo os demais tecidos do hospedeiro (BARRETT et al., 2012; BARRY et al., 2012).

1.2. TRANSMISSÃO

A infecção pelo protozoário ocorre por diferentes tipos de transmissão como vetorial, transfusional, vertical (transplacentária), oral, aleitamento materno, acidentes laboratoriais, transplante de órgãos, via sexual e uso comunitário de drogas injetáveis (VINHAES et al., 2000; DIAS et al., 2011; CARTER et al., 2012).

A transmissão vetorial corresponde de 80 a 90% dos casos. O vetor pertence à família *Reduviidae* e as principais espécies transmissoras no Brasil são *Panstrongylus megistus*, *Triatoma infestans* e o *Rhodnius prolixus* (CARDOSO et al., 2006). A contaminação acontece quando um barbeiro infectado urina ou defeca sobre a pele lesada, liberando os tripomastigotas metacíclicos, ou quando o parasita entra em contato com mucosas oral, olfativa ou ocular (SILVA et al., 2012). Nenhum barbeiro nasce contaminado, não existindo portando a transmissão trans-ovariana, mas se infecta quando se alimenta do sangue humano ou de animal contaminado com o flagelado (GUIA PARA VIGILÂNCIA, PREVENÇÃO, CONTROLE E MANEJO CLÍNICO DA DOENÇA DE CHAGAS AGUDA TRANSMITIDA POR ALIMENTOS, 2009).

Existem três diferentes ciclos biológicos de transmissão: o silvestre, o doméstico e o peridoméstico. O ciclo silvestre ocorre entre os animais silvestres como gambás e tatus. O ciclo doméstico se iniciou com a invasão humana no ambiente silvestre, sendo que em seguida houve ocupação das frestas das casas de

barro pelos tritomíneos. Já o ciclo peridoméstico ocorre entre os animais que habitam os sótãos, telhados, porões e lugares próximos às habitações humanas (LANA et al., 2000; COURA, 2007).

No Brasil a transmissão vetorial da doença sofreu queda significativa devido a projetos governamentais de combate a seus vetores, principalmente a *Triatoma infestans* (DIAS et al., 2008; DIAS et al., 2011; SILVEIRA et al., 2011).

A transmissão sanguínea é a principal forma de transmissão da doença em países não endêmicos e em países que adotaram medidas de controle do vetor. Essas medidas ajudaram significativamente na queda da transmissão devido ao maior controle exercido pelos bancos de sangue, sendo que a transmissão por transfusão sanguínea representa atualmente de 8% a 18% dos casos da doença (CARTER et al., 2012).

O transplante de órgãos é ainda a segunda principal via de veiculação da doença de Chagas no mundo, principalmente em país não endêmicos. E pode ocorrer quando um doador está infectado, além da possibilidade de reativação da fase aguda da doença após um transplante quando o receptor já possui a patologia (KUN et al., 2009). Existe a possibilidade de transmissão por diferentes órgãos dentre eles o coração, fígado, medula óssea, pâncreas e rim. Essa forma de transmissão irá depender da parasitemia tecidual no momento da doação e do estado imunológico do receptor (DIAS et al., 2011; FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

A transmissão por aleitamento materno é rara não impedindo portando a amamentação proveniente de mãe infectada, exceto quando há fissura mamilar com extravasamento sanguíneo (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

Outra via rara e pouco notificada é a acidental, pois costuma ser devido a erros do manipulador de material biológico contaminado, despreparo técnico ou falta de uso apropriado de EPIs. Podem ocorrer em laboratórios ou hospitais, durante a manipulação de triatomíneos infectados ou materiais infectados como sangue, cultura do parasita, entre outros (KINOSHITA-YANAGA et al., 2009).

Como as duas principais formas de transmissão da doença de Chagas foram relativamente controladas em alguns países endêmicos, a transmissão vertical

(transplacentária), descrita já em 1911 por Carlos Chagas, ganhou destaque, assim como a transmissão oral, que teve relativo aumento devido a surtos recentes no Brasil e em outros países endêmicos.

1.2.1. TRANSMISSÃO VERTICAL

A transmissão vertical da doença de Chagas pode ocorrer em qualquer estágio de doença materna, fase aguda ou crônica, e em qualquer período da gestação. A transmissão é mais frequente entre o 4º e 9º mês de gestação, inclusive no momento do parto, na passagem do feto pelo canal vaginal, onde suas mucosas podem entrar em contato com o sangue infectado da mãe (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

Segundo o CDC (*Centers for Disease Control and Prevention*) a transmissão congênita ocorre em 1 a 10% das crianças nascidas de mães infectadas e depende de fatores desconhecidos (CUCUNUBÁ et al., 2012; CDC, 2012). Algumas condições podem favorecer tal processo como: cepa infectante, fatores placentários, obstétricos, imunológicos da mulher e sua nutrição, tempo de gestação, parasitemia e a fase da doença que a mulher se encontra enquanto grávida, sendo que na fase aguda aumentam-se as chances de infecção fetal em relação à fase crônica. Sabe-se que uma mesma mulher pode transmitir a doença a um filho e não transmiti-la nas demais gestações (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

Durante a gravidez ocorre uma relativa diminuição da imunidade mediada por células evitando assim a rejeição do feto, podendo a gestante estar mais susceptível à infecção (SANCHEZ et al., 2012; RAGHUPATHY et al., 2009).

A gravidez na presença de *T. cruzi* pode afetar sobremaneira o feto no seu desenvolvimento, crescimento e maturidade, causando em alguns casos: aborto, prematuridade, crescimento intrauterino retardado e malformações fetais. Há casos mais graves com nascimento de natimortos ou com diferentes manifestações clínicas, entre elas: febre, hepatomegalia, esplenomegalia e sinais de cardiopatia aguda ou comprometimento do sistema nervoso central. (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; TORRICO et al., 2004; RIVERA, 1995; BADRA et al., 2008).

Estima-se que a mortalidade no primeiro ano de vida em recém-nascidos infectados seja de 49% quando não devidamente tratados. Porém, quando é ofertado o tratamento correto, a recuperação em até 1 ano de vida é de 90 a 100% (CARDONI e ANTUNEZ, 2004).

Somente de 10 a 40% dos bebês apresentam sintomas como baixo peso ao nascer, hepatoesplenomegalia, dificuldade respiratória, anasarca e insuficiência cardíaca, sendo na maioria das vezes assintomáticos, dificultando assim o diagnóstico precoce da doença. Assim, os sinais clínicos apresentados pelos recém-nascidos não podem ser considerados marcadores importantes da patologia, havendo grande necessidade de um diagnóstico laboratorial precoce da doença (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; CDC, 2012).

1.2.2. TRANSMISSÃO ORAL

A transmissão oral ocorre através de alimentos contaminados com triatomíneos ou suas excretas que são trituradas durante a preparação de alimentos como o açaí, caldo de cana e suco de palma (WHO 2002; BARBOSA, 2006; DIAS et al., 2008; RAMÍREZ et al., 2013).

A transmissão pode ocorrer também por ingestão de carne crua ou mal passada de espécimes silvestres infectados, alimentos crus contaminados com urina ou secreção anal de marsupiais infectados, contaminação dos utensílios da cozinha usados durante o preparo dos alimentos, consumo inadequado de sangue de mamíferos contaminados e presença de baratas ou moscas, com fezes de triatomíneos, sobre os alimentos (DIAS et al., 2011; RAMÍREZ et al., 2013).

No Brasil, os primeiros casos de transmissão por via oral foram documentados na década de 1960, no Rio Grande do Sul, em Teutônia, por consumo de alimentos contaminados. Mais recentemente foram relatados novos casos com alguns óbitos confirmados devido ao consumo de caldo de cana, açaí e suco de palma, principalmente nos estados do norte, nordeste e sul do país (DIAS et al., 2011; NÓBREGA et al., 2009).

A doença por via oral não se restringe somente ao Brasil, sendo encontrados muitos casos em países próximos como Colômbia, que notificou quatro surtos da doença em sua forma aguda entre 1992 e 2008, além do México e Venezuela (DIAS et al., 2011; RÍOS et al., 2011).

Sabe-se que a incidência da infecção via oral é maior pela mucosa bucal se comparado às demais vias digestivas, esofagiana, gástrica e intestinal, visto que, a maior parte dos parasitas que irão causar a doença se utiliza da mucosa bucal para penetrar nas células do hospedeiro. Porém, uma porcentagem de protozoários que chegam ao estômago é capaz de resistir à passagem pelo suco gástrico estomacal, devido à proteção externa que possuem, determinada pela presença de glicoproteínas que interagem com a mucina gástrica, conseguindo assim ultrapassar a camada de muco, chegando à mucosa gástrica onde invadem células da mucosa e se diferenciam em formas amastigotas, replicam-se e transformam-se em formas tripomastigotas sanguíneas, as quais então são liberadas, atingindo novas células. Para este processo o período de incubação varia de 3 a 22 dias (BASTOS et al., 2010; CARDOSO et al., 2006; YOSHIDA et al., 2011).

A taxa de mortalidade devido à infecção oral por *T. cruzi* nas primeiras duas semanas após a infecção é de 8% a 35% dos infectados, devido principalmente a complicações como insuficiência cardíaca congestiva aguda, miocardite e meningoencefalite (SANCHEZ et al., 2012).

1.3. FASES, FORMAS DA DOENÇA E QUADRO CLÍNICO

São duas as fases da doença: aguda e crônica. A fase aguda da doença de Chagas inicia-se com manifestações no local de introdução de *T. cruzi* com um sinal característico, o sinal de Romaña ou um chagoma de inoculação, que aparece em 50% dos indivíduos dentro de 4 a 10 dias após a picada do inseto, regredindo em até 2 meses. Esta fase pode ser assintomática ou sintomática variando com a imunidade do hospedeiro. Os sintomas são em geral febre baixa, 37,5 a 38,0°C, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia, edema localizado e generalizado, poliadenia, insuficiência cardíaca e perturbações neurológicas (PINTO et al., 2004; LANA et al., 2000; SILVA et al., 2006).

A fase crônica compreende diferentes formas de manifestação da doença: indeterminada, cardíaca, digestiva e nervosa. A forma indeterminada é assintomática, podendo durar de 10 a 30 anos. É caracterizada por exames sorológicos positivos, ausência de sintomas e eletrocardiograma normal podendo haver discreta miocardite. Nesse estágio da doença, 30% dos indivíduos podem evoluir para a forma cardíaca (SILVA et al., 2006; FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; WHO, 2007).

A forma cardíaca acomete de 20 a 40% dos indivíduos infectados e seu quadro clínico é a insuficiência cardíaca congestiva (ICC) que ocorre pela diminuição de massa muscular substituída por fibrose (miocardiopatia inflamatória fibrosante). A ICC pode vir acompanhada de hipóxia, trombos cardíacos, desprendimento de êmbolo com possibilidade de infartos, gerando um quadro potencialmente fatal (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; LANA et al., 2000).

A forma digestiva engloba de 7 a 11% dos casos com sintomas indo desde tosse e soluço à disfagia, dor retroesternal, regurgitação e pirose devido à presença do megaesôfago e megacólon provocados pelo comprometimento do sistema nervoso autônomo. A fase nervosa da doença é muito controversa e pouco estudada, mas sabe-se que ocorre perda ou diminuição dos neurônios (LANA et al., 2000).

1.4. DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da doença de Chagas é realizado usando três principais critérios: o parasitológico, o sorológico e o molecular. O exame parasitológico positivo indica fase aguda da doença, pois na fase crônica a parasitemia encontra-se muito baixa não sendo detectada pelo exame direto do sangue periférico. No exame sorológico pesquisam-se anticorpos anti-*T. cruzi* classe IgM e IgG no sangue periférico (LANA et al., 2000; CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005).

Na década de 1990 foi desenvolvida a *Polymerase Chain Reaction* – PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) onde é amplificado o DNA do *T. cruzi*. Este método é altamente específico, pois permite detectar com sucesso as distintas

cepas de *T. cruzi* mesmo na presença de excesso de DNA humano que não interfere no processo de amplificação seletiva do DNA do protozoário (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014).

Posteriormente o *Real Time* Polymerase Chain Reaction – RT-PCR (Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real) veio potencializar a forma de diagnóstico das várias cepas de *T. cruzi*. O RT-PCR utiliza sondas fluorescentes que permitem o monitoramento contínuo da reação durante toda a amplificação do DNA. É uma técnica rápida, sensível, específica e com baixos riscos de contaminação, visto que a amplificação e detecção são realizadas em uma única etapa, não envolvendo novo contato com a amostra, ao contrário do PCR convencional (Mackay, 2004). Devido a todas as vantagens a técnica é a mais adequada para o diagnóstico, monitoramento e avaliação da resposta ao tratamento em indivíduos chagásicos.

Existem ainda outras formas de diagnóstico menos utilizadas como o xenodiagnóstico, hemocultura, inoculação do sangue em cobaias, além das sorológicas como hemaglutinação indireta (HAI), imunofluorescência indireta (IFI), teste imunoenzimático (ELISA) e *Western blot* (FIOCRUZ site acessado em 17/03/2014; COURA e PEREIRA, 2012).

1.5. TRATAMENTO

O tratamento atual é parcialmente eficaz, e compreende o benzonidazol e o nifurtimox, aplicados principalmente durante a fase aguda da doença, pois possuem baixa atividade terapêutica na fase crônica (BOSCARDIN et al., 2010). Esses medicamentos não podem ser aplicados em terapias prolongadas devido aos efeitos colaterais apresentados.

O benzonidazol, 2-(2-nitroimidazol-1-il)-N-(fenilmetilacetamida), foi primeiramente produzido em 1972 pela Roche que mais tarde cedeu a produção do medicamento para Lafepe que atualmente é o único distribuidor no país. É a única droga atualmente disponível no Brasil sendo administrado via oral por até 60 dias e age sobre as formas sanguíneas do parasita. A dose adotada para o tratamento em adultos é de 5-7 mg/dia/kg de peso corpóreo, e para crianças é de 5-10 mg/dia/kg de

peso corpóreo (SILVA et al., 2012; BARRETT et al., 2012; HASSLOCHER-MORENO et al., 2012; RIGALLI et al., 2012).

O medicamento é rapidamente absorvido no trato-gastrointestinal e metabolizado no fígado pelo sistema citocromo P450 e enzimas xantinas oxidoredutase e aldeído-oxidase. Pelo citocromo P450 é metabolizado pelas nitroredutase tipo I dependente de NADH que gera glioxal, agente citotóxico e mutagênico e pela nitroredutase tipo II que na presença de oxigênio favorece a formação de radicais livres intermediários e espécies reativas de oxigênio. Seus metabólitos são excretados via urinária (BARTEL et al., 2010; PÉREZ-MOLINA et al., 2009; RIGALLI et al., 2012).

Possui ação tripanossomicida contra todas as formas parasitárias, sendo mais eficiente contra as formas extracelulares (fase aguda) do que contra as formas intracelulares (fase crônica). A biodisponibilidade é relativamente elevada, 3 a 6 µg/mL, porém o risco de toxicidade dérmica ocorre em concentrações de 20µg/mL. Metabólitos reativos intermediários do medicamento se ligam covalentemente ao DNA, proteínas, lipídeos e macromoléculas do parasita promovendo alterações, como inativação de enzimas, inibição da síntese proteica, degradação do DNA, mutagênese e efeitos genotóxicos (BARTEL et al., 2010; CASTRO et al., 2006; MURCIA et al., 2012; PINAZO et al., 2013).

Não é a terapia ideal devido aos efeitos adversos secundários múltiplos como hipersensibilidade, lesões dérmicas, neurológicas entre outras. Além de sua eficácia limitada que pode estar relacionada com as propriedades farmacocinéticas desfavoráveis, tais como meia-vida curta, entorno de 12 a 15 horas. (DÍAZ-CHIGUER et al., 2012; PINAZO et al., 2013).

Existem evidências demonstrando os benefícios da terapia com benzonidazol na fase crônica da doença podendo o medicamento diminuir o avanço da doença e prolongar a soro conversão negativa em pacientes intermediários. A persistência no tratamento pode aumentar em até 18 vezes a probabilidade da resposta do paciente à terapia (PÉREZ-MOLINA et al., 2009; PINAZO et al., 2010)

O Nifurtimox, existente na América Central, pode ser utilizado como alternativa em caso de intolerância ao benzonidazol, porém causa mais efeitos

indesejáveis que o benzonidazol. Age sobre as formas sanguíneas e pouco sobre as teciduais, possui meia-vida de 3 horas e a dose indicada para adultos é de 8-10 mg/dia/kg de peso corpóreo e para crianças é de 15 mg/dia/kg de peso corpóreo, também administrado por via oral por até 90 dias.

O tratamento é sugerido para a fase aguda da infecção, fase crônica reativada e paciente menores de 18 anos infectados (OLIVEIRA et al., 2008).

Nas infecções crônicas ocorre uma exaustão imunológica induzida pelo parasita, com uma perda progressiva das células imunológicas específicas que atuam contra o patógeno (células T CD8+). Além disso, as citocinas que participam do controle da infecção por *T. cruzi* também induzem a patogenia durante a mesma, e essa pode ser exacerbada na presença do benzonidazol visto, que o medicamento pode afetar a regulação imunológica do hospedeiro (BUSTAMANTE et al., 2008; CUTRULLIS et al., 2011).

Essa desregulação imunológica juntamente com o aumento da produção materna de TNF- α (fator de necrose tumoral) pode ser responsável por diminuir a imunidade materna durante a gestação o que favorece a passagem das formas tripomastigotas sanguíneas através da barreira placentária podendo ainda atingir os tecidos fetais (BOUFKER et al., 2006).

Visto que a transmissão da Doença de Chagas por via oral e congênita são hoje consideradas importantes formas de transmissão do protozoário, devido aos programas implantados para reduzir a transmissão vetorial e melhorias no controle efetuadas nos bancos-de-sangue para se evitar a transmissão por transfusão sanguínea. Acreditamos na importância de se avaliar o comportamento de uma cepa silvestre de *T. cruzi* na transmissão oral e suas consequências no período gestacional bem como o impacto terapêutico do benzonidazol na diminuição da carga parasitária dos animais tratados. A cepa silvestre foi escolhida, pois as transmissões orais documentadas recentemente ocorreram por trituração de barbeiros infectados contendo cepas silvestres.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

O presente trabalho tem como objetivo geral avaliar os efeitos terapêuticos e tecidais do benzonidazol sobre a infecção experimental de camundongas fêmeas por *T. cruzi*, pela via oral.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar os efeitos deletérios da infecção congênita do protozoário *T. cruzi* em fêmeas prenhes infectadas por via oral, na fase crônica, através da incidência de transmissão vertical de *T. cruzi* na prole por meio da histopatologia e imunofluorescência.
 - Observar a eficácia do medicamento benzonidazol como fonte de tratamento também durante a gravidez, bem como as alterações tóxicas que ele determina nas fêmeas e na prole durante a fase crônica da infecção.
 - Padronizar e quantificar o índice de parasitismo por qPCR nos tecidos coletados: baço, fígado, coração, tecido fetal e placentário dos diferentes grupos.
-

3. MATERIAS E MÉTODOS

3.1. COMITÊ DE ÉTICA

O presente trabalho foi encaminhado para apreciação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) do Campus de Ribeirão Preto – USP, sendo aprovado e protocolado (nº 2012.1.187.53.8) por estar de acordo com os princípios éticos na experimentação animal.

3.2. ANIMAIS

Foram utilizadas 40 fêmeas, da linhagem Balb/c, entre a 4º e 16º semanas de vida, obtidos no Biotério da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - USP. Os animais foram escolhidos aleatoriamente para a montagem dos grupos de estudo e separados em grupos de cinco animais, em gaiolas de plástico (1520 cm² cada gaiola).

Todos os animais foram mantidos com ração comercial para roedores e água, *ad libitum*. As almofadas de serragem foram trocadas duas vezes por semana para evitar um acúmulo de amônia da urina. O biotério é mantido à temperatura ambiente de 22 ± 1 ° C, com um ciclo de claro/escuro de 12:12 horas sendo as luzes acesas 06:00 horas e apagadas à 18:00 horas.

As fêmeas foram acasaladas com machos adultos, da mesma linhagem, na proporção de duas fêmeas para cada macho, ao final de cada tarde. Na manhã seguinte foi verificada a presença de tampão vaginal e determinado o primeiro dia de gestação (DDG) onde as fêmeas foram separadas novamente dos machos.

3.3. CEPA DE *TRYPANOSOMA CRUZI* E INÓCULO

Para este estudo foi selecionada a cepa RC, uma cepa silvestre isolada por xenodiagnóstico, a partir da infecção natural do cachorro-do-mato, *Cerdocyon thous azarae*, encontrado na cidade de Cássia dos Coqueiros e descrito por Albuquerque e Barreto, 1970.

A cepa pertence à linhagem TC I da classificação DTUs (Unidades de Tipagens Distintas), e em camundongos a curva parasitêmica possui pico entre 12º e 14º dia da infecção com duração da fase aguda entre 27 e 40 dias após a inoculação (ALBUQUERQUE e BARRETO, 1970; CORTEZ et al., 2012; DOST et al., 2002; BURGOS, 2007).

Esta cepa vem sendo mantida no Laboratório de Parasitologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, armazenada em freezer – 80°C, com repiques esporádicos em camundongos por inoculação intraperitoneal.

O inóculo utilizado no presente trabalho foi de 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneos da cepa RC de *T. cruzi* por via oral. O sangue foi coletado de camundongo infectado e diluído em solução salina, sendo o número de formas tripomastigotas ajustado e determinado por contagem pelo método descrito por Brener, 1962. A infecção dos animais foi pela via oral com gotejamento de sangue contendo formas tripomastigotas sanguíneas diretamente na boca de cada animal.

A cepa silvestre foi adotada neste estudo visto que, a infecção oral ocorre quando há a trituração do barbeiro infectado juntamente com o alimento e o inseto é hospedeiro de cepa silvestre. Sendo assim para simular experimentalmente o que já ocorre utilizamos a cepa mantida em laboratório desde sua coleta na natureza.

3.4. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

Os animais foram divididos em fase aguda e fase crônica. A fase aguda foi analisada com a infecção das fêmeas, verificação da parasitemia entre o quinto e décimo primeiro dia de infecção (DDI), para confirmação da infecção e as fêmeas tratadas receberam benzonidazol por 16 dias.

A fase crônica foi analisada com a infecção das fêmeas, confirmação da infecção com a curva parasitemica do 5º DDI ao 27º DDI, onde não mais foram visualizadas formas tripomastigotas no sangue periférico. Então as fêmeas foram mantidas por 60 dias, período necessário para a doença entrar em sua fase crônica, ao 61º DDI foram postas para acasalamento que foi confirmado pela presença do tampão vaginal. Após a confirmação da prenhez, o tratamento foi iniciado ao 3º DDG, no período de implantação, e os animais foram eutanasiados no 18º DDG.

As fêmeas fase crônica foram tratadas com benzonidazol (50mg/Kg/dia; benzonidazol em pó diluído em água) por 16 dias, até o 18º DDG, esta dose foi adotada devido à dose utilizada para humano ser de 5 – 7 mg/Kg/dia, como o estudo foi realizado com camundongos essa dose foi multiplicada por 10 para que os resultados pudessem ser extrapolados para humanos.

Figura 1: Delineamento experimental.

NPI – Fêmeas não prenhes infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas e eutanásia no 18º DDI, n=10.

NPIB – Fêmeas não prenhes infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas tratadas com benzonidazol por 16 dias e eutanásia no 18º DDI, n=10.

INPP 60 – Fêmeas infectadas via oral com 2×10^5 formas de tripomastigotas, postas para acasalamento no 61º DDI e eutanásia no 18º DDG, n=10.

INPPB 60 – Fêmeas infectadas via oral com 2×10^5 formas de tripomastigotas, postas para acasalamento no 61º DDI e tratadas com benzonidazol a partir do 3º DDG por 16 dias e eutanásia no 18º DDG, n=10.

3.5. AVALIAÇÃO PARASITEMICA SANGUÍNEA E OBTENÇÃO TECIDUAL

3.5.1. OBSERVAÇÃO DA PARASITEMIA SANGUÍNEA

Para a observação do comportamento parasitêmico dos animais infectados e positividade de infecção foi colhido 5µL sangue da cauda das fêmeas infectadas, por meio de corte da extremidade desta, com tesoura esterilizada, sendo que após o corte a cauda foi cauterizada. A contagem dos parasitas foi realizada pelo método de Brener, 1962.

3.5.2. TÉCNICA DE DISSECÇÃO TECIDUAL

Os animais foram eutanasiados após o término do tratamento por deslocamento da cervical e após a divulsão da pele retirou-se imediatamente coração, fígado, baço, placenta e embriões, e foram lavados com solução fisiológica a 0,9%.

Os órgãos retirados foram divididos em duas porções equitativas. Uma porção de cada órgão foi colocada em fixador ALFAC e, após 24 horas, transferida para solução de álcool etílico a 80%. E posteriormente armazenada para as técnicas histológicas. A segunda porção foi congelada a - 80°C até o momento da extração de DNA para análise e avaliação do parasitismo tecidual por *qPCR*.

3.6. PCR EM TEMPO REAL PARA QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS TECIDUAIS (qPCR)

3.6.1. EXTRAÇÃO DO DNA

O DNA dos tecidos foi extraído através do kit comercial *ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System*, de acordo com as instruções do fabricante (Promega). O DNA em seguida foi quantificado (*GeneQuant – RNA/DNA Calculators of Amersham Biosciences*) e ajustado para a concentração de 20 ng/µL com água MilliQ autoclavada.

3.6.2. AVALIAÇÃO DA INTEGRIDADE DO DNA

As amostras de DNA foram avaliadas quanto a sua integridade por separação eletroforética em gel de agarose a 1% em tampão TAE (tampão Tris-Acetato-EDTA, pH 8.0). Foi utilizado como tampão de carregamento, *Gel Loading Dye Blue 6X*, (Biolabs, USA).

O DNA extraído foi submetido à eletroforese, procedimento necessário para verificar possível fragmentação do mesmo. Ao DNA amostral foi adicionado o tampão de carregamento (*loading buffer*) com a finalidade de aumentar a densidade, adicionar cor bem como adicionar corantes de mobilidade ou de migração à amostra. Também foi adicionado gel *red* (1:500) um corante fluorescente para ácidos nucleicos que exposto à luz ultravioleta emite alta fluorescência quando ligado ao DNA (Tabela 1).

Um marcador padrão para monitorar a corrida amostral (*DNA ladder*) foi preparado juntamente com Gel *red*, tal procedimento foi adotado para se comparar a marcação do DNA padrão com o amostral e verificar o peso molecular do fragmento (Tabela 1).

Tabela 1: Preparo das soluções para eletroforese.

Amostra	Marcador Padrão
10 µL DNA amostral	15 µL DNA <i>ladder</i>
2 µL <i>loading buffer</i>	3 µL Gel <i>red</i>
3 µL Gel <i>red</i>	-

Após a eletroforese verificou-se a integridade amostral e deu-se início a confecção da curva padrão e análise amostral.

3.6.3. CURVAS PADRÃO PARA qPCR

Duas curvas padrão foram construídas com diluições seriadas (1:10 – DNA: H₂O) a partir de DNA extraído de cultura de epimastigota e tecido cardíaco de camundongo Balb/c, para as curvas de *T. cruzi* e GAPDH, respectivamente.

3.6.4. PREPARO DE PRIMERS E SONDA

Foram adotados dois *primers* para *T. cruzi*, com sequências iniciadoras distintas, *Cruzi 1* e *Cruzi 2*, ambos na concentração de 6,25 μ M. A reação ocorreu na presença de sonda *TaqMan* MGB; *Cruzi 3*, na concentração de 25 μ M - (*Applied Biosystems*). A metodologia empregada baseou-se em Piron e colaboradores, 2007 e Schijman e colaboradores, 2011 (Tabela 2).

Tabela 2: Sequências iniciadoras dos *Primers* *Cruzi 1*, *Cruzi 2* e sonda *Cruzi 3*. Sendo *Cruzi 1* e *Cruzi 2* uma região genômica não transcrita.

<i>Primer</i> ou Sonda	Sequência	Marcação	Posição dos iniciadores	Concentração Pmol
<i>Cruzi 1 (forward)</i>	ASTCGGCTGATCGTTTTCGA	-	27–46	10.000
<i>Cruzi 2 (reverse)</i>	AATTCCTCCAAGCAGCGGATA	-	172–192	10.000
<i>Cruzi 3 (sonda)</i>	CACACACTGGACACCAA	5' FAM e 3' MGB	143–159	6.000

Para excluir as possíveis diferenças de peso causadas durante a pesagem do tecido para extração de seu DNA foi utilizado o normalizador interno Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), também com dois *primers*: GAPDH– *forward* e GAPDH– *reverse*, ambos na concentração de 10 μ M. A sonda empregada foi *TaqMan® Rodent GAPDH Control Reagents* -VIC na concentração de 20 μ M (*Applied Biosystems*), conforme metodologia de Cencig e colaboradores, 2011 (Tabela 3).

Tabela 3: Sequências iniciadoras dos *Primers* GAPDH *forward* e *reverse*.

Primer	Sequência	Concentração μ M
GAPDH - <i>forward</i>	5'-GACTTCAACAGCAACTCCCAC-3'	10
GAPDH - <i>reverse</i>	5'-TCCACCACCCTGTTGCTGTA-3'	10
Sonda	VIC	20

3.6.5. PREPARA DAS REAÇÕES E CICLO DO qPCR

As reações em triplicata, para cada amostra, foram preparadas com volume total de 10 μL , sendo 2,5 μL de DNA (20 ng) e 7,5 μL de Mix (tabela 4 e 5). Foram distribuídas em placas de 96 poços (*Fast 96-Well Reaction Plate*, 0,1 mL, *MicroAmp™*), centrifugadas a 5000 rpm por 1 minuto, seladas com adesivos – *Masterclear real-time PCR Film (adhesive)* - (Eppendorf), e encaminhadas ao termociclador - *Mastercycler ep realplex real-time PCR system*- (Eppendorf). Além das amostras em triplicatas cada placa continha uma triplicata de cada controle de *T. cruzi* e GAPDH.

Tabela 4: Volume de *Primers* e Sonda adicionada na preparação do mix utilizado na amplificação de *T. cruzi*. * Mix (2x): *TaqMan PCR Master Mix* contendo DNA- polimerase *AmpliTaq Gold*, glicosilase DNA-Uracil e dTNPs com dUTP.

Componentes <i>T. cruzi</i>	Volume adicionado (1 reação)
Primer - <i>Cruzi</i> 1	1,2 μL
Primer - <i>Cruzi</i> 2	1,2 μL
Sonda - <i>Cruzi</i> 3	0,1 μL
Mix (2x)*	5,0 μL

Tabela 5: Volume de *Primes* e sonda adicionado à preparação do mix utilizado na amplificação do normalizador GAPDH. * Mix (2x): *TaqMan PCR Master Mix* contendo DNA- polimerase *AmpliTaq Gold*, glicosilase DNA-Uracil e dTNPs com dUTP.

Componentes GAPDH	Volume adicionado (1 reação)
Primer - Forward	0,1 μL
Primer - Reverse	0,1 μL
Sonda - VIC	0,1 μL
H₂O	2,2 μL
Mix (2x)*	5,0 μL

O programa de ciclo de temperaturas da amplificação adotado pode ser visualizado na figura 2, conforme metodologia de Piron e colaboradores, 2007.

Figura 2: Programa de temperaturas no termociclador.

O programa computacional *Realplex* do termociclador após a amplificação, forneceu valores de Ct (*threshold cycle* - ciclo limiar) que corresponde ao ciclo o qual a amostra começou a emitir o sinal de amplificação, valores estes que foram utilizados para estimar o desvio padrão das triplicatas, sendo excluídos os que tornavam o desvio padrão maiores que 0,5. Posteriormente calculou-se as médias para cada amostra. As médias foram empregadas para obter o número de cópias do *T. cruzi* por amostra de tecido.

3.6.6. NORMALIZAÇÃO E EFICIÊNCIA DA AMPLIFICAÇÃO

A normalização dos dados, para excluir as possíveis diferenças de peso do tecido onde se extraiu o DNA, foi realizada com a divisão das médias dos valores obtidos para *T. cruzi* pelas médias dos valores obtidos para GAPDH, após a determinação por sobreposição às curvas padrão de *T. cruzi* e GAPDH para cada amostra.

A eficiência da amplificação foi calculada pela fórmula: Eficiência (E) = $[10^{(-1/slope)} - 1]$, onde *slope* representa a inclinação da curva padrão. Os resultados finais foram exportados para o programa estatístico *GraphPad Prism*, versão 5.0 para construção dos gráficos.

Ao fim dos ensaios quantitativos foram realizados dois cálculos matemáticos para obtenção respectivamente do número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH o que equivale à expressão gênica e obtido o número de parasitas em cada amostra de DNA quantificado. Os dois métodos foram adotados com o intuito de se verificar qual se apresentava mais sensível e eficiente para obtenção da eficiência do tratamento com benzonidazol.

3.7. AVALIAÇÃO POR IMUNOFLORESCÊNCIA EM MICROSCOPIA CONFOCAL

A imunofluorescência em microscopia confocal foi desenvolvida no início da década de 1980 e foi adotada, pois permite visualizar ninhos de amastigotas nos tecidos, através do uso de anticorpos ligados covalentemente a fluorocromos que reagem especificamente com o antígeno, os ninhos. O fluorocromo absorve a luz ultravioleta proveniente do laser na Microscopia Confocal (*Leica Microsystems*) são excitados e emite luz fluorescente (visível) (AOKI et al., 2010; Mortara et al., 1999).

A técnica foi desenvolvida nas mesmas amostras reservadas para histologia, após a confecção das lâminas, sem coloração HE. Os cortes foram desparafinizados com o derretimento da parafina em estufa a 60°C seguido banhos de xilol, hidratação em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes, seguidos de banhos de água.

Posteriormente as lâminas foram transferidas para cubas plásticas resistentes ao calor onde foi realizada a recuperação antigênica com Tampão Tris-EDTA (Tris 10 mm, EDTA 1 mm), pH 9,0 em panela de pressão para micro-ondas por 10 minutos na potência máxima do aparelho. Após o procedimento as lâminas descansaram por 1 hora até à temperatura ambiente. A solução da cuba foi substituída por Tampão TBS (Tris-hidroximetil-aminometano e NaCl, pH 8,0) *overnight*.

Após a solução de TBS, as lâminas foram incubadas por 45 minutos com solução bloqueadora composta por 2% de BSA juntamente com 0,5% de Triton-X e

5% de soro bovino fetal em água MilliQ. Posteriormente lavadas duas vezes em solução de TBS/Triton 0,1% seguido de duas lavagens em solução de TBS/Tween 0,05% ambas de 15 minutos cada.

Lavou-se em TBS por 15 minutos e incubou-se por 30 minutos com o anticorpo policlonal Anti-His-8-1-1 IBMQ com reatividade para *Trypanosoma cruzi* conjugado com FITC ligado na porção Fc do anticorpo (*Rheabiotec*) diluído em TBS/Tween 0,05% na concentração de 1:5. Seguidamente foram efetuadas quatro lavagens com TBS/Tween 0,05% de 15 minutos cada.

Cada lâmina foi lavada rapidamente em água MilliQ e montadas com 70 µL de Fluoromont G: TBS (2:1) e lamínulas e seladas com esmalte incolor e visualizadas em microscópico confocal.

3.8. AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

3.8.1. TÉCNICA HISTOLÓGICA

O material fixado em álcool etílico a 80% foi desidratado, diafanizado e incluído em parafina. Os cortes de 6 µm de espessura, semi seriados, foram corados pela hematoxilina-eosina.

3.8.2. DETERMINAÇÃO DO ÍNDICE DE INFECÇÃO TECIDUAL E ALTERAÇÕES HISTOPALÓGICAS

Após coletados e processados histologicamente, os órgãos foram submetidos a observação qualitativa dos diferentes índices de infecção parasitária tecidual.

O parasitismo tecidual foi estimado a partir da determinação do número de ninhos de amastigotas observados em 50 campos microscópicos em aumento de 400x. Para esta análise, foram utilizados cortes de 6µm dos tecidos de cada animal, obtidos em intervalos de 15 cortes para evitar a repetição de análise de um mesmo ninho, sendo um total de 15 cortes/tecido/animal. Os cortes foram focalizados ao microscópio óptico (*Axioskop 40 – Zeiss*) munido de câmara para captura de imagem, sendo as imagens projetadas e analisadas em programa de computador (*Axiovision – Carl Zeiss*).

Os tecidos foram avaliados histopatologicamente, a fim de serem observadas e comparadas, com as demais técnicas empregadas no presente trabalho, às alterações patológicas, determinadas pelo parasitismo, bem como possíveis alterações teciduais determinadas pelo efeito tóxico do benzonidazol.

3.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para os cálculos estatísticos dos dados obtidos para quantificação parasitária tecidual dos quatro grupos foi utilizado o teste não paramétrico de Tukey de múltipla comparação. As diferenças estatísticas para dois grupos de animais foram calculadas pelo teste *Mann-Whitney*, por meio da ferramenta computacional *GraphPad Prism*, versão 5.0. Todos os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando a probabilidade de erro foi menor que 5% ($p < 0,05$).

4. RESULTADOS

4.1. PARASITEMIA

A contagem de formas tripomastigotas sanguíneas foi realizada entre o 5º e 11º dia após a infecção para os grupos de fase aguda (NPI e NPIB), para a confirmação da infecção, e entre o 5º e 24º dia após a infecção nos dois grupos de fase crônica (INPP 60 e INPPB 60), para checagem do pico da infecção. Os animais pertencentes à fase crônica foram mantidos 60 dias após a infecção para a cronificação da doença. O pico parasitêmico foi evidenciado ao 14º dia após a infecção, com queda da parasitemia após o 18º dia de infecção.

Figura 3: Parasitemia fase aguda em camundongas balb/c não prenhas infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa rc de *Trypanosoma cruzi* do 5º ao 24º dia após a infecção. resultados com n= 10 animais/grupo experimental.

4.2. CURVAS PADRÃO DA qPCR

4.2.1. CURVA PADRÃO DA qPCR PARA *T. CRUZI*

A curva padrão com 7 pontos foi construída a partir de DNA extraído de cultura de epimastigota, organismo diploide, com material genético com tamanho de

87 Mb (87 fg), e com duas cópias de cada gene, ou seja 43,5 fg equivalem a uma cópia do DNA, como descrito na Tabela 6 (FREITAS et al., 2006).

Tabela 6: Número de cópias do gene e concentração DNA de *T. cruzi* da curva padrão.

Número de cópias	Concentração do DNA/ μL
1 cópia	43,5 fg
10 cópias	435 fg
10^2 cópias	4,35 pg
10^3 cópias	43,5 pg
10^4 cópias	435 pg
10^5 cópias	4,35 ng
10^6 cópias	43,5 ng

O DNA extraído foi quantificado e ajustado para a concentração de 17,4 ng/ μL , visto que o volume de DNA utilizado nas reações de amplificação foi de 2,5 μL logo neste volume teríamos 43,5 ng (10^6 cópias) de DNA de *T. cruzi*. Uma curva padrão foi obtida após amplificação das reações (Figura 4). A partir da curva padrão obteve-se a inclinação da reta (*slope*) e o ponto de intersecção da reta com o eixo Y (tabela 7). Com tais valores foi possível os cálculos para *T. cruzi*.

Figura 4: Curva padrão gerada com 7 diluições seriadas do DNA extraído de cultura de epimastigotas da cepa RC do *Trypanosoma cruzi*. (A) Curva de amplificação de *T. cruzi* proveniente de 10^6 a 1 cópia do gene. (B) Demonstração dos pontos de diluição para *T. cruzi* em relação ao ciclo de amplificação (ct). (C) Gráfico de amplificação ($\Delta Rn \times$ ciclo) do DNA de *T. cruzi*, *Threshold* = 331 e *Baseline* com ajuste automático.

Tabela 7: Valores Curva padrão.

Primer	SLOPE*	Intersecção**	R ²	Eficiência
<i>T. cruzi</i>	-3,556	28,45	0,995	>90%

*SLOPE: inclinação das curvas padrão. ** Intersecção com eixo Y.

4.2.2. CURVA PADRÃO DA qPCR PARA GAPDH

Uma segunda curva padrão foi construída utilizando o DNA extraído de tecido cardíaco de camundongos Balb/c mantidos no Laboratório de Parasitologia. Sendo o animal um organismo diploide, com material genético com tamanho de 2600 Mb (2600 fg), e com duas cópias de cada gene, ou seja 1300 fg (1,3 fg) equivalem a uma cópia do DNA, como descrito na Tabela 8.

Tabela 8: Número de cópias do gene e concentração DNA de camundongo da curva padrão.

Número de cópias	Concentração do DNA/ μ L
1 cópia	1,3 pg
10 cópias	13 pg
10^2 cópias	130 pg
10^3 cópias	1,3 ng
10^4 cópias	13 ng
10^5 cópias	130 ng

O DNA genômico extraído foi quantificado e ajustado para a concentração de 52 ng/ μ L, visto que o volume de DNA utilizado nas reações de amplificação foi de 2,5 μ L logo neste volume teríamos 130 ng (10^5 cópias) de DNA de camundongo. E uma curva padrão foi obtida após amplificação das reações (Figura 5). A partir da curva padrão obteve-se a inclinação da reta (*slope*) e o ponto de intersecção da reta com o eixo Y (tabela 9). Com tais valores foi possível o cálculo do número de cópias de GAPDH.

Figura 5: Curva padrão gerada com 6 diluições seriadas do DNA extraído de coração de camundongo Balb/c sadio. (A) Curva de amplificação de GAPDH proveniente de 10^5 a 1 cópia do gene. (B) Demonstração dos pontos de diluição para GAPDH em relação ao ciclo de amplificação (ct). (C) Gráfico de amplificação ($\Delta R_n \times$ ciclo) do DNA de GAPDH, *Threshold* = 495 e *Baseline* com ajuste automático.

Tabela 9: Valores Curva padrão.

Primer	SLOPE*	Intersecção**	R ²	Eficiência
GAPDH	-2,945	37,74	0,992	>90%

*SLOPE: inclinação das curvas padrão. ** Intersecção com eixo Y.

4.3. REPRODUTIBILIDADE DA AMPLIFICAÇÃO

A constância da amplificação foi avaliada em todos os ensaios, através de três reações de qPCR para cada amostra, que incluía quantificação do DNA parasitário bem como do controle endógeno. A tabela 10 representa a reprodutibilidade do ensaio para os cinco tipos de tecidos amostrais abordados neste trabalho. Foi calculado o desvio padrão e média para cada amostra, o desvio máximo adotado foi de 0,5 e quando este se apresentava superior ao desvio máximo, era excluído o valor da reação fora dos padrões e recalculada a média com base nos demais valores obtidos para as reações.

Tabela 10: Reprodutibilidade das triplicatas das reações de RT-PCR na quantificação de DNA de *T. cruzi* e do normalizador GAPDH nos cinco diferentes tecidos estudados nesse trabalho. Os valores das reações 1, 2 e 3 correspondem respectivamente aos valores de Ct emitidos ao fim da amplificação pelo *software* do equipamento utilizado. Ct corresponde ao momento da reação em que a fluorescência da amostra é detectada.

Amostra		Reação 1	Reação 2	Reação 3	Média	Desvio Padrão
Baço	<i>T. cruzi</i>	29,3	29,68	29,55	29,51	0,19
	GAPDH	22,3	22,98	23,89	22,64	0,48
Fígado	<i>T. cruzi</i>	29,87	29,78	29,23	29,63	0,34
	GAPDH	21,55	20,89	21,25	21,23	0,33
Coração	<i>T. cruzi</i>	29,86	29,87	29,62	29,78	0,14
	GAPDH	21,21	21,73	21,77	21,57	0,31
Placenta	<i>T. cruzi</i>	29,2	29,25	29,23	29,23	0,03
	GAPDH	21,46	21,92	21,57	21,65	0,24
Feto	<i>T. cruzi</i>	29,39	29,87	29,63	29,63	0,24
	GAPDH	25,12	25,13	25,68	25,31	0,32

4.4. BAÇO

4.4.1. BAÇO Nº DE CÓPIAS

De acordo com os dados apresentados na figura 6, podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significativas na comparação do número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH detectados pela PCR em tempo real em tecido de baço de camundongos Balb/c infectados com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. O parasito foi facilmente detectado em dois grupos (NPI e INPP 60, fase aguda e fase crônica, respectivamente) grupos esses que não receberam tratamento via oral com benzonidazol.

Figura 6: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em baço de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias), INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.4.2. BAÇO Nº PARASITAS

A figura 7 apresenta a comparação das cargas parasitárias detectadas pela PCR em tempo real em tecido de baço dos animais. Houve diferença extremamente significativa, $p < 0,0001$.

Figura 7: Número de parasitas/tecido em baço de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, $n = 10$ animais/grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey, onde: a) NPI vs NPIB b) NPI vs INPPB 60 c) NPIB vs INPP 60 d) INPP 60 vs INPPB 60, $p < 0,0001$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias), INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.4.3. BAÇO NPI x NPIB Nº DE CÓPIAS

A figura 8 representa os dados obtidos para o baço na comparação do número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectados pela PCR em tempo real em tecido de baço dos dois grupos de animais infectados de fase aguda e não prenhe. O grupo NPI (fêmeas fase aguda não tratadas com benzonidazol) apresentou um aumento extremamente significativo no número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH quando comparado ao grupo controle, NPIB. Este aumento do número de cópias pode ser devido ao grupo não ter recebido tratamento com benzonidazol ao contrário do grupo comparado, NPIB, que recebeu tratamento. O tratamento pode ter influenciado na queda do número de parasitas no tecido em questão, $p = 0,0003$.

Figura 8: Número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH em baço de fêmeas fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p = 0,0003$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.4.4. BAÇO NPI x NPIB Nº DE PARASITAS

A figura 9 representa a comparação da carga parasitária detectada pela técnica de PCR em tempo real em tecido de baço dos dois grupos de animais infectados de fase aguda e não prenhe. O grupo NPI (fêmeas não tratadas com benzonidazol) apresentou um aumento significativo quando comparado ao grupo controle, NPIB. O tratamento pode ter influenciado na queda do número de parasitas no grupo NPIB, $p < 0,05$.

Figura 9: Número de parasitas/tecido em baço de fêmeas fase aguda infectadas infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.4.5. BAÇO INPP 60 x INPPB 60 Nº DE CÓPIAS

Pela figura 10, podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de cópias detectadas pela PCR em tempo real em tecido de baço dos grupos de fêmeas de fase crônica prenhes.

Figura 10: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em baço de fêmeas fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.4.6. BAÇO INPP 60 x INPPB 60 Nº DE PARASITAS

Após normalização dos dados e de acordo com a visualização da figura 11, podemos observar que não houve diferença significativa na comparação dos dados obtidos pela PCR em tempo real em tecido de baço, dos grupos de fase crônica.

Figura 11: Número de parasitas/tecido em baço de fêmeas fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.5. FÍGADO

4.5.1. FÍGADO Nº DE CÓPIAS

Podemos observar na figura 12, que não houve diferenças estatisticamente significantes na comparação do número de cópias detectadas pela PCR em tempo real em tecido de fígado nos grupos de fêmeas infectadas.

Figura 12: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em fígado de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias), INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.5.2. FÍGADO Nº DE PARASITAS

A figura 13 apresenta a comparação das cargas parasitárias detectadas pela PCR em tempo real em tecido de fígado dos animais. Não houve diferença estatisticamente significativa nos grupos de fase aguda quando comparados quanto ao tratamento com benzonidazol, apesar da diferença visual no número médio de parasitos.

Figura 13: Número de parasitas/tecido em fígado de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias), INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.5.3 FÍGADO NPI x NPIB Nº DE CÓPIAS

Na figura 14, na comparação do número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectadas pela PCR em tempo real em tecido de fígado, o grupo NPI (fêmeas fase aguda não tratadas com benzonidazol) apresentou um aumento extremamente significativo quando comparado ao grupo controle, NPIB. Este aumento pode ser devido ao tratamento ter influenciado na queda do número de parasitas no tecido, $p = 0,0005$.

Figura 14: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em fígado de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p = 0,0005$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.5.4. FÍGADO NPI x NPIB Nº DE PARASITAS

Houve diferença estatisticamente significativa na comparação da carga parasitária detectada pela PCR em tempo real do tecido de fígado nos grupos de fêmeas em fase aguda e não prenhes, na figura 15, $p < 0,005$.

Figura 15: Número de parasitas/tecido em fígado de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,005$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.5.5. FÍGADO INPP 60 x INPPB 60 Nº DE CÓPIAS

Podemos observar na figura 16, que não houve diferenças estatisticamente significantes nos dois grupos analisados pela PCR em tempo real.

Figura 16: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em fígado de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.5.6. FÍGADO INPP 60 x INPPB 60 Nº DE PARASITAS

De acordo com os dados apresentados na figura 17, podemos observar que não houve diferença significativa na comparação do tratamento via oral com benzonidazol nos grupos de fêmeas prenhes de fase crônica.

Figura 17: Número de parasitas/tecido em fígado de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.6. CORAÇÃO

4.6.1. CORAÇÃO Nº DE CÓPIAS

A figura 18 representa os dados obtidos para o coração na comparação do número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectadas pela PCR em tempo real. De acordo com os dados apresentados podemos observar que não houve diferença estatisticamente significativa.

Figura 18: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em coração de camundongas balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias), INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.6.2. CORAÇÃO Nº DE PARASITAS

Na figura 19 podemos observar que houve diferença significativa na carga parasitária detectada pela PCR em tempo real, $p < 0,05$.

Figura 19: Número de parasitas/tecido em coração de camundongas Balb/c infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey, $p < 0,05$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias), INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.6.3. CORAÇÃO NPI x NPIB Nº DE CÓPIAS

De acordo com os dados apresentados na figura 20 houve diferença muito significativa no número de cópias de *T. cruzi*/GADPH detectadas pela PCR em tempo real na comparação dos dois grupos. O grupo NPI, que não recebeu tratamento via oral com benzonidazol, teve maior número de cópias que seu controle. Este aumento pode ser devido ao grupo não ter recebido tratamento com benzonidazol e este pode ter influenciado na queda do número de parasitas no tecido em questão, $p < 0,05$.

Figura 20: Número de cópias de *T. cruzi*/GADPH em coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.6.4. CORAÇÃO NPI x NPIB Nº DE PARASITAS

Na figura 21 podemos observar que houve diferença significativa na comparação dos dados de carga parasitária detectada pela PCR em tempo real dos grupos de fase aguda analisados, $p < 0,05$.

Figura 21: Número de parasitas/tecido em coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p < 0,05$. Onde NPI (fêmeas em fase aguda, não prenhes e sem tratamento), NPIB (fêmeas em fase aguda, não prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.6.5. CORAÇÃO INPP 60 x INPPB 60 Nº DE CÓPIAS

Na comparação dos grupos apresentados na figura 22, podemos observar que não houve diferenças estatisticamente significantes nos dois grupos analisados.

Figura 22: Número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH em coração de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.6.6. CORAÇÃO INPP 60 x INPPB 60 Nº DE PARASITAS

Quando comparamos, na figura 23, as cargas parasitárias detectadas pela PCR em tempo real dos dois grupos de fase crônica, podemos notar que não houve diferença significativa.

Figura 23: Número de parasitas/tecido em coração de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.7. PLACENTA

4.7.1. PLACENTA Nº DE CÓPIAS

A figura 24 representa os dados obtidos para placenta na comparação dos grupos INPP 60 e INPPB 60. Podemos observar que houve aumento extremamente significativo no número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectadas pela PCR em tempo real no grupo controle, INPPB 60 (fêmeas tratadas com benzonidazol) quando comparado ao grupo INPP 60 (fêmeas não tratadas com benzonidazol), este aumento pode ser explicado pelo benzonidazol diminuir a imunidade materna o que favorece a passagem das formas tripomastigotas sanguíneas através da barreira placentária. $P < 0,0001$.

Figura 24: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em placenta de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Ahitney*, $p < 0,0001$. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.7.2 PLACENTA Nº DE PARASITAS

De acordo com a figura 25 na comparação das cargas parasitárias detectadas pela PCR em tempo real de placenta dos grupos INPP 60 e INPPB 60. Podemos observar que não houve aumento significativo de parasitas no grupo controle INPPB 60 (fêmeas tratadas com benzonidazol) quando comparado ao grupo INPP 60 (fêmeas não tratadas com benzonidazol).

Figura 25: Número de parasitas/tecido em placenta de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.8. FETO

4.8.1. FETO Nº DE CÓPIAS

Quando comparamos, na figura 26, o número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectadas pela PCR em tempo real nos dois grupos de fase crônica, podemos notar que houve diferença muito significativa, $p = 0,001$

Figura 26: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, $n = 10$ animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*, $p = 0,001$. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.8.2. FETO Nº PARASITAS

De acordo com a figura 27, na comparação dos dados da carga parasitária detectada pela PCR em tempo real nos dois grupos de fase crônica, podemos notar que não houve diferença significativa.

Figura 27: Número de parasitas/tecido em feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Comparação da eficiência do tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de *Mann-Whitney*. Onde, INPP 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e sem tratamento) e INPPB 60 (fêmeas em fase crônica, prenhes e tratadas com benzonidazol por 16 dias).

4.9. GRUPO NPI

4.9.1. GRUPO NPI Nº DE CÓPIAS

A figura 28 estão representados os dados obtidos na comparação dos tecidos do grupo NPI e podemos observar que não houve diferença significativa no número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectadas pela PCR em tempo real entre os órgãos quando comparados entre si.

Figura 28: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em tecidos de baço, fígado e coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.9.2. GRUPO NPI Nº DE PARASITAS

Na comparação das cargas parasitárias detectadas pela PCR em tempo real do grupo NPI representados na figura 29, não houve diferença no número de parasitas quando baço e fígado são comparados entre si, porém houve ligeiro aumento do número de parasitas quando ambos são comparados com o coração.

Figura 29: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado e coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.10 GRUPO NPIB

4.10.1 GRUPO NPIB Nº DE CÓPIAS

De acordo com os dados da figura 30 podemos observar que não houve diferença significativa no número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectadas pela PCR em tempo real na comparação dos tecidos do grupo NPIB.

Figura 30: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em tecidos de baço, fígado e coração de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.10.2 GRUPO NPIB Nº DE PARASITAS

Segundo a figura 31 podemos observar que não houve diferença significativa na comparação da carga parasitária detectada pela PCR em tempo real dos tecidos do grupo NPIB.

Figura 31: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado e coração de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.11. GRUPO INPP 60

4.11.1. GRUPO INPP 60 Nº DE CÓPIAS

A figura 32 representa os dados obtidos no grupo INPP 60 quando comparados todos os órgãos entre si. Podemos observar que não houve diferença significativa no número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectada pela PCR em tempo real entre os órgãos quando comparados entre si.

Figura 32: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.11.2. GRUPO INPP 60 Nº DE PARASITAS

Comparando-se os dados de carga parasitária detectada pela PCR em tempo real no grupo INPP 60 observamos que não houve diferença estatisticamente significativa entre os órgãos.

Figura 33: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.12. GRUPO INPPB

4.12.1. GRUPO INPPB 60 Nº DE CÓPIAS

Na figura 34 temos todos os órgãos do grupo INPPB 60 comparados e nota-se que não houve diferença significativa no número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH detectadas pela PCR em tempo real.

Figura 34: Número de cópias de *T. cruzi*/ GAPDH em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.12.2. GRUPO INPPB 60 Nº DE PARASITAS

De acordo com a figura 35 não houve diferença significativa dos órgãos do grupo INPPB 60 quando comparados entre si.

Figura 35: Número de parasitas/tecido em tecidos de baço, fígado, coração, placenta e feto de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, e tratamento com benzonidazol, n= 10 animais/ grupo experimental. . Análise estatística pelo teste de Tukey.

4.13. RESULTADOS DA IMUNOFLUORESCÊNCIA EM MICROSCOPIA CONFOCAL

4.13.1. INTENSIDADE DO PARASITISMO NO BAÇO

De acordo com os dados reproduzidos na Tabela 11, podemos verificar que os grupos tratados com benzonidazol apresentaram significativa redução do número de ninhos de amastigotas no baço.

Tabela 11: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em baço de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, nos grupos experimentais: Fêmeas fase aguda (NPI), Fêmeas fase aguda e tratadas com benzonidazol (NPIB), Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10. Média dos ninhos de amastigotas em 15 campos visualizados.

Grupos	Nº de ninhos de amastigotas (Média)
NPI	7
NPIB	3
INPP 60	22
INPPB 60	13

A comparação das imagens de microscopia confocal corroboram as observações acima apontadas.

Pela comparação dos grupos não tratados (Figura 36) e tratados (Figura 37) com o benzonidazol na fase aguda da doença, podemos observar uma redução significativa do número de parasitos no segundo grupo, observando apenas a dispersão de antígenos no tecido, o que demonstra a efetividade do tratamento antiparasitário.

Figura 36: Baço de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo NPI. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Figura 37: Baço de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, grupo NPIB. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 x. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Situação diferente pode ser observada para os grupos não tratados e tratados dos animais de fase crônica. Como podemos observar pelas Figuras 38 e 39, houve praticamente o mesmo padrão de marcação antigênica para a situação de animais tratados e não tratados, o que corrobora os resultados encontrados nas reações quantitativas de qPCR.

Figura 38: Baço de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Figura 39: Baço de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

4.13.2. INTENSIDADE DO PARASITISMO NO FÍGADO

Segundo os dados reproduzidos na Tabela 12, podemos observar que os grupos tratados com benzonidazol apresentaram significativa redução do número de ninhos de amastigotas no fígado.

Tabela 12: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em fígado de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, nos grupos experimentais: Fêmeas fase aguda (NPI), Fêmeas fase aguda e tratadas com benzonidazol (NPIB), Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10. Média dos ninhos de amastigotas em 15 campos visualizados.

Grupos	Nº de ninhos de amastigotas (Média)
NPI	9
NPIB	3
INPP 60	15
INPPB 60	5

A comparação das imagens de microscopia confocal confirmam as observações acima apontadas.

Pela confrontação dos grupos não tratados (Figura 40) e tratados (Figura 41) com o benzonidazol na fase aguda da doença, podemos observar uma redução significativa do número de parasitos no segundo grupo, observando apenas a dispersão de antígenos no tecido, o que demonstra a efetividade do tratamento antiparasitário.

Figura 40: Fígado de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo NPI. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Figura 41: Fígado de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, Grupo NPIB. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Situação diferente pode ser observada para os grupos não tratados e tratados dos animais de fase crônica. Como podemos observar pelas Figuras 42 e 43, houve praticamente o mesmo padrão de marcação antigênica para a situação de animais tratados e não tratados, o que confirma os resultados encontrados nas reações quantitativas de qPCR.

Figura 42: Fígado de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Figura 43: Fígado de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

4.13.3. INTENSIDADE DO PARASITISMO NO CORAÇÃO

Conforme os dados reproduzidos na Tabela 13, podemos verificar que os grupos tratados com benzonidazol apresentaram significativa redução do número de ninhos de amastigotas no coração.

Tabela 13: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em coração de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, nos grupos experimentais: Fêmeas fase aguda (NPI), Fêmeas fase aguda e tratadas com benzonidazol (NPIB), Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10. Média dos ninhos de amastigotas em 15 campos visualizados.

Grupos	Nº de ninhos de amastigotas (Média)
NPI	10
NPIB	4
INPP 60	13
INPPB 60	5

A comparação das imagens de microscopia confocal corroboram as observações acima apontadas.

Pela comparação dos grupos não tratados (Figura 44) e tratados (Figura 45) com o benzonidazol na fase aguda da doença, podemos observar uma redução significativa do número de parasitos no segundo grupo, observando apenas a dispersão de antígenos no tecido, o que demonstra a efetividade do tratamento antiparasitário.

Figura 44: Coração de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo NPI. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Figura 45: Coração de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* e tratadas com benzonidazol, Grupo NPIB. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Situação diferente pode ser observada para os grupos não tratados e tratados dos animais de fase crônica. Como podemos observar pelas Figuras 46 e 47, houve praticamente o mesmo padrão de marcação antigênica para a situação de animais tratados e não tratados, o que corrobora os resultados encontrados nas reações quantitativas de qPCR.

Figura 46: Coração de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Figura 47: Coração de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

4.13.4. INTENSIDADE DO PARASITISMO NA PLACENTA

Segundo os dados reproduzidos na Tabela 14, podemos verificar houve inversão nas comparações, os animais tratados com benzonidazol apresentaram maior parasitismo em placenta em relação aos animais não tratados.

Tabela 14: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em placenta de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, nos grupos experimentais: Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10. Média dos ninhos de amastigotas em 15 campos visualizados.

Grupos	Nº de ninhos de amastigotas (Média)
INPP 60	2
INPPB 60	5

A comparação das imagens de microscopia confocal corroboram as observações acima apontadas.

Pela comparação dos animais não tratados (Figura 48) e tratados (Figura 49) com o benzonidazol na fase crônica da doença, podemos observar um aumento significativo do número de parasitos no segundo grupo, observando apenas a dispersão de antígenos no tecido, o que demonstra que o tratamento antiparasitário não foi efetivo.

Figura 48: Placenta de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

Figura 49: Placenta de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

4.13.5. INTENSIDADE DO PARASITISMO NO FETO

Nos dados reproduzidos na Tabela 15, podemos verificar novamente inversão nas comparações, os animais tratados com benzonidazol apresentaram maior parasitismo nos fetos, em relação aos animais não tratados.

Tabela 15: Análise quantitativa dos ninhos de amastigotas em feto de camundongas Balb/c infectadas via oral com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, nos grupos experimentais: Fêmeas prenhes fase crônica (INPP 60), Fêmeas prenhes, fase crônica e tratadas com benzonidazol (INPPB 60), n=10. Média dos ninhos de amastigotas em 15 campos visualizados.

Grupos	Nº de ninhos de amastigotas (Média)
INPP 60	2
INPPB 60	5

A comparação das imagens de microscopia confocal corroboram as observações acima apontadas.

Pela comparação dos animais não tratados (Figura 50) e tratados (Figura 51) com o benzonidazol na fase crônica da doença, podemos observar um aumento significativo do número de parasitos no segundo grupo, observando apenas a dispersão de antígenos no tecido, o que demonstra que o tratamento antiparasitário não foi efetivo.

Figura 50: Feto de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, Grupo INPP 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Seta indica a presença dos ninhos na imagem.

Figura 51: Feto de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol, Grupo INPPB 60. Visualizado por imunofluorescência em microscopia confocal no aumento de 88,2 X. Setas indicam a presença dos ninhos na imagem.

4.14. RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

4.14.1. BAÇO

Não foram visualizadas alterações histopatológicas para o baço analisado nos animais dos quatro diferentes grupos (NPI, NIPB, INPP 60 e INPPB 60), em relação aos seus controles, o que indica a não interferência do tratamento com o benzonidazol para as fêmeas infectadas pela via oral, pela cepa RC de *T. cruzi*.

Figura 52: Seção Histopatológica de baço de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol. Grupo NPIB. Hematoxilina e eosina (100x).

Figura 53: Seção Histopatológica de baço de fêmea de fase crônica prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo INPP 60. Hematoxilina e eosina (400x).

4.14.2. FÍGADO

Foi observado infiltrado inflamatório em fígado de todos os grupos (NPI, NIPB, INPP 60 e INPPB 60).

Figura 54: Seção Histopatológica de fígado de fêmea de fase aguda não prenhe infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, com infiltrado inflamatório. Grupo NPI. Hematoxilina e eosina (100x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório na imagem.

Figura 55: Fotomicrografias de fígado de fêmeas de fase aguda infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, com infiltrado inflamatório (A) Grupo NPI (B) Grupo NPIB. Hematoxilina e eosina (400x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório na imagem.

Figura 56: Fotomicrografias de fígado de fêmeas de fase crônica infectadas com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* com infiltrado inflamatório (A) Grupo INPP 60 (B) Grupo INPPB 60. Hematoxilina e eosina (400x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório na imagem.

4.14.3 CORAÇÃO

Apesar de não serem observadas alterações teciduais significantes, foi observado infiltrado inflamatório e pericardite em coração de todos os grupos utilizados neste experimento (NPI, NIPB, INPP 60 e INPPB 60).

Figura 57: Seção Histopatológica de coração de fêmea de fase aguda infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, tratadas com benzonidazol com infiltrado inflamatório Grupo NPIB. Hematoxilina e eosina (100x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório na imagem.

Figura 58: Fotomicrografias de coração de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* grupo INPP 60. (a) Corte com pericardite (b) Corte com infiltrado inflamatório. Hematoxilina e eosina (400x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório e pericardite na imagem.

Figura 59: Seção histopatológica de coração de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, tratada com benznidazol. grupo INPPB 60. (a) Corte com pericardite (b) Corte com infiltrado inflamatório. Hematoxilina e eosina (400x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório e pericardite na imagem.

Figura 60: Fotomicrografias de coração de fêmea de fase aguda infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo NPI. (A) Corte com pericardite (B) Corte com infiltrado inflamatório. Hematoxilina e eosina (400x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório e pericardite na imagem.

Figura 61: Fotomicrografias de coração de fêmea de fase aguda infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi* tratada com benzonidazol. Grupo NPIB. (A) Corte com infiltrado inflamatório. (B) Corte com pericardite. Hematoxilina e eosina (400x). Setas indicam a presença de infiltrado inflamatório e pericardite na imagem.

4.14.4. PLACENTA E FETO

Não foi observada nenhuma alteração histopatológica em Placenta e Feto dos dois grupos de fase crônica (INPP 60 e INPPB 60).

Figura 62: Seção Histopatológica de placenta de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo INPP 60. Hematoxilina e eosina (100x).

Figura 63: Fotomicrografias de placenta de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*. Grupo INPP 60. Hematoxilina e eosina (400x).

Figura 64: Fotomicrografias de seção histopatológica de feto de fêmea de fase crônica infectada com 2×10^5 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa RC de *Trypanosoma cruzi*, tratada com benzonidazol. Grupo INPPB 60. Hematoxilina e eosina (100x).

5. DISCUSSÃO

Adotada como um critério para o diagnóstico da Doença de Chagas a parasitemia sanguínea indica a fase aguda da infecção, visto que, na fase crônica, os parasitas circulantes do sangue periférico encontram-se em declínio, não sendo possível sua detecção pelo método direto (MONCAYO, 2003).

Neste estudo a técnica foi realizada, nos camundongos Balb/c infectados via oral com 2×10^5 formas por gotejamento de sangue, entre o 5º e 11º dia de infecção para os grupos de fase aguda (NPI e NPIB) e entre o 5º e 24º dia de infecção para os grupos de fase crônica (INPP 60 e INPPB 60).

A via oral foi abordada em virtude dos recentes episódios de infecção através do consumo de alimentos contaminados pelas diferentes formas do parasita (BARBOSA et al., 2012; MARTINS et al., 2010). O gotejamento sanguíneo foi escolhido em detrimento à gavagem, pois a infecção pela cavidade oral é mais susceptível do que pelas demais vias digestivas (CARDOSO et al., 2006).

Nos grupos de fase aguda a contagem parasitária foi necessária para verificar se a infecção havia ocorrido, antes do início do fornecimento de tratamento com o benzonidazol para as fêmeas. Por tanto somente três coletas de sangue caudal foram suficientes para a confirmação da infecção.

Entretanto nos grupos de fase crônica a coleta sanguínea caudal se prolongou ao 24º dia de infecção para se estabelecer o pico parasitêmico da infecção pela via oral da cepa em estudo, o qual foi evidenciado ao 14º dia de infecção, apresentando média de 424.494 parasitas/mL de sangue. A contagem parasitêmica estendida, também foi escolhida para acompanhar o curso da fase aguda da cepa, que se estende entre 27 e 40 dias após a inoculação do parasita. Pela infecção por via oral, o declínio parasitêmico iniciou-se a partir do 18º dia de exposição à cepa, corroborando os resultados obtidos por Albuquerque e Barreto, em 1970.

Utilizada nos laboratórios de pesquisa com umas das alternativas de diagnóstico para as técnicas parasitológicas tradicionais, a PCR em tempo real quantitativa (qPCR) foi uma das ferramentas de escolha para a monitorização da

carga parasitária tecidual. Dentre as vantagens pode-se ressaltar o baixo risco de contaminação, maior sensibilidade e por contrair dados da reação a cada novo ciclo de amplificação, o que permite o cálculo do produto por região da curva (SCHIJMAN et al., 2011).

No presente trabalho a técnica foi utilizada nos tecidos dos órgãos baço, fígado, coração, placenta e nos fetos, com o objetivo de detectar e verificar a carga parasitária nas fases aguda e crônica bem como na monitorização da eficácia do tratamento com benzonidazol em ambas as fases, se apresentando como uma forma de diagnóstico rápido, específico, sensível e reprodutível.

Para padronizar as amplificações foi utilizado DNA de *T. cruzi* de 1 a 10^6 cópias do genoma do parasita. E como controle interno para normalizar as quantidades de DNA das reações foi utilizado GAPDH de 1 a 10^5 cópias do genoma do camundongo. As condições do ensaio como temperatura, tempo de ciclagem e concentração dos reagentes e DNA foram otimizadas para se obter alta eficiência de amplificação.

Devido à recuperação de DNA amostral ter se apresentado variável foi essencial o uso do controle endógeno para normalizar a quantidade de tecido analisado, corrigir variações intra-amostrais e obter uma quantificação reprodutível. Essa reprodutibilidade foi demonstrada na tabela 10 através da quantificação de uma mesma amostra em triplicata, sendo visualizada para todos os órgãos estudados (KARA et al., 2003).

O desempenho global do ensaio foi mensurado através da estimativa da eficiência de amplificação, valor no qual o produto de PCR é gerado. Para melhorar a eficiência, o DNA amostral extraído foi diluído para a concentração 20ng/ μ L de DNA. Assim obtiveram-se índices de eficiência acima de 90% para as curvas padrões de *T. cruzi* e de GAPDH, como apresentado nas tabelas 8 e 9. Essa associação só foi possível, pois o normalizador interno, GAPDH, e *T. cruzi* tiveram eficiência de amplificação semelhantes (CUMMINGS e TARLETON, 2003; KARA et al., 2003).

Outro parâmetro importante adquirido, o valor de R^2 corresponde ao coeficiente de regressão e é obtido a partir da linha de regressão linear da curva

padrão. R^2 indica a precisão na distribuição dos pontos da curva. No presente trabalho obteve-se R^2 superior a 0,99 em ambas as curvas tabelas 8 e 9.

Através dos resultados obtidos pela qPCR optou-se por calcular tanto o número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH quanto o número de parasitas/ 30mg de tecido com o intuito de se comparar os dois distintos métodos matemáticos utilizados na verificação da carga parasitária tecidual.

Neste contexto, na quantificação do parasitismo do baço, para os quatro grupos estudados, empregando os dois métodos, não observamos diferenças pelo número de cópias. Porém, pelo número de parasitas em 30 mg de tecido a diferença foi evidente se compararmos o grupo de fase aguda não tratado (NPI) com o grupo de fase aguda que recebeu benzonidazol (NPIB), assim como na comparação do grupo de fase crônica não tratado (INPP 60) com o grupo de fase crônica que recebeu benzonidazol (INPPB 60). A queda no número de parasitas em ambos os grupos tratados (NPIB e INPPB 60) poder ser devido à eficácia do tratamento com o benzonidazol.

Nos grupos de fase aguda (NPI e NPIB) essa diferença parasitária, provocada pela medicação, foi confirmada pelos dois métodos, sendo mais expressiva através do número de cópias ($p = 0,0003$), se comparado ao número de parasitas ($p < 0,05$). Em contrapartida nos grupos de fase crônica a confirmação estatística não ocorreu, restringindo-se somente na confirmação visual pelos dados representados nas barras dos dois gráficos, sendo mais evidente pelo número de cópias.

Em relação ao parasitismo tecidual do fígado, nos quatro grupos não observamos diferenças estatísticas pelos dois métodos. Porém, na comparação individual dos grupos de fase aguda a diferença despontou em ambos os métodos, apresentando $p = 0,0005$, pelo número de cópias, e $p < 0,005$ pelo número de parasitas. Porém, não observamos ocorrência semelhante para os grupos de fase crônica.

No tocante a parasitemia tecidual cardíaca, para os quatro grupos confrontados entre si evidenciamos diferença estatística somente na contagem de parasitas ($p < 0,05$), sendo possível visualizar no gráfico esta diferença (Figura 19), principalmente nos grupos de fase aguda, onde os dados representados para o

grupo controle (NPI) se mostram muito superior àqueles do grupo tratado (NPIB). Isso se aflora na comparação individual da fase aguda pelos dois métodos, obtendo-se para p valores idênticos ($p < 0,05$). Todavia, na avaliação isolada dos grupos de fase crônica não observamos resultados semelhantes.

Após a avaliação dos três tecidos, baço, fígado e coração a hipótese levantada é que o tratamento com benzonidazol é mais eficaz na fase aguda da doença em contraste com a fase crônica (PINAZO et al., 2013). Assim entendemos que o número de parasitas/tecido e cópias de *T. cruzi*/GAPDH diminuiu nos grupos NPIB e INPPB 60, tratados, porém essa redução e a variação de dados, observada pelo desvio padrão dos diferentes grupos, não é matematicamente suficiente para que essa situação seja apontada pelos testes estatísticos. Pinazo e colaboradores (2010) disseram que em longo prazo, o tratamento com benzonidazol na fase crônica da infecção pode restringir a progressão da doença, além de aumentar a soro conversão negativa em pacientes que se encontram na fase indeterminada.

Segundo os pesquisados, tais reduções começaram a ser evidenciadas em pacientes chagásicos seis meses após o início do tratamento com benzonidazol. No presente trabalho esta diminuição começou a despontar em todos os órgãos dos animais de fase crônica que receberam tratamento. Porém, não foi observada diferença estatisticamente positiva para os grupos afins, pois a duração da administração do medicamento não foi extensa o suficiente para apresentar valores de p importantes. Entretanto foi possível, por meio da visualização dos gráficos, observarmos que a diminuição parasitária já havia se iniciado somente com 16 dias de tratamento.

Sendo assim, a hipótese aventada é que quanto mais extenso o fornecimento medicamentoso para os animais em fase crônica, possivelmente maiores seriam as diminuições parasitárias teciduais, podendo inclusive a longo prazo chegar a zerar a carga parasitária durante a fase crônica da doença de Chagas, como já ocorre em 90 a 100% das crianças recém-nascidas que recebem o tratamento logo que expostas ao parasita (CARDONI e ANTUNEZ, 2004).

Os resultados das análises teciduais da placenta apontaram diferença estatística apenas na confrontação pelo número de cópias dos dois grupos de fase

crônica (INPP 60 e INPPB 60), sendo maior o número de cópias no grupo que recebeu tratamento, INPPB 60, que no grupo controle que não o recebeu, INPP 60.

Semelhante resultado foi divisado nas quantificações teciduais realizadas para os fetos, onde o grupo que recebeu tratamento apresentou número superior de cópias de *T. cruzi*/GAPDH, em detrimento ao grupo que não recebeu.

Várias hipóteses podem ser aventadas na tentativa de se esclarecer a presença de amastigotas nos tecidos placentário e fetal, dentre elas a de que o benzonidazol pode diminuir a imunidade materna favorecendo assim uma maior passagem das formas tripomastigotas sanguíneas pela barreira placentária atingindo em seguida os tecidos fetais. Uma via plausível para esta interferência na imunidade materna pode ser pela formação do agente citotóxico e mutagênico, glioxal que na presença de oxigênio gera radicais livres intermediários e espécies reativas de oxigênio que podem interagir com os tecidos placentários facilitando a passagem do parasita (BARTEL et al., 2010; PÉREZ-MOLINA et al., 2009; RIGALLI et al., 2012).

Além disso, segundo Cardoni e Antunez (2004), durante a gestação ocorre uma supressão da resposta imunológica materna objetivando-se proteger os tecidos fetais de potenciais danos que podem vir a serem causados pela resposta materna a alo-antígenos fetais. Entretanto tais conhecimentos ainda não podem ser aplicados a respeito da queda imunológica materna aos patógenos circulantes pelo sangue materno (SANCHEZ et al., 2012).

Posteriormente comparamos as quantificações parasitárias dos diferentes órgãos pertencentes ao mesmo grupo de estudo. Nesta confrontação interna não foram evidenciadas diferenças estatísticas em nenhum dos quatro grupos propostos, na análise parasitária pelos dois métodos utilizados.

Em relação a todas as comparações realizadas no presente trabalho, utilizando a contagem parasitária pelo número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH e número de parasitas em 30mg de tecido, podemos observar que ambos os métodos são eficazes e podem ser reproduzidos.

Dos 15 confrontos executados houve concordância de resultados em ambos os métodos em 73,33%. Porém, quando verificamos a sensibilidade matemática, o

método da análise gráfica de parasitas por 30mg de tecido foi superior ao método de número de cópias de *T. cruzi*/GAPDH, exceto nos casos de placenta e feto, em que o método de cópias identificou resultados positivos enquanto que o método de número de parasitas não gerou tal desfecho matemático, somente no aspecto visual.

No tocante da análise de carga parasitária pela imunofluorescência em microscopia confocal foi possível visualizar ninhos de amastigotas nos tecidos estudados confirmando assim os dados previamente obtidos na qPCR.

Para o baço visualizou-se nos cortes de animais não tratados (NPI e INPP 60) maior número de ninhos amastigotas que em animais tratados (NPIB e INPPB 60), sendo que para os animais de fase crônica houve maior observação da presença dos ninhos de formas amastigotas que nos animais de fase aguda. O mesmo foi verificado tanto para os tecidos hepáticos quanto para os tecidos cardíacos confirmando os achados na qPCR para tais órgãos.

Assim demonstrou-se que na fase crônica ocorre predominância parasitária nos tecidos em detrimento a corrente sanguínea e que o tratamento com benzonidazol mesmo em curto período já foi eficaz na diminuição das formas do parasito.

Em relação às imagens de cortes placentários e fetais foi visualizado maior presença de ninhos amastigotas nos grupos tratados (NPIB e INPPB 60), quando confrontados com as imagens dos grupos não tratados (NPI e INPP 60), confirmando assim os resultados apresentados na qPCR para os dois tecidos, confirmando a hipótese de que o benzonidazol pode ter diminuído as barreiras imunológicas maternas, permitindo a passagem de parasitas ao feto.

Outro recurso empregado neste trabalho, com o intuito de figurar as alterações fisiológicas provenientes da doença e do tratamento foi a observação histopatológica dos cortes.

Nos tecidos baço, placenta e feto não foram observados quaisquer indícios de alterações histológicas, em todos os grupos, quando comparados a cortes de animais sadios. Entretanto nos cortes de fígado desses animais foram divisados inúmeros pontos com infiltrado inflamatório, indicando assim, que houve uma reação imunológica contra o patógeno. O mesmo ocorreu para os tecidos cardíacos em

todos os grupos, sendo possível perceber presença de infiltrado inflamatório bem como de pericardite evidenciando que houve também no coração uma reação imunológica.

Por conseguinte, a presença de *Trypanosoma cruzi* além de estar pautada na elevada carga parasitária também está relacionada com o desequilíbrio das respostas imunológicas que, quando exacerbadas na tentativa de proteger o organismo do hospedeiro infectado, podem prejudicá-lo, levando então a uma imunopatologia associada à doença (ROGGERO et al., 2002).

6. CONCLUSÕES

As técnicas empregadas para caracterização parasitária no presente trabalho foram sensíveis, consistentes, adequadas e sustentaram os resultados apresentados entre si no monitoramento da infecção.

A análise da carga parasitária demonstrou que para baço, fígado e coração o tratamento, tanto na fase aguda quanto na fase crônica, foi eficaz na diminuição de ninhos de amastigotas. Entretanto para placenta e feto o tratamento contribuiu para o aumento da intensidade de ninhos de amastigotas.

Deste modo, podemos sugerir, teoricamente, que o tratamento com benzonidazol pode ser indicado para minimizar a carga de parasitas ou até mesmo para sua completa erradicação em indivíduos em fase crônica, bem como, sugerimos que o medicamento deve ser ofertado por maior tempo aos indivíduos chagásicos tanto na fase aguda quanto na fase crônica, visto que apresenta melhores resultados, sem levarmos em conta os efeitos colaterais já demonstrados pelo medicamento e largamente apontados na literatura científica.

Entrementes dissuadimos o tratamento durante o período gestacional visto que, pode induzir a diminuição das barreiras imunológicas maternas e/ou facilitar a migração parasitária para os tecidos placentários e fetais.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ALBUQUERQUE, R.D. & BARRETTO, M.P. Estudos sobre reservatórios e vetores silvestres do *Trypanosoma cruzi* – XLIV – infecção natural da raposa-do-campo, *Dusicyon (Lycalopex) vetulus* (LUND, 1842) pelo 'T. cruzi'. **Rev. Inst. Med. Trop.** v.12, suppl. 6, p. 375-382, 1970.
 2. AOKI, V., SOUSA JR., J.X., FUKUMORI, L.M.I., PÉRIGO, A.M., FREITAS, E.L., OLIVEIRA, Z.N.P., Imunofluorescência direta e indireta. **An Bras Dermatol**, v. 85, n. 4, p. 490-500, 2010.
 3. AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B., RENIER, C.; WITTMERS, L.E.; FORNACIARI, G. J.; ALLISON, M. A 9,000- year record of Chagas disease. **PNAS**, v. 101, n. 7, p. 2034-2039, 2004.
 4. BADRA, E.S.; SALA, M.A.; LOPES, R.A.; PRADO, J.C.Jr.; ALBUQUERQUE, S. ZUCOLOTO, S.; CARRARO-ABRAHÃO, A.A. Histopathological changes in the placentas and fetuses of mice infected with *Trypanosoma cruzi* isolated from the *Myotis nigricans* bat, **J. Comp. Path.** 2008, v. 139, p. 108-112.
 5. BARBOSA, P. R. B. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. **Internacional Journal of Cardiology**, v. 112, p. 132-133, 2006.
 6. BARBOSA, R. L., DIAS, V.L., PEREIRA, K.S., SCHMIDT, F.L., FRANCO, R. M.B., GUARALDO, A.M.A., ALVES, D.P., PASSOS, L.A.C. Survival *in vitro* and virulence of *Trypanosoma cruzi* in açai pulp in experimental acute Chagas disease. **Journal of food protection**, v. 75, n. 3, p. 601-606, 2012.
 7. BARRETT, M. P., e CROFT, S. L., Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**; v. 104, p. 175–196, 2012.
 8. BARRY, M. A.; BEZEK, S.; SERPA, J.A.; HOTEZ, P.J.; WOC-COLBURN, L. Neglected Infections of Poverty in Texas and the Rest of the United States: Management and Treatment Options, **Nature publishing group**, v. 92, n. 2, August, 2012.
 9. BARTEL, L. C., DE MECCA, M. M., DE CASTRO, C. R., BIETTO, F. M., CASTRO, J. A. Metabolization of nifurtimox and benznidazole in cellular
-

- fractions of rat mammary tissue. **Human & Experimental Toxicology**, v. 29, n. 10, p. 813–822, 2010.
10. BASTOS, C.J.C.; ARAS, R.; MOTA, G.; REIS, F.; DIAS, J.P.; JESUS, R.S.; FREIRE, M.S.; ARAÚJO, E.G.; PRAZERES, J.; GRASSI, M.F.R. Clinical
 11. BOSCARDIN, S.B.; TORRECILHAS, A.C.; MANARIN, R.; REVELLI, S.; REY, E.G.; TONELLI, R.R.; SILBER, A.A. Chagas' disease: na update on immune mechanisms and therapeutic strategies. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, England, 2010.
 12. BOUFKER, H.I., ALEXANDRE, H., CARLIER, Y., TRUYENS, C., Infertility in murine acute *Trypanosoma cruzi* infection is associated with inhibition of pre-implantation embryo development. **The American Journal of Pathology**, v. 169, n. 5, 2006.
 13. BRASIL. Ministério da Saúde. Consenso Brasileiro em Doença de Chagas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38 (Supl. III), p.12-14, 2005.
 14. BRASIL. Ministério da Saúde. **Fundação Oswaldo Cruz – FIOCRUZ**. Disponível em <http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?sid=1>, diversos autores. Acessado em 17/03/2014.
 15. BRASIL. Ministério da Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da doença de chagas aguda transmitida por alimentos. **Organização Pan Americana da Saúde**, Rio de Janeiro, 2009.
 16. BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med.Trop.** São Paulo v. 4, p.389–396, 1962.
 17. BURGOS, V.O. Análise bioquímica e histopatológica do fígado e pâncreas em modelos experimentais de camundongos Balb/c machos e Fêmeas infectados pela cepa RAL e RC de *Trypanosoma cruzi*. **Tese. Universidade Estadual de Campinas**. Campinas, 2007.
 18. BUSTAMANTE, J.M., BIXBY, L.M., TARLETON, R.L. Drug-induced cure drives conversion to a stable and protective CD8⁺ T central memory response in chronic Chagas disease. **Nat Med**, v. 14, n. 5, p. 542-550, 2008.
 19. CARDONI AND ANTÚNEZ. Outcome of *Trypanosoma cruzi* infection in pregnant Balb/c mice. **Annals of Tropical Medicine e Parasitology**, v. 98, n. 8, p. 883-887, 2004.

20. CARDOSO, A.V.N.; LESCANO, S.A.Z.; NETO, V.A.; SANTOS, S.V. Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice. **Rev. Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 48, n. 5, p. 287-289, sept-out, 2006.
21. CARTER Y.L.; JULIANO, J.J.; MONTGOMERY, S.P.; QVARNSTROM, Y.; Acute Chagas disease in a returning traveler. **American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, October 22, 2012.
22. CARVALHO, E.O.C.; ROSA, J.A.; CARVALHO, A.A.; CHAVES, H.C.O.; SOUZA, E.A.; OSTERMAYER, A.L.; CAMARGO, L.M.A. Estudo da ocorrência da doença de Chagas em Monte Negro, Estado de Rondonia, Amazonia Brasileira. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, n. 6, p. 703-707, nov-dez, 2011.
23. CASTRO, J. A., DE MECCA, M. M., BARTEL, L. C. Toxic Side Effects of Drugs Used to Treat Chagas' Disease (American Trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, v. 25, p. 471-479, 2006.
24. CENCIG, S.; COLTEL, N.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y. Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome. **Neglected tropical diseases**, v. 6, n. 6, p. 1216, 2011.
25. CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC, **Congenital Transmission of Chagas Disease — Virginia, 2010**. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, v. 61, n. 26, July 6, 2012.
26. CHAGAS, Carlos. **Nova Tripanozomíase Humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem**. In: *Carlos Chagas: Coletânea de Trabalhos Científicos*. Editora Universidade de Brasília, p. 9-80; Publicado originalmente em Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. I Fasc. II em 1909, 1981.
27. CHIPPAUX, J.P.; CLAVIJO, A.N.S.; SANTALLA, J.A.; POSTIGO, J.R.; SCHNEIDER, D.; BRUTUS, L. Antibody drop in newborns congenitally infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benznidazole. **Tropical Medicine and International Health**, v. 15, n. 1, p. 87–93, January, 2010.
28. CORTEZ, C.; MARTINS, R.M.; ALVES, R.M.; SILVA, R.C.; BILCHES, L.C.; MACEDO, S.; ATAYDE, V.D.; KAWASHITA, S.Y.; BRIONES, M.R.S.; YOSHIDA, N. Differential Infectivity by the Oral Route of *Trypanosoma cruzi*

- Lineages Derived from Y Strain. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. 1804, October, 2012.
29. COURA, J. R. **Chagas disease: what is known and what is needed – A background article**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, v. 102, suppl. I, p. 113-122, 2007.
30. COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Doença de Chagas. O que é conhecido e o que deve ser melhorado: uma visão sistêmica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 45, n. 3, p. 286-296, maio-jun, 2012.
31. CUCUNUBÁ, Z.M.; FLÓREZ, A.C.; CÁRDENAS, A.; PAVÍA, P.; MONTILLA, M.; ALDANA, R.; VILLAMIZAR, K.; RÍOS, L.C.; NICHOLLS, R.S.; PUERTA, C.J.; Prevalence and Risk Factors for Chagas Disease in Pregnant Women in Casanare, Colombia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**, n. 87 v.5, p. 837–842, 2012.
32. CUMMINGS, K.L., TARLETON, R.L., Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53-59, 2003.
33. CUMMINGS, K.L.; TARLETON, R.L. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. **Molecular e Biochemical Parasitology**, v. 129, p. 53-59, 2003.
34. CUTRULLIS, R.A., MOSCATELLI, G.F., MORONI, S., VOLTA, B.J., CARDONI, R.L., ALTCHER, J.M., CORRAL, R.S., FREILIJ, H.L., PETRAY, P.B. Benznidazole therapy modulates interferon- γ and M2 muscarinic receptor autoantibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected children. **Early Chagas disease treatment and immune response. Plos One**, v. 6, n. 10, 2011.
35. DIAS, J. C. P., NETO, V. A., LUNA, E. J. A. **Mecanismos alternativos de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil e sugestões para sua prevenção**. *Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 44, n. 3, p. 375-379, mai-jun, 2011.
36. DIAS, J.P. ; BASTOS, C. ; ARAÚJO, E. ; MASCARENHAS, A.V. ; NETTO, E.M. ; GRASSI, F. ; SILVA, M. ; TATTO, E. ; MENDONÇA, J. ; ARAÚJO, R.F. ; SHIKANAI-YASUDA, M.A. ; ARAS, R. ; Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. **Rev. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 3, p. 296-300, mai-jun, 2008.
-

37. DÍAZ-CHIGUER D. L., **In vitro and in vivo trypanocidal activity of some benzimidazole derivatives against two strains of *Trypanosoma cruzi*.** *Acta Tropica* v. 122 p. 108– 112, 2012.
38. DOST, K.C; ALBUQUERQUE, S.; HEMLEBEN, V.; ENGELS, W.; PRADO, J.C.Jr. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitol.Res.** v.88, p.609-616, 2002.
39. FERNANDES, R. M. **A Evolução no conhecimento e o controle da doença de chagas no Brasil: um estudo de caso sobre a interação entre a ciência, a tecnologia, a saúde e a economia.** 2005 134f. *Dissertação (Mestrado em Economia)*- Centro de Desenvolvimento e Planejamento Regional da Faculdade de ciências Econômicas, UFMG, Belo Horizonte, 2005.
40. FREITAS, J.M., AUGUSTO-PINTO, L., PIMENTA, J.R., BASTOS-RODRIGUES, L., GONCALVES, V.F., TEIXEIRA, S.M., CHIARI, E., JUNQUEIRA, A.C., FERNANDES, O., MACEDO, A.M., MACHADO, C.R., PENA, S.D.J. Ancestral genomes, Sex and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog**, v. 2, p. 226-235, 2006.
41. HASSLOCHER-MORENO, A.M.; BRASIL, P.E.A.A.; SOUSA, A.S.; XAVIER, S.S.; CHAMBELA, M.C.; SILVA, G.M.S. Safety of benzimidazole use in the treatment of chronic Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. 67, p. 1261-1266, 2012.
42. HUEB, M. F. D. Doença de chagas: indicadores cognitivos, de transtorno orgânico cerebral, de uso de álcool e qualidade de vida. 2006 153f. **Tese (Doutorado em Saúde Mental)** – Departamento de Neurologia Psiquiatria e Psicologia médica, FMRP-USP, Ribeirão Preto, 2006.
- I., WIETZERBIN J., SERRA E., REVELLI S. & BOTTASSO O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin.Exp.Immunol.** **128**, 421-428, 2002.
43. KINOSHITA-YANAGA A.T., TOLEDO, M.J.O.; ARAÚJO, S.M.; VIER, B.P.; GOMES, M.L. Infecção acidental pelo *Trypanosoma cruzi* acompanhada pela reação em cadeia da polimerase: relato de caso. **Rev. Inst. Med. trop. S. Paulo**, V. 51, n. 5 p. 295-298, São Paulo Sept./Oct. 2009.
-

44. KROPF, S. P. Doença de Chagas, doença do Brasil: ciência, saúde e nação (1909-1962). 546f. **Tese (Doutorado em História)** – Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2006.
45. KUN H.; MOORE, A.; MASCOLA, L.; STEURER, F.; LAWRENCE, G.; KUBAK, B.; RADHAKRISNA, S.; LEIBY, D.; HERRON, R.; MONE, T.; HUNTER, R.; KUEHNERT, M.; Transmission of *Trypanosoma cruzi* by heart transplantation. **Clinical Infectious Diseases**. V. 48, p. 1534–40, 2009.
46. LANA, M. & TAFURI, W. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas In: NEVES, D. P. (Org), **Parasitologia Humana**. Editora Atheneu, São Paulo SP, 10ª Edição. p.85-108, 2000.
47. MACKAY I.M., Real-time PCR in the microbiology laboratory. **Clin.Microbiol.Infect**. v. 10, p. 190-212, 2004.
48. MARTINS, L.P.A., CASTANHO, R.E.P., NOGUEIRA, A.B., SILVA, O.T., GUSMÃO, A.S., Indidence of *Trypanosoma cruzi* transmission through breastfeeding during acute experimental Chagas disease. **Braz J Infect Dis**, v. 15, n. 2, p. 116-118, 2011.
49. MONCAYO, A., Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.
50. MORTARA, R.A., SILVA, S., PATRÍCIO, F.R., HIGUCHI, M.L., LOPES, E.R., GABBAI, A.A., CARNEVALE, P., ROCHA, A., FERREIRA, M.S., SOUZA, M.M, FRANCO, M.F., TURCATO JR., G., NETO, B.H.F. Imaging *Trypanosoma cruzi* within tissues from chagasic patients using confocal microscopy with monoclonal antibodies. **Parasitol Res**, v. 85, p. 800-808, 1999.
51. MURCIA, L., CARRILERO, B., VIÑAS, P. A., SEGOVIA, M. Nifurtimox chemotherapy: colateral effects in treated *Trypanosoma cruzi* infected patients.**Rev Esp Quimioter**, v. 25, n. 1, p. 74-75, 2012.
52. NÓBREGA, A.A.; GARCIA, M.H.; TATTO, E.; OBARA, M.T.; COSTA, E.; SOBEL, J.; ARAUJO, W.N.; Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. **Emerging Infectious diseases**. v. 15, n. 4, april, 2009.

53. OLIVEIRA, M. F.; NAGÃO-DIAS, A. T.; PONTES, V. M. O.; JÚNIOR, A. S. S.; COELHO, H. L. L.; COELHO, I. C. B. Tratamento etiológico da doença de Chagas no Brasil. **Revista de Patologia Tropical, Brasil**, v. 37; p. 209-228, 2008.
- outcomes of thirteen patients with acute Chagas disease acquired through oral transmission from two urban outbreaks in northeastern Brazil. *Neglected Tropical Diseases*, v. 4, n. 6, p. 711, june, 2010.
54. PÉREZ-MOLINA, J. A., PÉREZ-AYALA, A., MORENO, S., FERNÁNDEZ-GONZÁLEZ, M. C., ZAMORA, J., LÓPEZ-VELEZ, R., Use of benznidazole to treat chronic Chagas' disease: a systematic review with a meta-analysis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 64, p. 1139–1147, 2009.
55. PÉREZ-MOLINA, J.A.; NORMAN, F.; LÓPEZ-VÉLEZ, R.; Chagas Disease in Non-Endemic Countries: Epidemiology, **Clinical Presentation and Treatment**. *Curr Infect Dis Rep*, v. 14, p.263–274, 2012.
56. PINAZO, M. J., GUERRERO, L., POSADA, E., RODRÍGUEZ, E., SOY, D., GASCON, J., Benznidazole-Related Adverse Drug Reactions and Their Relationship to Serum Drug Concentrations in Patients with Chronic Chagas Disease **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.57, n. 1, p. 390–395, January, 2013.
57. PINAZO, M. J., MUÑOZ, J., POSADA, E., LÓPEZ-CHEJADE, P., GÁLLEGO, M., AYALA, E., DEL CACHO, E., SOY, D., GASCON, J., Tolerance of Benznidazole in Treatment of Chagas' Disease in Adults. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, p. 4896–489, NOV, 2010.
58. PINTO, A. Y. N., VALENTE, S. A. S., VALENTE, V. C. Emerging acute Chagas disease in Amazonian Brazil: case reports with serious cardiac involvement. **The Brazilian Journal of infections diseases**, Belém, v. 8 n. 8 p. 454-460, 2004.
59. PIRON, M.; FISA, R.; CASAMITJANA, N.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; PUIG, L.; VERGÉS, M.; GASCÓN, J.; PRAT, J.G.; PORTÚS, M.; SAULEDA, S. Development of real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. **Acta tropica**, v. 103, p. 195-200, 2007.
60. RAGHUPATHY, R.; AL-MUTAWA, E.; AL-AZEMI, M.; MAKHSEED, M.; AZIZIEH, F.; SZEKERES-BARTHO, J. Progesterone-induced blocking factor (PIBF) modulates cytokine production by lymphocytes from women
-

- with recurrent miscarriage or preterm delivery. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 80, p. 91–99, 2009.
61. RAMÍREZ, J.D.; MONTILLA, M.; CUCUNUBÁ, Z.M.; FLORÉZ, A.C.; ZAMBRANO, P.; GUHL, F. Molecular Epidemiology of Human Oral Chagas Disease Outbreaks in Colombia. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 2, p. 2041, February, 2013.
62. RASSI, A.JR.; RASSI, A.; REZENDE, J.M.; American Trypanosomiasis (Chagas Disease), **Infect Dis Clin N Am**, v.26, p. 275–291, Goiânia, 2012.
63. RIGALLI, J. P., PERDOMO, V. G., LUQUITA, M. G., VILLANUEVA, S. S. M., ARIAS, A., THEILE, D., WEISS, J., MOTTINO, A. D., RUIZ, M. L., CATANIA, V. A. Regulation of Biotransformation Systems and ABC Transporters by Benznidazole in HepG2 Cells: Involvement of Pregnane X-Receptor. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p. 1951, December, 2012.
64. RÍOS, J.F.; ARBOLEDA, M.; MONTOYA, A.N.; ALARCÓN, E.P.; PARRAHENAO, G.J.; Probable brote de transmission oral de enfermedad de Chagas en Turbo, Antioquia. **Biomédica**, v. 31, n. 1, p. 85-95, 2011.
65. RIVERA, M.T.; ARAUJO, S.M.; LUCAS R, DEMAN J, TRUYENS C, DEFRESNE MP, DE BAETSELIER P, CARLIER Y. High tumor necrosis fator alfha (TNF- α) production in *Trypanosoma cruzi* – Infected pregnant mice and increased TNF- α gene transcription in their offspring. **American Society for Microbiology**, Maringá, v. 63, n. 2, p. 591-595, 1995.
66. ROGGERO E., PEREZ A., TAMAE-KAKAZU M., PIAZZON I., NEPOMNASCHY
67. SANCHEZ, L.V.; RAMÍREZ, J.D. Congenital and oral transmission of American trypanosomiasis: an overview of physiopathogenic aspects. **Parasitology**, p. 113, January, 2012.
68. SCHIJMAN, A.G.; BISIO, M.; ORELLANA, L.; SUED, M.; DUFFY, T.; JARAMILLO, A.M.M.; CURA, C.; AUTER, F.; VERON, V.; QVARNSTROM, Y.; DEBORGGRAEVE, S.; HIJAR, G.; ZULANTAY, I.; LUCERO, R.H.; VELAZQUEZ, E.; TELLEZ, T.; LEON, Z.S.; GALVÃO, L.; NOLDER, D.; RUMI, M.M.; LEVI, J.E.; RAMIREZ, J.D.; ZORRILLA, P.; FLORES, M.; JERCIC, M.I.; CRISANTE, G.; AÑEZ, N.; CASTRO, A.M.; GONZALEZ, C.I.; VIANA, K.A.; YACHELINI, P.; TORRICO, F.; ROBELLO, C.; DIOSQUE, P.;
-

- CHAVEZ, O.T.; AZNAR, C.; RUSSOMANDO, G.; BÜSCHER, P.; ASSAL, A.; GUHL, F.; ESTANI, S.S.; DASILVA, A.; BRITTO, C.; LUQUETTI, A.; LADZINS, J. International study to evaluate PCR methods for detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood samples from Chagas disease patients. **Neglected tropical diseases**, v. 5, n. 1, p. 931, 2011.
69. SHIKANAI-YASUDA, M. A. & CARVALHO, N. B., Oral Transmission of Chagas Disease. **Emerging Infections**, v. 54, p. 845- 852, March, 2012.
70. SILVA, M. A., NAI, G.A., ROSA, J.A. Caracterização biológica e Molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica, forma cardíaca da doença de Chagas. **Rev. De Patologia Tropical**, São Paulo, v. 35, n.3, p. 213-226, set-dez, 2006.
71. SILVA, R. M. Preclinical Monitoring of Drug Association in Experimental Chemotherapy of Chagas' Disease by a New HPLC-UV Method. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 56, p. 3344–3348, June, 2012.
72. SILVEIRA A.C.; DIAS, J.C.P.; O Controle da transmissão vetorial. **História sobre a Doença de Chagas no Brasil** v. 44 Suplemento II, 2011.
73. TARLETON, R. L. & CURRAN, J. W., Is Chagas Disease Really the “New HIV/AIDS of the Americas”? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, October, v. 6 n. 10 e1861, 2012.
74. TECHNICAL MANUAL of kit ReliaPrep™ gDNA Tissue Miniprep System by **Promega Corporation**, outubro de 2012.
75. TORRICO F.; ALONSO-VEGA, C.; SUAREZ, E.; RODRIGUEZ, P.; TORRICO, M.C.; DRAMAIX, M.; TRUYENS, C.; CARLIER, Y.; Maternal *Trypanosoma cruzi* infection, pregnancy outcome, morbidity, and mortality of congenitally infected and non-infected newborns in Bolivia. **The American Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V. 70 n. 2, p. 201- 209, 2004.
76. VINHAES, M. C., DIAS, J. C. P. Doença de Chagas no Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 16, n. 2, p. 7-12, 2000.
77. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Consultation on International Biological reference Preparations for Chagas Diagnostic Tests**. Geneva, 2007.

-
78. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Control of Chagas Disease**. Geneva, *Technical Report Series*, n. 905, 96 p., 2002.
79. WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Weekly epidemiological record Relevé** Geneva, 2012.
80. YOSHIDA, N., TYLER, K.M., LLEWELLYN, M.S., Invasion mechanisms among emerging food-borne protozoan parasites. **Trends en Parasitology**, v. 27, n. 10, 2011.
-