JÚLIO CÉSAR RENTE FERREIRA FILHO

# Monitoramento da carga parasitária por técnica de amplificação quantitativa em sangue e tecidos de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com benznidazol

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Saúde Internacional da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Área de Concentração: Medicina Tropical e Saúde Internacional

Orientadora: Profa. Dra. Thelma Suely Okay

São Paulo
2016

Ficha catalográfica
Preparada pela Biblioteca do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo
© Reprodução autorizada pelo autor

Ferreira Filho, Júlio César Rente

Monitoramento da carga parasitária por técnica de amplificação quantitativa em sangue e tecidos de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com benznidazol/ Júlio César Rente Ferreira Filho. – São Paulo, 2016.

Tese (Doutorado) – Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Doenças Tropicais e Saúde Internacional

Orientadora: Thelma Suely Okay

Descritores: 1. DOENÇA DE CHAGAS. 2. REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE. 3. PARASITISMO. 4. TECIDOS (ANATOMIA). 5. MEDICAMENTO

**USP/IMTSP/BIB-17/2016.**

*Com muito amor e carinho, dedico este trabalho à minha* ***família,***

*sobretudo à minha* ***mãe Lúcia,*** *meu* ***pai Júlio*** *e*

*minha* ***esposa Maria Christina****.*

**AGRADECIMENTOS:**

À minha irmã Annete, cunhado Rodrigo e sobrinho Rodriguinho, por todo amor e alegria;

Aos meus sogros Maria Cecília e Carlos Alberto, e cunhados Maria Cláudia, Caio e Maria Carolina, por terem me recebido de braços abertos com tanto carinho;

À Profa. Dra. Thelma Suely Okay, por ter me orientado com tanto critério e dedicação, o que me possibilitou a aprender e realizar um trabalho com alto padrão de qualidade;

À pesquisadora Dra. Lucia Maria Almeida Braz, minha co-orientadora, que acompanhou a maior parte das etapas deste trabalho, pela dedicação ao trabalho e suporte científico;

Ao Prof. Dr. Antônio Walter Ferreira e à pesquisadora Dra. Kelly Aparecida Kanunfre, por terem me introduzido no Instituto de Medicina Tropical da USP-SP, e pelo apoio científico durante a elaboração da tese;

Ao Prof. João Aristeu da Rosa, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas da UNESP de Araraquara-SP, grande educador e orientador do meu mestrado, por ter me apoiado durante a transição do mestrado para o doutorado;

Aos meus colegas de laboratório Jonatas Cristian Rodrigues, Lidia Yamamoto, Lília Spaleta Targa, Leandro Emidio Teixeira, Marcos Luiz Alves Andrino, Paulo Tadashi Shimokawa e Wilson Domingues, pelo bom convívio ao longo destes anos e pelos trabalhos que realizamos juntos;

A todos os professores, pesquisadores e técnicos do Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia do Instituto de Medicina Tropial da USP-SP, em especial a especialista Me. Edite Hatsumi Yamashiro Kanashiro e à pesquisadora Dra. Guita Rubinsky Elefant, pela amizade e pelo suporte científico;

À pesquisadora Dra. Gilda Maria Barbaro del Negro por nos proporcionar o Laboratório de Micologia do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP, e por ter cedido reagentes para as reações de qPCR;

À pesquisadora Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva e à técnica Maria Cristina Conceição Melo, do Laboratório de Imunopatologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP, pela colaboração durante as reações de imunoistoquímica;

Ao pesquisador Dr. Andrés Jimenez Galisteo Jr., por possibilitar que as reações de qPCR pudessem ser realizadas no laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP e pela participação na minha banca examinadora no exame de qualificação;

À Me. Natália Souza de Godoy pela manutenção da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*;

Ao Prof. Dr. Ângelo Portela Lindoso e Dra. Marcela Satow pelas amostras de DNA fornecidas para os testes de especificidade da qPCR;

À LAFEPE (Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco), pelos comprimidos de benznidazol fornecidos para este projeto;

À Seção de Pós-Graduação do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP, especialmente à secretaria Eliane Fernandes, pelo suporte ao longo do meu doutorado;

A todos os funcionários da biblioteca, biotério, limpeza, secretaria e segurança do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP, por todo suporte necessário para realização deste trabalho.

**RESUMO**

Ferreira Filho JCR. Monitoramento da carga parasitária por técnica de amplificação quantitativa em sangue e tecidos de camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* e tratados com benznidazol [tese]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

O tratamento da doença de Chagas é recomendado em pacientes na fase crônica indeterminada com a finalidade de reduzir a carga parasitária, o desenvolvimento de manifestações clínicas tais como as cardiomiopatias e episódios de reativação. Os métodos sorológicos constituem o padrão ouro para a definição de cura pós tratamento, porém não avaliam a carga parasitária tecidual, podendo demorar muitos anos até a soronegativação, enquanto os métodos parasitológicos apresentam baixa sensibilidade na fase crônica. No presente estudo a hemocultura, microscopia ótica, PCR em tempo real (qPCR) e imunoistoquímica foram usados para monitorar a carga parasitária em sangue e órgãos de camundongos Swiss infectados com $2x10^3$ formas da cepa Y de *T. cruzi*. Foram analisados animais não tratados (NT), tratados somente na fase aguda (TA), somente na fase crônica (TC) e em ambas as fases da infecção (TAC). O tratamento foi realizado com 100 mg/Kg/dia de benznidazol durante 20 dias consecutivos. Amostras foram coletadas no 13º dpi, 26º dpi e 61º dpi (pico da fase aguda, final da fase aguda e fase crônica). Na fase crônica da infecção a microscopia ótica e a hemocultura encontraram 0 e 25% de amostras positivas, respectivamente, e com a qPCR as cargas parasitárias de todas amostras foram quantificadas ao longo do experimento, independentemente do grupo. No 13º dpi, os animais NT apresentaram 16.630,4 enquanto os TA 6.153,6 parasitos/ml de sangue ($p<0,05$). Os animais TAC foram os que tiveram a maior redução da carga parasitária em sangue e órgãos, muito embora também tenha havido redução nos animais TA (cérebro e coração) e TC (cérebro, coração, músculo e rim) em relação aos NT. Da fase aguda para a crônica houve redução da carga parasitária tanto em sangue quanto em órgãos (mais acentuada). Nos animais NT no 61º dpi, o sangue apresentou carga parasitária comparável a do coração, tecido adiposo, pulmão, intestino, baço e fígado, enquanto nos animais TAC o sangue foi o material biológico com a maior carga parasitária, confirmando que a parasitemia pode e deve ser utilizada para o diagnóstico e monitoramento da infecção por *T. cruzi* no organismo, em todas as fases da infecção. Ademais, o tecido adiposo atuaria como reservatório de *T. cruzi* no organismo, uma vez que a carga parasitária sofreu menor redução neste tecido após tratamento. A técnica de imunoistoquímica, realizada em amostras de tecido adiposo e cardíaco, confirmou os resultados da qPCR, fato importante especialmente no 61º dpi, quando as cargas parasitárias foram muito baixas. Portanto, o tratamento realizado em ambas as fases da infecção chagásica seria o mais eficaz para alcançar a redução da carga parasitária de *T. cruzi* no organismo, em relação ao tratamento realizado apenas uma vez. A qPCR, técnica extremamente sensível, poderia ser empregada para o monitoramento da parasitemia em pacientes tratados na fase crônica indeterminada, detectando falhas terapêuticas ou confirmando a cura etiológica.

Descritores: Doença de Chagas. Reação em cadeia da polimerase. Tecidos. Parasitismo. Medicamento.

**ABSTRACT**

Ferreira Filho JCR. Monitoring of parasite load by quantitative amplification technique in blood and tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with benznidazole [thesis]. São Paulo: Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo; 2016.

The treatment of Chagas disease has been recommended in patients in the chronic indeterminate phase to reduce the parasite load, the development of clinical manifestations such as cardiomyopathies and episodes of reactivation. Serological methods are the gold standard for the definition of cure after treatment, but they do not evaluate the parasite load in tissues, and may take many years until reversion, while parasitological methods have low sensitivity in the chronic phase. In the present study, blood culture, optical microscopy, real-time PCR (qPCR) and immunohistochemistry were used to monitor the parasite load in blood and organs of Swiss mice infected with $2x10^3$ forms of the *T. cruzi* Y strain. Untreated (NT) animals, treated only in the acute phase (TA), only in the chronic phase (TC) and in both phases of the infection (TAC) were analyzed. The treatment was performed with 100 mg/kg/day of benznidazole for 20 consecutive days. Samples were collected at the $13^{th}$ dpi, $26^{th}$ dpi and $61^{st}$ dpi (peak of acute phase, end of acute phase and chronic phase). In the chronic phase of the infection, optical microscopy and blood culture found 0 and 25% of positive samples, respectively, and with qPCR the parasite load levels of all samples were quantified throughout the experiment, regardless of the group. At the $13^{th}$ dpi, the NT animals presented 16,630.4 whereas the TA animals had 6,153.6 parasites/ml ($p<0.05$). TAC animals were the ones that had the greatest reduction of the parasite load in blood and organs, although there was also reduction in the TA (brain and heart) and TC (brain, heart, muscle and kidney) animals in relation to NT. From the acute phase to the chronic one there was reduction of the parasite load in both, blood and organs (more pronounced). In NT animals at the 61º dpi, blood samples presented parasite load levels comparable to that of the heart, adipose tissue, lung, intestine, spleen and liver, while in the TAC animals blood was the biological sample with the highest parasite load, confirming that parasitemia can and should be used for the diagnosis and monitoring of *T. cruzi* infection in the body at all stages of infection. In addition, the adipose tissue would act as reservoir of *T. cruzi* in the organism, since the parasite load suffered a smaller reduction in this tissue after treatment. The immunohistochemical technique, performed on adipose and cardiac tissues, confirmed the results of qPCR, an important fact especially in the 61º dpi, when parasite load levels were very low. Therefore, the treatment performed in both phases of the chagasic infection would be the most effective to achieve the reduction of parasite burden of *T. cruzi* in the organism, in comparison with the treatment performed only once. The qPCR, an extremely sensitive and timely technique, could be used to monitoring parasitemia in patients treated in the indeterminate chronic phase, detecting therapeutic failures or confirming the etiological cure.

Keywords: Chagas disease. Polymerase chain reaction. Tissues. Parasitism. Drug.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

**Figura 1** - Fluxograma dos testes diagnósticos para a doença de Chagas na fase crônica, segundo o II Consenso Brasileiro de doença de Chagas.....7

**Figura 2** - Real Time PCR (qPCR) com os primers 32f e 148r do kDNA. **A)** Curva padrão com sete diluições de DNA de *T. cruzi*, em triplicata, correspondendo a 200 parasitos, 20, 2, $2x10^{-1}$, $2x10^{-2}$, $2x10^{-3}$ e $2x10^{-4}$ de parasito (Ct = 37,22). **B)** Curva de *melting* das amostras da curva padrão, com Tm de 78,14ºC. **C)** Pontos da curva padrão destacados em vermelho, mostrando reação com eficiência de 90,25% e *slope* de -3,58.....32

**Figura 3** - Fluxograma dos procedimentos experimentais. As caixas em marrom indicam as etapas relacionadas à imunoistoquímica, azul claro a PCR em Tempo Real e azul escuro os exames parasitológicos convencionais.....37

**Figura 4** - Valores mínimo, máximo e a mediana da **parasitemia** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ml de sangue. NT - animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística de $p < 0,05$ com NT.....43

**Figura 5** - Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **tecido adiposo** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50 ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0.05$; **, ##, σσ $p < 0.01$; ***, ###, σσσ $p<0.001$.....50

**Figura 6** - Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **baço** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0.05$; **, ##, σσ $p < 0.01$; ***, ###, σσσ $p < 0.001$.....50

**Figura 7** - Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **cérebro** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0.05$; **, ##, σσ $p < 0.01$; ***, ###, σσσ $p < 0.001$.....51

**Figura 8 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **coração** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ p < 0.05; **, ##, σσ p < 0.01; ***, ###, σσσ p < 0.001.....51

**Figura 9 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **fígado** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ p < 0.05; **, ##, σσ p < 0.01; ***, ###, σσσ p < 0.001.....52

**Figura 10 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **intestino grosso** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ p < 0.05; **, ##, σσ p < 0.01; ***, ###, σσσ p < 0.001.....52

**Figura 11 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **músculo esquelético** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ p < 0.05; **, ##, σσ p < 0.01; ***, ###, σσσ p < 0.001.....53

**Figura 12 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **pulmão** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ p < 0.05; **, ##, σσ p < 0.01; ***, ###, σσσ p < 0.001.....53

**Figura 13 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **rim** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/50ng de DNA. NT – animais não tratados; TA – tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC – tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ p < 0.05; **, ##, σσ p < 0.01; ***, ###, σσσ p < 0.001.....54

**Figura 14** - Comparação das medianas de carga parasitária encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito **animais NT no 13º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0,001.....56

**Figura 15** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TA no 13º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0,001.....56

**Figura 16** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **NT no 26º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0,001.....58

**Figura 17** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TA no 26º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0,001.....59

**Figura 18** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **NT no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0,001.....61

**Figura 19** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TA no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * p < 0.05; ** p < 0.01; *** p < 0,001.....61

**Figura 20 -** Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TC no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$.....62

**Figura 21 -** Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TCA no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0,001$.....62

**Figura 22 -** Reação imunoistoquímica em tecido cardíaco de animal não tratado, coletado no 13º dia após a infecção experimental. As setas indicam a marcação de um ninho de amastigotas e de algumas formas isoladas de *T. cruzi*. Microscopia ótica em aumento de 40 x .....66

**Figura 23 -** Demonstração da marcação da área ocupada pelo *T. cruzi*, e área total de um campo de corte histológico de tecido cardíaco, observado por microscopia ótica em aumento de 40 x. Marcação realizada por imunoistoquímica.....66

**Figura 24 -** Gráfico com a mediana dos valores da área de *T. cruzi* (%) ocupada em **tecido adiposo**, das oito amostras coletadas no 13º, 26 e 61º dpi. Os círculos representam os animais não tratados, quadrados os tratados na fase aguda, triângulos tratados na fase crônica e losangos os tratados em ambas as fases da infecção.....69

**Figura 25 -** Gráfico com a mediana dos valores da área de *T. cruzi* (%) ocupada em **tecido cardíaco**, das oito amostras coletadas no 13º, 26 e 61º dpi. Os círculos representam os animais não tratados, quadrados os tratados na fase aguda, triângulos tratados na fase crônica e losangos os tratados em ambas as fases da infecção. .....69

**Figura 26** - Reações e imunoistoquímica evidenciando marcações de *T. cruzi* (em marrom) em amostras de tecido adiposo coletadas no 13ºdpi de animal NT (A) e TA (B), no 26ºdpi de animal NT (C) e TA (D), e no 61ºdpi de animal NT (E), TA (F), TC (G) e TAC (H) .....72

**Figura 27** - Reações de imunoistoquímica evidenciando marcações de *T. cruzi* (em marrom) em amostras de coração coletadas no 13ºdpi de animal NT (A) e TA (B), no 26ºdpi de animal NT (C) e TA (D), e no 61ºdpi de animal NT (E), TA (F), TC (G) e TAC (H) .....73

## LISTA DE QUADROS E TABELAS

**Quadro 1** - Estudos que utilizaram qPCR para avaliação da carga parasitária de *T. cruzi* em modelo animal. BZN – benznidazol; nDNA – DNA nuclear; kDNA – DNA mitocondrial; dpi – dias pós infecção experimental.....14

**Quadro 2** - Estudos que utilizaram qPCR para avaliação da carga parasitária de *T. cruzi* em pacientes. BZN – benznidazol; nDNA – DNA nuclear; kDNA – DNA mitocondrial; dpi – dias pós infecção experimental.....16

**Tabela 1** - Grupos de animais, número, esquema de tratamento com benznidazol (fase aguda e fase crônica) e tempos de coleta durante o estudo piloto...24

**Tabela 2** - Grupos de animais, número, tratamento com benznidazol e tempos de coleta de amostras, no 13º, 26º e 61º dpi.....26

**Tabela 3** - DNA de parasitos testados com os *primers* 32f e 148r.....34

**Tabela 4** - Resultados de hemocultura e microscopia ótica nas amostras de sangue dos oito animais de cada grupo (NT, TA, TC e TAC), nos três tempos de coleta.....39

**Tabela 5** - Mediana dos resultados (em porcentagem de *T. cruzi* no tecido) das amostras de tecido adiposo e tecido cardíaco dos oito animais de cada grupo, analisados por imunoistoquímica.....68

## LISTA DE ABREVIATURAS

| | |
|---|---|
| 32f/ 148r | *Primers* para amplificação de fragmento com 120 pares de bases oriundos do DNA mitocondrial de *T. cruzi* |
| AE | Tampão de eluição de DNA |
| AL | Tampão de lise para extração de DNA |
| BALB/c | Linhagem de camundongo |
| BS48 | Cepa de *T. cruzi* da linhagem TcII |
| BSA | *Bovine serum albumin* ou soro albumina bovina |
| C57BL/6J | Linhagem de camundongo |
| CD-1 | Linhagem de camundongo |
| CD4+ | Linfócito T auxiliar |
| CD8+ | Linfócito T citotóxico |
| CEP | Comissão de Ética e Pesquisa |
| CL Brener | Cepa de *T. cruzi* da linhagem TcVI |
| Ct | *Cycle threshold* obtido nas reações de PCR em Tempo Real |
| DAB | Diaminobenzidina |
| DB766 | Arilimilamida – composto com potencial anti *T. cruzi* |
| DBA/2 | Linhagem de camundongo |
| DNA | *Deoxyribonucleic acid* ou ácido desoxirribonucleico |
| ELISA | *Enzyme-linked immunosorbent assay* ou ensaio imunoenzimático |
| $H_2O$ milli-Q | Água deionizada purificada pelo sistema Milli-Q |
| HIV | *Human Immunodeficiency Vírus* ou vírus da imunodeficiência humana |
| IgG | Imunoglobulina G |
| IgM | Imunoglobulina M |
| IMT-USP | Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo |
| kDNA | DNA mitocondrial |
| LAFEPE | Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco |
| LIT | *Liver Infusion Triptose*ou infusão de fígado e triptose |
| MS | Ministério da Saúde |
| NHEPACHA | Rede Iberolatinoamericana sobre novas ferramentas para o manejo e cuidado de pacientes com doença de Chagas |
| NS31/ NS41 | *Primers* universais oriundos da subunidade ribossomal 18S para amplificação de material genético de eucariotos |

| | |
|---|---|
| NT | Animais não tratados |
| PBS | *Phosphate buffered saline* ou tampão fosfato-salino |
| PCR | *Polymerase chain reaction* ou reação em cadeia da polimerase |
| PR1219 | Cepa de *T. cruzi* da linhagem TcII |
| PR2259 | Cepa de *T. cruzi* da linhagem TcII |
| *Protein* A-Sepharose | Coluna cromatográfica para purificação de anticorpos |
| qPCR | Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou PCR em Tempo Real |
| qsp | Quantidade suficiente para |
| RNA | *Ribonucleic acid* ou ácido ribonucleico |
| ROX | Corante passivo que emite fluorescência, usado nas reações de PCR em Tempo Real |
| S35/ S36 | *Primers* para amplificação de fragmento de gene do DNA mitocondrial de *T. cruzi* |
| SYBR Green | Fluoróforo que se intercala ao DNA dupla fita sintetizado na PCR em Tempo Real |
| *T. cruzi* | *Trypanosoma cruzi*, protozoário causador da doença de Chagas |
| TA | Animais tratados na fase aguda |
| TAC | Animais tratados nas fases aguda e crônica |
| TC | Animais tratados na fase crônica |
| TcI | Isolados de *T. cruzi* de meio silvestre |
| TcII | Isolados de *T. cruzi* de meio doméstico |
| TCZ | Alvo do DNA nuclear de *T. cruzi* |
| TESA-blot | *Trypomastigote excreted secreted antigen - immunoblotting* ou antígeno de tripomastigotas excretados e secretados |
| Tm | Temperatura de *melting* |
| TMB | Tetrametilbenzidina |
| USP | Universidade de São Paulo |
| VL-10 | Cepa de *T. cruzi* resistente ao benznidazol |
| VNI | Composto inibidor de *T. cruzi* com ação esterol 14α demetilase (CYP51) |

## LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|---|---|
| % | Porcentagem |
| < | Menor |
| > | Maior |
| $CO_2$ | Dióxido de carbono |
| $\mu m^2$ | Micrometro quadrado |
| dpi | Dias após a infecção |
| g | Gramas |
| Kg | Quilogramas |
| KHz | Quilo-hertz |
| mg | Miligramas |
| mL | Mililitro |
| N | Normolaridade |
| ng | Nanogramas |
| nm | Nanometro |
| ºC | Graus Celsius |
| pb | Pares de bases |
| pH | Potencial hidrogeniônico |
| µL | Microlitro |

**SUMÁRIO**

**1 INTRODUÇÃO**.....1

1.1 Transmissão da infecção chagásica.....1
1.2 Agente etiológico: *Trypanosoma cruzi*.....3
1.3 Aspectos clínicos da doença de Chagas.....4
1.4 Diagnóstico laboratorial.....5
1.5 Diagnóstico molecular.....7
1.6 Tratamento etiológico.....8
1.7 Critério de cura.....11
1.8 PCR aplicada à avaliação do tratamento.....13

**2 JUSTIFICATIVA**.....18

**3 OBJETIVO GERAL**.....20

3.1 Objetivos específicos.....20

**4 MATERIAIS E MÉTODOS**.....21

4.1 Aspectos éticos.....21
4.2 Camundongos Swiss.....21
4.3 Cepa Y de *Trypanosoma cruzi*.....21
4.4 Benznidazol.....22
4.5 Infecção experimental.....22
4.6 Grupos de estudo e tamanho amostral.....23
4.7 Tempos de coleta de amostras (estudo piloto) .....24
4.8 Esquema terapêutico.....25
4.9 Continuação do estudo.....25
4.10 Coleta de amostras (sangue e órgãos) .....26
4.11 Exames convencionais: Hemocultura e microscopia ótica.....27
4.12 Extração de DNA de amostras de sangue e órgãos.....27
4.13 Extração de DNA bruto de *Trypanosoma cruzi*.....28
4.14 Geração da curva padrão da qPCR.....29
4.15 PCR universal.....30
4.16 PCR em Tempo Real (qPCR) .....30
4.17 *Primers* do DNA mitocondrial (31f e 148r) .....31
4.18 Quantificação da qPCR em parasitos/ 50ng de DNA e parasitos/ml.....32
4.19 Critérios de positividade.....33
4.20 Teste de especificidade dos *primers*.....33
4.21 Análises estatísticas da qPCR.....34

4.22 Produção de anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* em coelhos.....34
4.23 Reações de imunoistoquímica.....35
4.24 Quantificação nas reações de imunoistoquímica.....36
4.25 Fluxograma dos procedimentos do estudo (Figura 3) .....36

**5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**.....38

5.1 Testes de referência (hemocultura e microscopia ótica) .....38
5.2 PCR universal com os *primers* NS31/NS41.....40
5.3 Estudo piloto (qPCR) .....40
5.4 Parasitemia (parasitos/ mL) .....40
5.5 Carga parasitária dos órgãos (Parasitos/50 ng de DNA) .....46
5.6 Cargas parasitárias entre os tecidos (Parasitos/ 50 ng de DNA) .....54
5.7 Produção de anticorpos IgG anti-*T. cruzi*.....65
5.8 Padronização das reações de imunoistoquímica.....65
5.9 Imunoistoquímica dos tecidos adiposo e cardíaco (área de *T. cruzi*, %).....67
5.10 Indicação do tratamento.....74

**6 CONCLUSÕES**.....76

**7 PERSPECTIVAS**.....77

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**.....78

**APÊNDICES**.....89

1. Resultados das análises estatísticas de qPCR.....89
2. Protocolos para produção de anticorpos policlonais IgG anti-*T.cruzi*.....90
3. Resultados da produção de anticorpos IgG anti-*T.cruzi*.....93

**ANEXO**.....94

1. Aprovação da Comissão de Pesquisa e Ética.....94

# 1 INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, descrita há mais de 105 anos por Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1909), causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, acomete hoje entre seis a sete milhões de pessoas no mundo, a maioria na América Latina. No ano de 2010 existiam mais de 70 milhões de pessoas vivendo em áreas com risco[1]. No Brasil, existem cerca de 4,6 milhões de infectados, e a prevalência que era de 4,2% na década de 1980, passou a 2,4% após os anos 2000[2]. De 1999 a 2007, a doença de Chagas foi identificada em 0,6% (53.924) das declarações de óbito no Brasil[3].

A região endêmica, que compreende desde a região sul da Argentina e Chile chegando ao norte do México, é onde ocorre a maior parte dos casos de transmissão, principalmente devido a presença de mais de 140 espécies do inseto vetor (Triatominae, Hemiptera, Reduviidae)[4]. No entanto, recentemente, a doença tem alcançado países não endêmicos devido ao deslocamento de pessoas infectadas, situação na qual as principais formas de transmissão da infecção chagásica são a transfusional e a congênita[5].

Quando os infectados pelo *T. cruzi* apresentam manifestações clínicas, se tornam social e economicamente comprometidos, e no total, geram sete bilhões de dólares em gastos por ano aos sistemas públicos de saúde[6]. Estimativas indicam que em 2015 mais de 80% das pessoas infectadas no mundo não tiveram acesso ao diagnóstico e tratamento, o que explica a elevada morbimortalidade atribuída à doença de Chagas[1]. Por estes motivos, ainda são necessárias pesquisas e ações de controle da infecção.

## 1.1 TRANSMISSÃO DA INFECÇÃO CHAGÁSICA

A via clássica de transmissão da doença de Chagas é a vetorial. Os vetores são insetos hematófagos que pertencem a subfamília Triatominae, família Reduviidae, e são popularmente conhecidos como “barbeiros” ou “chupões”. As espécies epidemiologicamente mais importantes são *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*[7]. Hoje são descritas 152 espécies de triatomíneos com potencial de transmissão da infecção chagásica[8].

A transmissão ocorre quando os triatomíneos realizaram o repasto sanguíneo e, simultaneamente, defecam eliminando as formas infectantes de *T. cruzi*, chamadas tripomastigotas metacíclicos, pelas fezes. Estas, penetram pelo orifício da picada, especialmente veiculadas pelo ato de coçar, ou mesmo, ativamente em mucosas, como a da boca e dos olhos, infectando o hospedeiro vertebrado[9].

Avanços significativos no controle da transmissão da infecção vem sendo realizados desde a década de 70 em países endêmicos, principalmente os direcionados à eliminação de populações domiciliares dos vetores, como o *Triatoma infestans*[10]. Também existem programas de controle sorológico de bolsas de sangue e realização de diagnóstico pré-natal de mulheres que moram em zonas endêmicas. Entretanto, apesar da adoção dessas medidas, ainda persistem relatos de transmissão da doença de Chagas[11].

A forma de transmissão oral foi a mais frequente nos últimos anos, sendo que o Ministério da Saúde do Brasil contabilizou 1.570 casos no território nacional entre 2000 e 2013, a maioria na região Amazônica[12]. Nestes casos, a infecção ocorreu principalmente pela ingestão de alimentos, tais como açaí, bacaba, jaci (coquinho), caldo de cana e palmito de babaçu, contaminados com triatomíneos infectados com o parasito[1]. É uma via de transmissão que geralmente ocasiona surtos, como foi o caso de oito integrantes de uma mesma família da Guiana Francesa[13], e dos 24 casos relatados no Estado de Santa Catarina, infectados devido ao consumo de caldo de cana contaminado com triatomíneos contendo *T. cruzi*. Neste relato, os autores puderam isolar e identificar o agente etiológico nos indivíduos infectados, no vetor, e nos hospedeiros silvestres encontrados próximos ao local que armazenava a cana de açúcar consumida[14].

Devido à globalização, houve um aumento significativo de viagens internacionais e da migração de indivíduos oriundos de países latino-americanos endêmicos para regiões não endêmicas, economicamente mais desenvolvidas, como os países europeus e os EUA. Ao longo do tempo, os indivíduos infectados que viajaram para estes países, desenvolveram complicações da doença de Chagas, criando novos desafios epidemiológicos, econômicos, sociais e de políticas públicas de saúde para estas regiões[15].

Com a ausência de vetores nas regiões não endêmicas, as principais formas de transmissão passaram a ser a transfusional e congênita, existindo ainda a possibilidade de transmissão por meio de transplante de órgãos e acidentes laboratoriais. Estima-se que existam cerca de 300 mil indivíduos infectados com *T. cruzi* nos Estados Unidos[16], 5.500 no Canadá, 72.000 na Europa[1], 3.000 no Japão e 1.500 na Austrália[15].

## 1.2 AGENTE ETIOLÓGICO: *Trypanosoma cruzi*

O agente etiológico da doença de Chagas, *Trypanosoma cruzi*, é um protozoário eucarioto pertencente à ordem Kinetoplastida, que possui três formas parasitárias: tripomastigota, epimastigota e amastigota. A forma tripomastigota é encontrada na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e nas fezes do vetor, onde é denominada tripomastigota metacíclico, correspondendo à forma infectante do parasito. A forma epimastigota é encontrada no trato digestório do vetor, e as amastigotas se encontram instaladas nos tecidos dos hospedeiros vertebrados[17, 18].

O genoma do parasito é composto pelos DNA nuclear e mitocondrial, sendo que o mitocondrial representa cerca de 15 a 30% do DNA total do parasito[19]. O DNA nuclear contém genes que codificam proteínas e sequências repetitivas não codificadoras, repetidas cerca de 200.000 vezes no parasito. O DNA mitocondrial é encontrado no cinetoplasto (kDNA), uma organela citoplasmática com função semelhante a mitocôndria, presente em alguns organismos flagelados e responsável pelo fornecimento de energia para movimentação do flagelo. Este DNA é composto por milhares de moléculas circulares que codificam RNA ribossômico e enzimas envolvidas na respiração celular, repetidas entre 10 e 20.000 vezes[19].

*Trypanosoma cruzi* possui uma complexa superfície celular composta principalmente de glicoproteínas e glicolipídios. Essa grande variedade antigênica se deve a diversas funções desenvolvidas pelo parasito, entre elas, penetração na célula hospedeira, estímulo da resposta imune e adaptação aos diferentes ambientes no intestino dos vetores, na corrente sanguínea e nas células do hospedeiro vertebrado[20].

O parasito pode ser classificado de acordo com marcadores moleculares em linhagem TcI, relacionada a isolados de ambiente silvestre, ou TcII de ambiente doméstico[21, 22]. Posteriormente, houve uma subdivisão da linhagem TcII em cinco

subgrupos de TcIIa até TcIIe[23], e mais recentemente, cada subgrupo passou a ser classificado como um grupo distinto, de TcI a TcVI[24].

Na doença de Chagas, a patogenicidade depende de características do hospedeiro e da cepa do parasito[25]. As diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam variações quanto a sensibilidade aos fármacos, estresse oxidativo e infectividade em camundongos[26]. As cepas mais empregadas em estudos sobre a doença de Chagas são: Y[27] pertencente a linhagem TcII; CL Brener[28] da linhagem TcVI e Tulahuen[29] da linhagem TcVI[24].

## 1.3 ASPECTOS CLÍNICOS DA DOENÇA DE CHAGAS

As manifestações clínicas da infecção pelo *T. cruzi* se apresentam em uma fase aguda inicial, seguida pela infecção crônica que pode perdurar por toda a vida do paciente[4]. Na fase aguda existe predomínio do parasito na corrente sanguínea, geralmente detectável por método direto de diagnóstico, por exemplo, a microscopia. Em 90 a 98% dos casos, nessa fase, os sinais e sintomas são inespecíficos e envolvem febre, prostração, diarréia, vômitos, anorexia, cefaléia e mialgias, com exceção do sinal de Romaña, reação inflamatória característica no local da picada do triatomíneo[30]. Nesta fase da doença, entre 2 e 10% dos infectados apresentam sintomas característicos da infecção chagásica tais como cardiomiopatia que pode evoluir com insuficiência cardíaca, ou ainda megaesôfago, megacólon e perturbações neurológicas[30]. Dados epidemiológicos são de extrema relevância para se chegar ao diagnóstico na fase aguda, uma vez que os sinais e sintomas podem desaparecer conforme a infecção evolui para a fase crônica[17].

Os surtos de doença de Chagas aguda causados por transmissão oral, parecem indicar diferenças na evolução clínica dos infectados. Têm sido relatados: *rash* cutâneo, hemorragia digestiva, icterícia, aumento de enzimas hepáticas, e frequência mais elevada de insuficiência cardíaca grave. A morbimortalidade também parece ser mais significativa[11].

A fase crônica da infecção apresenta baixa parasitemia, muitas vezes indetectável pelos métodos diretos convencionais, no entanto, com manutenção de exames sorológicos positivos (detecção de IgG anti-*T. cruzi*)[4]. Nessa fase, existe a

forma indeterminada da doença, que ocorre entre 50 e 70% dos casos, na qual o paciente não apresenta manifestações clínicas, tanto cardíacas quanto digestivas, e tem resultado sorológico positivo[30]. Esse quadro indeterminado pode perdurar por toda a vida do paciente, ou evoluir para as formas sintomáticas. É estimado que cerca de 2,5% dos pacientes assintomáticos evoluam para a forma sintomática da doença a cada ano[31].

Na fase crônica, aproximadamente 13% dos indivíduos sintomáticos apresentam a forma cardíaca, caracterizada principalmente pela presença de miocardiopatia dilatada e insuficiência cardíaca congestiva, responsável pela maior parte da mortalidade atribuída à doença de Chagas. A forma digestiva acontece em cerca de 10% dos indivíduos, que podem evoluir com aparecimento de megaesôfago e/ou megacólon. Cerca de 8% dos pacientes evoluem para a forma mista cardíaco-digestiva, e uma parcela ainda menor desenvolve complicações neurológicas da doença[4].

Em indivíduos imunodeficientes, especialmente após a disseminação da prática de transplantes de órgãos e a emergência da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS), as manifestações clínicas da doença de Chagas costumam ser graves e muitas vezes fatais. Por isso, é fundamental, como medida preventiva, confirmar o diagnóstico em candidatos a transplantes de órgãos. Nos co-infectados pelo HIV, a reativação da doença de Chagas ocorre em aproximadamente 20% dos indivíduos, e nessas situações, as manifestações são similares àquelas encontradas na fase aguda da infecção[32].

## 1.4 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

O diagnóstico da infecção pelo *T. cruzi* deve ser feito com parâmetros clínicos, epidemiológicos e laboratoriais, a fim de se aumentar o grau de predição e acurácia[33]. Os critérios laboratoriais para a definição da infecção chagásica nas fases aguda e crônica foram atualizados pelo II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas do Ministério da Saúde do Brasil de 2015[1].

Na fase aguda são indicados os critérios parasitológicos. Os métodos sorológicos se baseiam na pesquisa de anticorpos anti- *T. cruzi* de classe IgM e têm

utilidade complementar, sendo empregados quando os métodos parasitológicos forem negativos. Métodos parasitológicos são definidos pela presença de parasitos circulantes, detectados em sangue periférico, e podem ser realizados por exame direto (microscopia) ou usando técnicas de concentração como o método de Strout, micro-hematócrito e creme leucocitário[34].

Devido à baixa parasitemia na fase crônica da doença de Chagas, os métodos parasitológicos de enriquecimento/ multiplicação como a hemocultura e xenodiagnóstico apresentam comprovadamente baixa sensibilidade, o que implica a ausência de valor diagnóstico quando o resultado for negativo[35]. Quando apresentam resultados positivos, possuem utilidade principalmente no controle do tratamento específico ou quando a sorologia apresenta resultados inconclusivos[1].

Na fase crônica da infecção (Figura 1) são preconizados dois métodos sorológicos, um de elevada sensibilidade e outro de alta especificidade. Considera-se o resultado positivo quando os dois testes sorológicos com princípios distintos, ou com diferentes preparações antigênicas apresentarem reatividade para anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG. Os métodos mais comumente empregados são os imuno-enzimáticos, a imunofluorescência indireta e testes de hemaglutinação[1].

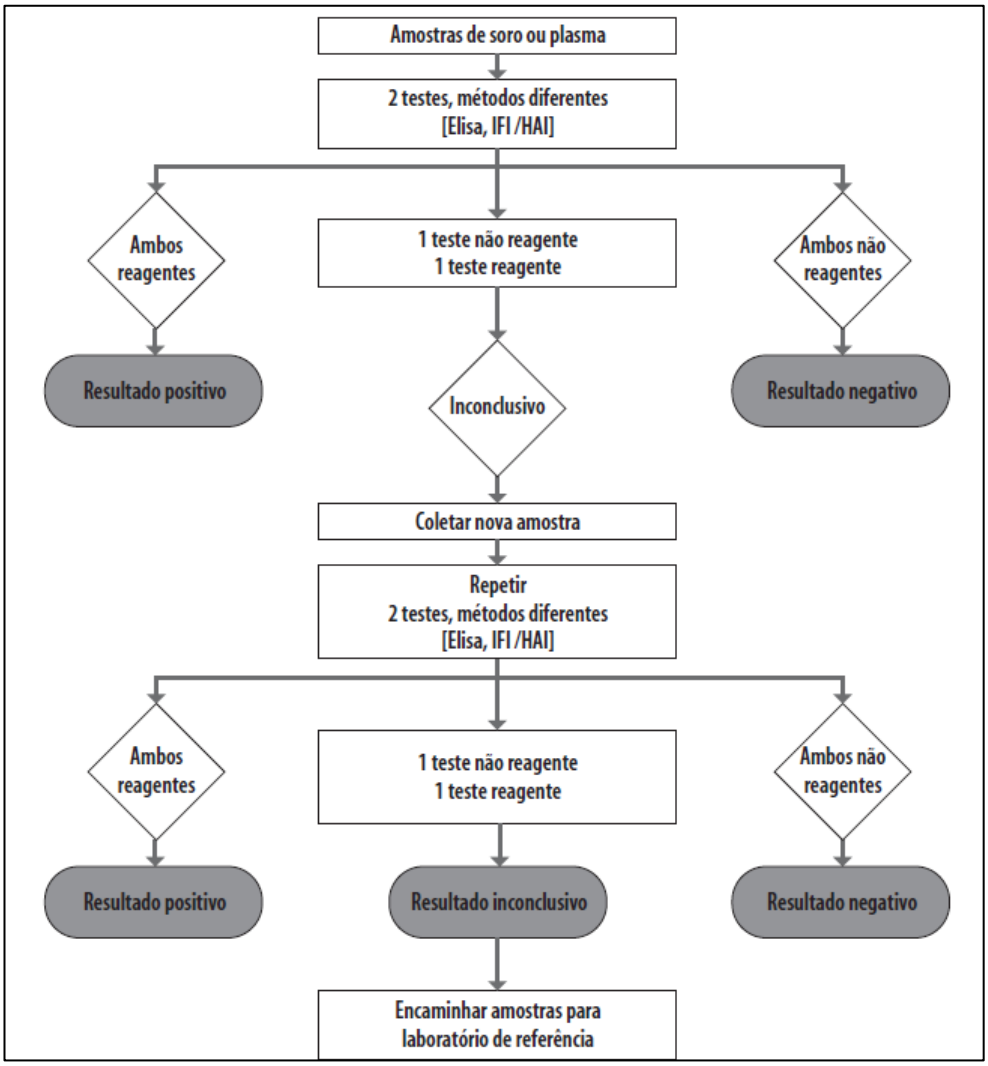



**Figura 1** - Fluxograma de realização de testes diagnósticos para doença de Chagas na fase crônica, segundo o II Consenso Brasileiro de Doença de Chagas (2015).

## 1.5 DIAGNÓSTICO MOLECULAR

Apesar dos métodos sorológicos serem indicados para diagnóstico da doença de Chagas na fase crônica, em caso de cura após tratamento, estes testes podem levar muitos anos para negativar[36, 37]. Os métodos indiretos para o isolamento de *T. cruzi* como hemocultura e xenodiagnóstico apresentam baixa sensibilidade nessa fase. Neste caso, a Reação em Cadeia da Polimerase ou *Polymerase Chain Reaction* (PCR) tem indicação quando os testes sorológicos apresentarem resultado indeterminado ou para o controle de cura após o tratamento antiparasitário[38, 39].

A PCR convencional já foi utilizada para diagnosticar e acompanhar a infecção chagásica aguda em pacientes transplantados que receberam órgãos de doadores com sorologia positiva para doença de Chagas[40]. Em outro estudo, a mesma técnica foi usada como teste complementar ao xenodiagnóstico, analisando amostras do trato digestório de *Triatoma infestans*, demonstrando vantagens em termos de sensibilidade, e sendo capazes de antecipar o diagnóstico[41].

A técnica de PCR em tempo real (qPCR) utiliza fluoróforos que se intercalam as duplas fitas de DNA sintetizadas no processo, o que permite monitorar continuamente o incremento do número de cópias da sequência alvo de amplificação. Além de ser mais sensível que a PCR convencional, também é utilizada para a quantificação do DNA alvo da amplificação[42]. As principais vantagens desse método incluem: amplificação e detecção do DNA em uma única etapa; maior rapidez no processo; redução do risco de contaminação cruzada entre amostras (carry-over), não havendo necessidade de se manipular o material amplificado e do uso de substâncias que se intercalam ao DNA, como o bromedo de etídio, que são cancerígenas[43].

Jackson et al. [44], Bianchi et al.[45], Dias et al.[46], Álvarez et al.[47] e Niborski et al.[48] utilizaram a qPCR para avaliar a parasitemia em pacientes antes e após o tratamento na fase crônica da infecção, e observaram menor presença de *T. cruzi* no sangue dos tratados. Com a mesma técnica, alguns autores observaram que as manifestações clínicas da doença de Chagas estão diretamente relacionadas à presença de *T. cruzi* no organismo de pacientes, seja no sangue[49, 50] ou em tecido cardíaco[51]. Além disso, a qPCR também vem sendo empregada como ferramenta para o diagnóstico e monitoramento de infecções causadas pelo *T. cruzi* em modelos animais[52,53,54,55].

## 1.6 TRATAMENTO ETIOLÓGICO

O tratamento é indicado na fase aguda da infecção; em casos de transmissão congênita; acidentes laboratoriais; em pacientes transplantados; pacientes com imunossupressão ou coinfecção pelo HIV. Quando o tratamento é realizado na fase aguda, levaria à cura em mais de 50% dos casos[1]. No entanto, Pinto et al.[56] investigaram 179 pacientes infectados por via oral que foram tratados com benznidazol na fase aguda, tendo ocorrido cura sorológica em 26,3% e persistência de sorologia

positiva em 73,7%. Ademais, 2,7% evoluíram com cardiopatia crônica leve a moderada.

Na fase crônica da infecção chagásica o tratamento deve ser realizado em todas as crianças até 12 anos, com cura relatada neste grupo variando de 58% a 62%[57]; em pacientes na fase crônica recente (quando a fase aguda aconteceu em período $\leq$ 12 anos), embora faltem evidências consistentes baseadas em estudos randomizados justificando tal conduta[58]; e em indivíduos entre 19 e 50 anos, sem infecção recente documentada, com a forma indeterminada ou sem cardiomiopatia avançada, com percentual de cura de pelo menos 20% neste grupo[59].

Em indivíduos chagásicos crônicos com idade superior a 50 anos, sem cardiopatia avançada, não há estudos justificando o tratamento[1], no entanto poderia ser realizado com a finalidade de reduzir a carga parasitária e evitar o desenvolvimento de manifestações clínicas. Sabe-se que o tratamento não deve ser realizado em indivíduos na fase crônica com a forma cardíaca grave, uma vez que não há evidências de benefícios neste grupo de pacientes[60].

O caráter de negligência da doença de Chagas é evidenciado pela limitação de opções terapêuticas. Os medicamentos para o tratamento da doença de Chagas são o benznidazol e o nifurtimox[61]. O benznidazol, um derivado do 2-nitroimidazol é produzido e fornecido exclusivamente pela LAPEFE (Laboratório Farmacêutico de Pernambuco). Trata-se de antiparasitário cujo mecanismo de ação não é completamente conhecido. Age supostamente nos radicais livres nitrogenados produzidos por nitro-redutases que induzem alterações nas ligações covalentes de macromoléculas. Esses radicais livres poderiam danificar o DNA de *T. cruzi*, exercendo efeito inibitório na síntese de proteínas e do ácido ribonucleico parasitário.

A dose diária de benznidazol recomendada pela LAFEPE é de 5 a 7 mg/ kg de peso corporal, devendo ser dividida em duas tomadas, uma após o café da manhã e outra após o jantar, com intervalo aproximado de 12 horas entre elas. O tratamento deve ser mantido durante 30 a 60 dias consecutivos. Crianças com menos de doze anos de idade, especialmente aquelas na fase aguda da doença, podem receber doses maiores (até o máximo de 10 mg/kg de peso corporal) durante os primeiros dez a vinte dias do tratamento.

Novos esquemas terapêuticos, bem como associações com outros fármacos vêm sendo testados para aprimorar a eficácia do benznidazol e diminuir seus efeitos tóxicos[47]. Navarrete et al.[62], sugerem que o aumento progressivo da dose de benznidazol, até a dose citada anteriormente, reduz significativamente a incidência de efeitos adversos.

Viotti et al.[63] avaliaram 566 pacientes com a fase crônica indeterminada da infecção por meio de métodos sorológicos. Destes, 283 receberam 5mg/ Kg de benznidazol por 30 dias e outros 283 não receberam tratamento. Poucos pacientes tratados (4%) tiveram progressão da doença, comparado aos não tratados (14%). Somente 5% dos tratados desenvolveram anormalidades no eletrocardiograma, enquanto entre os não tratados essa taxa foi de 16%. A conversão dos resultados sorológicos (soronegativação ou sororeversão) foi mais frequente nos pacientes tratados (15%) do que nos não tratados (6%). Desta forma foi mostrado que o tratamento com benznidazol tanto reduziu a progressão da doença de Chagas quanto aumentou a soronegativação nos pacientes tratados.

Recentemente, Machado de Assis et al.[64] e Viotti et al.[65] realizaram avaliação clínica e laboratorial de pacientes cronicamente infectados por *T. cruzi* há pelo menos 10 anos, que foram tratados com benznidazol. Os autores encontraram indícios que o tratamento com benznidazol poderia beneficiar pacientes com a forma indeterminada da doença, reduzindo a progressão clínica da doença de Chagas.

Machado de Assis et al.[66] avaliaram métodos sorológicos convencionais empregados como critério de cura após tratamento da doença de Chagas com benznidazol em 84 pacientes dez anos antes da realização destes testes. Como suporte para este critério de cura, utilizaram métodos sorológicos complementares com antígenos recombinantes, além de métodos parasitológicos e moleculares. Quando a sorologia convencional (ELISA, imunofluorescência indireta, e hemaglutinação indireta) foi utilizada, 10,6% dos pacientes foram considerados curados quando duas das três técnicas foram consideradas, e 8,5% com base nas três técnicas. Os resultados do ELISA recombinante (TESA-blot) foram semelhantes aos obtidos com as três técnicas sorológicas convencionais. A hemocultura e a PCR convencional realizada com os *primers* 121 e 122 do kDNA foram negativas em todos pacientes considerados curados. Nos pacientes com sorologia convencional discordante, os testes sorológicos

complementares e moleculares foram decisivos na identificação de falha terapêutica. Os autores concluíram que os pacientes tratados e curados, avaliados pelo TESA-blot deveriam ser reavaliados posteriormente por todas as metodologias utilizadas para verificar se o TESA-blot é uma técnica confiável na determinação de cura da doença de Chagas.

Dias et al.[46] monitoraram uma paciente com doença de Chagas na fase aguda desde o diagnóstico em 1957. Em 1974, quando se encontrava na fase crônica da infecção, ela recebeu tratamento com benznidazol. Após o tratamento foram observados testes parasitológicos negativos e sorologia convencional positiva até 1994, com resultados discordantes subsequentes entre 1995 e 1997. Os resultados sorológicos se tornaram consistentemente negativos a partir de 1999. Ao longo do tempo a paciente apresentou duas pequenas alterações transitórias no eletrocardiograma, que não foram mais observadas nos últimos nove registros até junho de 2014. Este caso confirma a possibilidade de cura da doença de Chagas na fase crônica.

Fragata-Filho et al.[67] estudaram um grupo de 310 pacientes com doença de Chagas crônica que tiveram eletrocardiogramas normais na primeira visita médica, e foram acompanhados por quase vinte anos. Destes, 263 haviam sido tratados com benznidazol e 47 não foram tratados, sendo que 79,08% dos tratados e 46,81% dos não tratados continuaram com eletrocardiogramas normais. Além disso, observaram que a ocorrência de manifestações clínicas foi menos frequente entre os pacientes tratados. Concluíram que o tratamento com benznidazol pode prevenir alterações eletrocardiográficas.

## 1.7 CRITÉRIO DE CURA

Até o momento, os métodos sorológicos são os únicos considerados para o critério de cura após tratamento da doença de Chagas[1]. No entanto, o tempo necessário para que a seronegativação ocorra é variável, sendo estimado um ano para a infecção congênita, 3-5 anos para a fase aguda, 5-10 anos para a fase crônica recente e acima de 10 anos (usualmente, 20-25 anos) para a fase crônica tardia[1]. A positividade dos métodos parasitológicos tem sido sugerida como critério de falha terapêutica, e neste

sentido, a PCR seria uma opção em relação aos métodos parasitológicos como o xenodiagnóstico e a hemocultura, por ser mais sensível[38].

Martins et al.[52], buscaram estipular um critério de cura para camundongos BALB/C infectados com $5x10^3$ formas de *T. cruzi* de linhagens TcI e TcII que foram tratados com benznidazol por 20 dias, na fase aguda. As amostras foram coletadas 30 dias após o tratamento. Para a definição do diagnóstico foram usados o exame de sangue a fresco, hemocultura, exames sorológicos convencionais e outros testes desenvolvidos no próprio estudo, além de PCR em sangue periférico, tecido cardíaco, músculo esquelético, intestino, baço, bexiga e cérebro. De acordo com os critérios tradicionais, 76,4% dos animais foram considerados não curados, 12,5% curados e 11,1% apresentaram resultados discordantes. Os autores observaram que, mesmo nos animais considerados curados pelos métodos convencionais de diagnóstico, inclusive com sorologia negativa, foi possível detectar DNA de *T. cruzi* nos tecidos, indicando a presença de infecção residual.

Dias et al.[46], observaram que uma paciente apresentou exames parasitológicos (hemocultura, xenodiagnóstico e PCR) negativos e sorológicos positivos após o tratamento durante a fase crônica da infecção. Os exames sorológicos somente se tornaram negativos somente após 25 anos do tratamento, quando os parasitológicos permanesceram negativos. Desta forma foi possível observar tanto a possibilidade de cura do tratamento realizado durante a fase crônica, quanto os resultados parasitológicos negativos indicando previamente a cura da paciente.

Oliveira-Silva et al.[68], avaliaram a sensibilidade de oito isolados de *T. cruzi*, obtidos de pacientes infectados, ao tratamento com benznidazol realizado nas fases aguda ou crônica (não em ambas as fases como foi realizado no presente estudo) em infecção de camundongos Swiss com inóculo de $10^4$ formas do parasito. Como critérios de monitoramento utilizaram parâmetros parasitológicos como PCR convencional (primers do kDNA) em sangue periférico, hemocultura e microscopia ótica, e sorológicos convencionais e não convencionais. No 120º dpi puderam observar que dois animais que tiveram resultados sorológicos negativos e parasitológico positivo. Os autores concluíram que as cepas testadas foram resistentes ao tratamento com benznidazol, mas que houve menor positividade da parasitemia nos animais tratados em relação aos não tratados.

Em casos de pacientes infectados e imunossuprimidos pode haver detecção de parasitemia de *T. cruzi*[32], sugerindo que parasitos remanescentes em tecidos possam fazer parte dos mecanismos de resistência do parasito no organismo[47,58].

Vallejo et al.[69], avaliaram a resposta imune em sete pacientes com doença de Chagas na fase crônica, comparando-os com outros sete indivíduos também na fase crônica da infecção, porém não tratados. Os pacientes tratados com benznidazol apresentaram redução significativa de ativação do sistema imune e menor contagem de células T regulatórias em relação aos não tratados, sugerindo a existência de redução da resposta inflamatória e consequente desenvolvimento de manifestações clínicas nos pacientes tratados.

## 1.8 PCR APLICADA À AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO

Como os métodos sorológicos podem levar anos a décadas para negativar após o tratamento[1], não seriam capazes de detectar uma carga parasitária residual em tecidos, e visto que alguns trabalhos demonstram resultados negativos na sorologia e positivos por PCR[52,68,70], o monitoramento da carga parasitária por qPCR tem sido proposto, abrindo novas perspectivas para o estabelecimento de um critério de cura parasitológico. Alguns autores utilizaram esta técnica para a detecção e monitoramento da infecção por *T. cruzi* em modelo animal (Quadro 1), e outros aplicaram o método para a análise de amostras de pacientes (Quadro 2).

**Quadro 1 -** Estudos que utilizaram qPCR para avaliação da carga parasitária de *T. cruzi* em modelo animal. BZN – benznidazol; nDNA – DNA nuclear; kDNA – DNA mitocondrial; dpi – dias pós infecção experimental.

| Estudo | Modelo animal/ tratamento/ cepa | Amostras/ tempos de coleta/ critério de avaliação | Conclusões |
|---|---|---|---|
| Cummings & Tarlenton (2003)[71] | C57BL/6J e BALB/c, sem tratamento; Brazil, Sylvio e Tulahuen ($10^3$, $10^4$, $10^5$ e $10^6$) | Coração e músculo esquelético (14º, 20º, 28º dpi); qPCR (nDNA e kDNA) | Quanto maior o inóculo, maior a carga parasitária nos tecidos ao longo da infecção |
| Martins et al. (2008)[52] | BALB/c; BZN (fase aguda); Oito diferentes isolados de *T. cruzi* ($5x10^3$) | Coração, músculo esquelético, cólon, baço, bexiga e cérebro (120 dpi); exame direto de sangue, hemocultura, sorologia (convencional ou não) e PCR convencional (kDNA) em sangue | Detecção de DNA de *T. cruzi* em tecidos de animais com testes convencionais negativos, indicando infecção residual |
| Nagajyothi et al. (2012)[72] | CD-1, sem tratamento; Brasil ($5x10^4$) | Tecido adiposo (30 e 300º dpi); qPCR (nDNA) | O tecido adiposo serviria como marcador do parasito no organismo |
| Batista et al. (2010)[73] | C3H/He e Swiss; BZN e arilimida-mida DB766 na fase aguda; cepa colombiana e Y ($10^4$) | Sangue (80º dpi); hemocultura e PCR convencional (kDNA) | Eficácia tripanocida da arilimidamida, possível nova terapia para a doença de Chagas |
| Miguel et al. (2010)[74] | BALB/c e Swiss Webster; BZN e tamoxifeno na fase aguda; cepa Y, CL-14 e cepa Y resistente ao BZN ($5x10^3$) | Sangue (até o 60º dpi); exame direto de sangue | Nenhuma diferença na parasitemia e mortalidade entre os dois tratamentos |
| Olivieri et al. (2010)[75] | Swiss; BZN e pozaconazol na fase aguda; cepa Y ($10^4$) | Sangue (30º, 54º e 150º dpi); exame direto de sangue, hemocultura, histopatologia e sorologia | Pozaconazol apresentou maior eficácia que BZN |
| Cencig et al. (2011)[53] | BALB/c tratados com anfotericina lipossomal nas fases aguda e crônica; Tulahuen ($10^3$) | Sangue, coração, fígado, baço, músculo e tecido adiposo (21º e 74º dpi); qPCR (nDNA) | O critério de cura deve levar em consideração a carga parasitária em tecidos, além da parasitemia |
| Batista et al. (2011)[76] | Swiss; análogos heterocíclicos combinados ou não ao BZN; fase aguda, cepa Y ($10^4$) | Sangue (60º dpi); hemocultura, microscopia ótica e PCR convencional (kDNA) | BZN não promoveu cura parasitológica. Associado a DB766 obteve cura em 13% |
| Caldas et al. (2012)[77] | Swiss; itraconazol na fase aguda; VL-10 ($5x10^3$) | Sangue e coração (10, 12, 14, 16, 18, 20, 30, 40, 50, 60 e 120º dpi); qPCR (nDNA) | Inflamação no tecido cardíaco proporcional à carga parasitária; qPCR poderia ser usada no monitoramento |
| Cencig et al. (2012)[78] | BALB/cJ; associação de nifurtimox, posaconazol e anfotericina lipossomal; fase aguda; cepa Y ou Tulahuen ($10^3$) | Sangue (40º dpi); exame direto de sangue e qPCR (nDNA) | Necessidade da combinação de medicamentos |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Caldas et al. (2014)[55] | Swiss; BZN, fexinidazol, imidazol e posaconazol (fase aguda); VL-10 ($5x10^3$) | Sangue e tecido cardíaco (10, 16, 30, 60 e 120 dpi); exame direto de sangue e qPCR (nDNA) | Ausência de inflamação em tecido cardíaco nos casos de cura parasitológica (fexinidazol) |
| Lewis et al. (2014)[79] | BALB/c sem tratamento; cepa CL Brener ($5x10^3$) | Cólon, coração, pulmão, intestino, músculo esquelético, baço e estômago (159º dpi); Marcação bioluminescente de tecidos e qPCR (nDNA) | Na fase crônica o parasito só foi observado no cólon e estômago, fato corroborado pela qPCR |
| Barreto de Albuquerque et al. (2015)[11] | BALB/c sem tratamento; Tulahuen ($5x10^{4)}$ | Sangue, coração e fígado (60º dpi); exame direto de sangue, histopatologia, sorologia | A infecção via mucosa oral ou gastrintestinal afeta a resposta imune e intensidade dos sintomas |
| Gruendling et al. (2015)[80] | Swiss; BZN na fase aguda; parasitos TcI, TcII ($1x10^4$) e TcIV ($2x10^6$) | Baço, cérebro, coração, fígado, intestino grosso e músculo esquelético (100 dpi); exame direto de sangue, hemocultura, histopatologia e qPCR (nDNA) | BZN reduziu a carga parasitária e a inflamação, porém redução variou entre linhagens de *T. cruzi* |
| Martins et al. (2015)[81] | Swiss; BZN/itraconazol (fase aguda); cepa Y ($5x10^3$) | Sangue e coração (1 e 6 meses após tratamento); Exame direto de sangue, histopatologia, sorologia e PCR convencional (kDNA) | Tratamento diminuiu a inflamação e fibrose cardíaca; importância da combinação de medicamentos |
| Guedes da Silva et al. (2015)[82] | Swiss; BZN e VNI (inibidor da CYP51 de *T. cruzi*) na fase aguda; cepa Y ($10^4$) e colombiana ($5x10^3$) | Sangue (30º e 60º dpi); microscopia ótica, qPCR (nDNA) | qPCR pode ser usada para avaliar tratamento em animais imunodeficientes |
| Oliveira-Silva et al. (2015)[68] | Swiss; BZN (fase aguda ou crônica); oito isolados de *T. cruzi* ($1x10^4$) de pacientes infectados, para avaliação da resposta ao tratamento | Sangue e coração (120º dpi); exame direto de sangue, hemocultura, histopatologia, sorologia e PCR convencional (kDNA) | Redução da carga parasitária de todos os isolados demonstrando benefício do tratamento, mesmo sem cura parasitológica. |
| Teston et al. (2016)[83] | Swiss; sem tratamento; cepas das linhagens TcI, TcII e TcIV ($1x10^4$) | Sangue (55º dpi); exame direto de sangue; hemocultura e PCR convencional (kDNA) | Investigação da linhagem de *T. cruzi* deve ser considerada no diagnóstico da doença de Chagas |

**Quadro 2 -** Estudos que utilizaram qPCR para avaliação da carga parasitária de *T. cruzi* em pacientes. BZN – benznidazol; nDNA – DNA nuclear; kDNA – DNA mitocondrial; dpi – dias pós infecção experimental.

| Estudo | Pacientes/ tratamento | Amostras/ critério de avaliação | Conclusões |
|---|---|---|---|
| Duffy et al. (2009)[37] | 43 crianças (38 tratados com BZN), três transplantados | Sangue (6, 12 e 18 meses pós tratamento); qPCR (nDNA) | qPCR é válida para monitorar reativação e tratamento da doença de Chagas |
| Freitas et al. (2011)[84] | 24 pacientes, sem tratamento | Esôfago, cólon e coração de pacientes; qPCR (kDNA) | Infecções chagásicas crônicas no Brasil e Argentina são causadas principalmente por *T. cruzi* da linhagem TcII |
| Aguiar et al. (2012)[85] | 29 pacientes tratados com BZN entre 1980 e 2010 | Hemocultura, sorologias e nested-PCR (nDNA); sangue de pacientes na fase crônica | Difícil definir cura mesmo quando *nested*-PCR negativa, porém houve redução da carga parasitária após tratamento |
| Cura et al. (2013)[40] | Oito pacientes transplantados que receberam órgãos de doadores com sorologia positiva | Sangue e líquor; qPCR (nDNA) | Importância da qPCR para o diagnóstico e monitorar tratamento da doença de Chagas |
| Jackson et al. (2013)[44] | 37 pacientes tratados com nifurtimox em 2008 | Sorologia e qPCR (nDNA); Sangue após 3 anos do tratamento | Métodos sorológicos são inadequados para monitorar resposta ao tratamento em adultos |
| Moreira et al. (2013)[86] | 150 chagásicos crônicos com manifestações clínicas (50 brasileiros, 50 argentinos e 50 colombianos) | Sangue; qPCR (kDNA) | Diferentes valores de parasitemia segundo a nacionalidade podem ser explicados pela linhagem de *T. cruzi* prevalente em cada país. A qPCR foi ferramenta adequada |
| Benvenuti et al. (2014)[51] | 18 receptores de transplante cardíaco com reativação e 16 transplantados sem reativação | Sangue e coração; qPCR (kDNA) e imunoistoquímica | Persistência do parasito em miocárdio relacionada à miocardite, porém sem associação com reativação da doença |
| Apt et al. (2015)[49] | 15 pacientes com cardiomiopatia crônica e 50 chagásicos crônicos sem manifestações | Sangue; parâmetros clínicos, PCR convencional, qPCR (nDNA) e xenodiagnóstico | Cargas parasitárias similares em pacientes com e sem manifestação |
| Bianchi et al. (2015)[45] | 62 pacientes tratados com nifurtimox | Sangue; 30 meses após o tratamento; sorologia, hemocultura, qPCR (nDNA) | Nifurtimox reduziu títulos de anticorpos e carga parasitária. Casos com qPCR positivos - re-infecção, parasitos lisados ou falha terapêutica |
| Dias et al. (2015)[56] | Uma paciente diagnosticada na fase aguda em 1957 e tratada com BZN em 1974. Acompanhamento até 2013 | Parâmetros clínicos; sangue; exame direto de sangue, hemocultura, sorologia, xenodiagnóstico e PCR (nDNA) | Após tratamento testes parasitológicos negativos e sorologia convencional positiva até 1994. Resultados consistentemente negativos a partir de 1999, confirmando cura na fase crônica |

| | | | |
|---|---|---|---|
| Ramirez et al. (2015)[70] | 11 pacientes com doença de Chagas aguda, 70 assintomáticos e 75 sinntomáticos na fase crônica | Sangue; sorologia e qPCR (kDNA) | qPCR positiva em todas as amostras de pacientes na fase aguda, uma delas com sorologia negativa; qPCR importante para o diagnóstico e monitoramento do tratamento |
| Sabino et al. (2015)[50] | 499 doadores soropositivos e 101 pacientes com cardiomiopatia chagásica | Sangue de doadores e pacientes crônicos; qPCR (kDNA) | Manifestações clínicas estão diretamente relacionadas à detecção de DNA de *T. cruzi* em amostras sanguíneas |
| Álvarez et al. (2016)[47] | 17 chagásicos crônicos tratados com BZN | Sangue uma semana antes e uma após o término do tratamento; qPCR (nDNA e kDNA) | 65% tiveram qPCR positiva antes e apenas 6% após o tratamento |
| Niborski et al. (2016)[48] | 203 pacientes chagásicos crônicos (forma indeterminada), tratados com BZN | Sangue antes do tratamento, dois, três, seis meses, um, dois e três anos após o tratamento; sorologia e PCR convencional (nDNA) | Sorologia detectável durante os 36 meses. No início, PCR positiva em 60,8% das amostras, e destas, 75,5% negativaram após o tratamento |
| Murcia et al. (2016)[87] | 455 pacientes na fase crônica indeterminada, tratados com BZN | Sangue (90, 150 e 240 após tratamento), quimio-luminescência, sorologia e PCR convencional (kDNA) | Queda significativa dos títulos de anticorpos em pacientes com PCR negativa. PCR positiva (falha terapêutica) principalmente entre os que não completaram o tratamento |

## 2 JUSTIFICATIVA DO PRESENTE ESTUDO

A avaliação de cura da infecção crônica causada por *Trypanosoma cruzi* é controversa devido a falta de testes confiáveis para garantir a eliminação do parasito do organismo[87]. Além disso, o monitoramento do tratamento de pacientes com doença de Chagas por meio de métodos sorológicos pode demorar muitos anos, ou até mesmo décadas para apresentar soronegativação[1,44,88]. Métodos diretos de diagnóstico, como o exame direto de sangue, possuem baixa sensibilidade na fase crônica da infecção, e o xenodiagnóstico e a hemocultura requerem laboratórios especializados, demandam de 30 a 120 dias para a leitura, e podem levar a resultados falso-negativos devido à baixa parasitemia na fase crônica da infecção[38].

Estudos realizados em modelos animais sugerem que a carga parasitária presente em tecidos também deveria ser levada em consideração, além da carga presente em sangue periférico, para avaliação da persistência de infecção causada pelo *T. cruzi* no organismo[52,55,71]. Alguns trabalhos mostraram que os métodos sorológicos apresentaram resultados negativos em situações nas quais existem resultados parasitológicos positivos, seja em amostras de sangue[68] ou em órgãos de animais[52], ou ainda em sangue periférico de pacientes[70]. Por esses motivos, a qPCR direcionada à detecção de *T. cruzi* em sangue e tecidos de camundongos experimentalmente infectados e tratados, poderia elucidar alguns aspectos ainda pouco conhecidos sobre a doença de Chagas, tais como a distribuição de *T. cruzi* no organismo e a resposta ao tratamento[37,44].

Os métodos parasitológicos para pesquisa de *T. cruzi*, como a microscopia ótica, hemocultura e PCR utilizam amostras de sangue periférico, uma vez que seria muito invasivo realizar biópsisa de tecidos em pacientes. No entanto, sabe-se que a forma amastigota do parasito se encontra quiescente nos tecidos, de onde pode haver um recrutamento de parasitos para a corrente sanguínea, provocando a reativação da doença acompanhada de manifestações clínicas, principalmente em pacientes apresentando algum grau de imunodeficiência[4]. Alguns estudos mostram que o tecido adiposo, além dos órgãos-alvo já conhecidos do *T. cruzi*, como o coração, esôfago e cólon, seria um local estratégico de manutenção e persistência do parasito no organismo[89]. Portanto, seria pertinente avaliar a distribuição de *T. cruzi* em diferentes

tecidos, incluindo o adiposo, e verificar se a carga parasitária presente no sangue seria representativa dos demais órgãos, para que este material biológico (sangue) possa ser utilizado de forma isolada no monitoramento da infecção chagásica crônica. Neste sentido, a técnica de imunoistoquímica poderia ser empregada para identificar e quantificar as formas de *T. cruzi* presentes nos tecidos, corroborando ou não os resultados da qPCR.

O benznidazol, apesar de apresentar muitos efeitos tóxicos, permanece como medicamento de referência para o tratamento da doença de Chagas no Brasil[1]. Estudos mostram que a carga parasitária dos pacientes está diretamente ligada à presença de manifestações clínicas da doença de Chagas[1,50], e neste sentido, o tratamento seria indicado para reduzir a carga parasitária e consequentemente o desenvolvimento de manifestações crônicas da doença[1]. Neste sentido, não existem estudos abordando a questão do tratamento da doença de Chagas realizado com benznidazol na fase aguda, e repetido durante a fase crônica, em especial se este esquema de tratamento realizado mais de uma vez apresentaria algum benefício em relação a redução da carga parasitária no sangue e em diferentes órgãos, comparado ao tratamento realizado somente durante a fase aguda ou a fase crônica.

# 3 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial da qPCR, comparado à hemocultura e a microscopia ótica, na detecção e monitoramento da carga parasitária de *T. cruzi* em sangue e órgãos de camundongos infectados e tratados com benznidazol.

## 3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) Monitorar o tratamento com benznidazol na fase aguda, crônica e em ambas as fases da infecção chagásica murina, mediante determinação da carga parasitária por qPCR realizada com primers do kDNA;

b) Verificar se existe associação entre a carga parasitária encontrada em sangue e em tecidos (adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino grosso, músculo esquelético, pulmão, rim) ao longo da infecção chagásica murina;

c) Comparar a carga parasitária de *T. cruzi*, obtida por qPCR e imunoistoquímica em tecido adiposo (fácil acesso) e cardíaco (órgão alvo da infecção chagásica).

# 4 MATERIAL E MÉTODOS

## 4.1 ASPECTOS ÉTICOS

Este estudo foi aprovado pela Comissão de Ética e Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP) no dia 30 de maio de 2012, com o protocolo CEP-IMT 2011/131 (Anexo 1).

## 4.2 CAMUNDONGOS SWISS

Os animais utilizados foram camundongos Swiss fêmeas, com seis semanas de idade e peso aproximado de 25 gramas[75]. O camundongo Swiss, de linhagem não isogênica, é um modelo animal adequado para a finalidade desta pesquisa, apresentando resposta inflamatória e imune mais heterogêneas à infecção por *T. cruzi* em relação a uma linhagem murina isogênica, assim como acontece na população humana[75,76,82]. Os animais foram pesados diariamente, para receber a dose correta de benznidazol.

O Biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo forneceu os animais que foram mantidos no Biotério do Instituto de Medicina Tropical - USP.

A criação, manutenção e experimentação com camundongos foram realizadas segundo os protocolos preconizados por Raymundo & Goldim (2000)[90], e a eutanásia dos animais foi realizada em câmara de $CO_2$[91].

## 4.3 CEPA Y DE *Trypanosoma cruzi*

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foi gentilmente cedida pelo Laboratório de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo. A cepa Y, parcialmente resistente ao benznidazol, tem sido uma referência em estudos de avaliação da eficácia do tratamento com benznidazol em camundongos infectados[73,75,92], e é responsável por causar a maioria das manifestações clínicas da doença de Chagas em seres humanos[24,93].

## 4.4 BENZNIDAZOL

O benznidazol foi disponibilizado pelo Laboratório Farmacêutico do Estado de Pernambuco (LAFEPE) para o presente estudo, em formulação pediátrica sob a forma de comprimidos de 12,5 mg. Foram administradas doses diárias de 100 mg/ kg/ dia por gavagem, nos animais tratados.

O cálculo da dose foi realizado com base na dose recomendada em seres humanos (5 mg/ Kg/ dia), convertida para a utilização em camundongos[94]. Além disso, esta dose também foi utilizada em outros estudos com modelo animal, apresentando baixo nível de toxicidade e eficácia satisfatória em camundongos Swiss infectados com cepa Y de *T. cruzi* [74,75,95,96,97,98].

Para o preparo das doses, os comprimidos foram macerados e re-suspensos em solução de 4% de goma arábica com água destilada estéril, obtendo-se concentração final de 10 mg/mL de solução. A goma arábica foi fundamental para o preparo da solução, pois funciona como agente suspensor e emulsificante do princípio ativo, deixando a solução medicamentosa com doses homogêneas.

## 4.5 INFECÇÃO EXPERIMENTAL

O modelo experimental adotado neste trabalho, que utilizou camundongos Swiss infectados com a cepa Y de *T. cruzi* e tratamento com benznidazol, vem sendo utilizado como referência para o estudo do tratamento na doença de Chagas e também como critério de comparação da eficácia de novos fármacos e substâncias com propriedades anti- *T. cruzi* [75,99].

A infecção experimental nos animais foi realizada por meio de injeção intraperitonial contendo $2x10^3$ formas tripomastigotas viáveis da cepa Y de *T. cruzi*, após contagem em câmara de Neubauer. Esse inóculo de parasitos permite ao camundongo passar pela fase aguda, sobreviver mesmo sem tratamento, e atingir a fase crônica da infecção, possibilitando o estudo da carga parasitária em animais não tratados[75,76,95].

As formas tripomastigotas da cepa Y foram obtidas do sangue de camundongos Balb/C, uma semana após terem sido infectados com $10^4$ formas tripomastigotas de *T.*

*cruzi*. Este procedimento é realizado semanalmente no laboratório de Parasitologia do Instituto de Medicina Tropical, sob supervisão da Dra. Lucia Maria Almeida Braz.

Saavedra et al.[100] realizaram xenodiagnóstico utilizando *Triatoma infestans* e amostras sanguíneas de pacientes chagásicos crônicos para quantificar as formas de *T. cruzi* encontradas nas fezes dos insetos, por meio de qPCR. Os autores procuraram simular a contaminação dos vetores como ocorre na natureza. Os resultados mostraram que, dentre os xenodiagnósticos positivos por microscopia óptica, a qPCR detectou entre 100 e 1.000 parasitos em 42,9% dos vetores, e entre 1.000 e 10.000 parasitos em 23,8%. Desta forma, o inóculo parasitário utilizado neste estudo ($2x10^3$) foi semelhante ao encontrado nas fezes de triatomíneos naturalmente infectados.

## 4.6 GRUPOS DE ESTUDO E TAMANHO AMOSTRAL

Inicialmente foi realizado um estudo piloto com tamanho amostral (n) total de 80 animais. Este "n" foi estipulado de modo a haver três animais em cada tempo de coleta de amostras, número mínimo para se inferir um cálculo comparativo entre a carga parasitária dos animais tratados e não tratados.

O estudo piloto teve o objetivo conhecer a cinética da infecção pelo *T. cruzi* no sangue e nos diferentes tecidos do animal, ao longo das fases aguda e crônica, bem como comparar os efeitos do tratamento em relação aos animais não tratados. Desta forma os grupos de animais foram os seguintes:

**Grupo I (NI):** camundongos não infectados e não tratados. Grupo controle negativo – 6 animais;

**Grupo II (NIT):** camundongos não infectados e tratados, para avaliar o comportamento dos animais submetidos ao benznidazol, especialmente para observar se algum deles evoluiria a óbito devido aos efeitos adversos (toxicidade) do fármaco – 8 animais;

**Grupo III (NT):** camundongos infectados e não tratados, para avaliar o curso natural da infecção e realizar comparações com os animais tratados (grupo controle positivo) – 24 animais;

**Grupo IV (TA):** camundongos infectados e tratados na fase aguda. O início do tratamento ocorreu no 5º dia após a infecção (dpi) e continuou por 20 dias consecutivos – 24 animais;

**Grupo V (TC):** camundongos infectados e tratados na fase crônica. O início do tratamento ocorreu no 40º dpi e continuou por 20 dias consecutivos – 9 animais;

**Grupo VI (TAC):** camundongos infectados e tratados nas fases aguda e crônica. O início do tratamento ocorreu no 5º dpi, por 20 dias consecutivos, e voltou a ser administrado no 40º dpi, por mais 20 dias consecutivos – 9 animais.

## 4.7 TEMPOS DE COLHEITA DE AMOSTRAS – ESTUDO PILOTO

No estudo piloto, com a finalidade de conhecer a cinética da infecção pelo *T. cruzi* no modelo animal selecionado, foram definidos oito tempos de colheita de amostras: no 5º, 10º, 13º, 18º, 26º, 47º, 53º e 61º dia após a infecção (dpi).

Na fase aguda foram estipulados cinco tempos de colheita: 5º, 10º, 13º, 18º e 26º dpi, visando estabelecer o perfil da carga parasitária desde a ascensão nos primeiros dias após a infecção, o pico, que deveria ocorrer por volta do 13º dpi, até a queda da carga parasitária ao final da fase aguda, por volta do 26º dpi, após o final dos vinte dias de tratamento. Na fase crônica da infecção, foram estipulados três tempos de colheita de amostras (47º, 53º e 61º dpi), buscando-se comparar a carga parasitária em sangue e órgãos entre os animais tratados com benznidazol e os não tratados (Tabela 1).

**Tabela 1 -** Grupos de animais, número (n), esquema de tratamento com benznidazol (fase aguda e fase crônica) e tempos de coleta durante o estudo piloto.

| Grupos | N | Tratamento fase aguda | Tratamento fase crônica | Obtenção de amostras (dpi) |
|---|---|---|---|---|
| I | 6 | - | - | Antes da infecção e 61º |
| II | 8 | 20 x 100 mg/kg/dia (5º-24º) | 20 x 100 mg/kg/dia (40º-59º) | - |
| III | 24 | - | - | 5º, 10º, 13º, 18º, 26º, 47º, 53º, 61º |
| IV | 24 | 20 x 100 mg/kg/dia (5º-24º) | - | 5º, 10º, 13º, 18º, 26º, 47º, 53º, 61º |
| V | 9 | - | 20 x 100 mg/kg/dia (40º-59º) | 47º, 53º, 61º |
| VI | 9 | 20 x 100 mg/kg/dia (5º-24º) | 20 x 100 mg/kg/dia (40º-59º) | 47º, 53º, 61º |

## 4.8 ESQUEMA TERAPÊUTICO

O tratamento realizado na fase aguda teve início no 5º dpi, uma vez que entre o 3º e 4º dpi ocorreu o início da detecção de parasitos no sangue dos camundongos, avaliado por microscopia óptica[53,101]. O tempo de tratamento de 20 dias foi decidido com base em diversos trabalhos da literatura[95,96,98].

No modelo experimental murino, a cronificação da infecção ocorre por volta do 30º dpi, quando a carga parasitária em sangue cai a níveis indetectáveis por métodos parasitológicos tradicionais como a microscopia ótica[102]. Por isso, o tratamento da infecção na fase crônica teve início no 40º dpi. Cencig et al.[53] relataram que no 45º dpi camundongos isogênicos infectados com 1.000 formas da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, considerada bastante virulenta, já se encontravam na fase crônica da infecção.

A fase aguda da infecção por *T. cruzi* é caracterizada pela parasitemia patente, geralmente detectável por métodos diretos como a microscopia ótica. Já na fase crônica, existe baixa parasitemia que não será detectável pelos métodos parasitológicos, sendo preconizados os métodos sorológicos para o diagnóstico[1].

## 4.9 CONTINUAÇÃO DO ESTUDO

Após realização do estudo piloto, observou-se que nos tempos de colheita de amostras correspondendo ao 13º dpi, referente a metade da fase aguda; 26º dpi referente ao final da fase aguda e 61º dpi referente ao final da fase crônica estipulada neste estudo, foram encontradas as maiores diferenças de cargas parasitárias entre os animais tratados e não tratados. Com a finalidade de aumentar o número de animais em cada grupo e aprimorar as análises estatísticas, estes três tempos foram selecionados para a continuação do estudo.

Nesta etapa experimental utilizamos mais 40 animais, sendo cinco em cada um dos tempos de coleta selecionados (Tabela 2). Considerando os animais utilizados no estudo piloto e o posterior aumento do “n”, tivemos um total de 120 animais utilizados, sendo 8 em cada tempo de colheita: 13º, 26º e 61º dpi.

**Tabela 2**. Grupos de animais, número, tratamento com benznidazol e tempos de colheita de amostras no 13º, 26º e 61º dpi.

| Grupos | N | Tratamento fase aguda | Tratamento fase crônica | Obtenção de Amostras (dpi) |
|---|---|---|---|---|
| III | 15 | - | - | 13º, 26º e 61º |
| IV | 15 | 20 x 100mg/kg/dia (5º-24º) | - | 13º, 26º e 61º |
| V | 5 | - | 20 x 100mg/kg/dia (40º-59º) | 61º |
| VI | 5 | 20 x 100mg/kg/dia (5º-24º) | 20 x 100mg/kg/dia (40º-59º) | 61º |

## 4.10 COLHEITA DE AMOSTRAS (SANGUE E ÓRGÃOS)

Após eutanásia dos animais, 1 mL de sangue foi colhido em seringa estéril de 1 mL por punção cardíaca, e o material foi colocado em tubos plásticos estéreis com EDTA para coleta de sangue em crianças (Becton Dickinson Vacutainer®, 367861, Curitiba-PR, Brasil). Uma parte do sangue (400 µL) foi utilizada para a realização da hemocultura, e o restante foi conservado em freezer -86ºC até o momento da extração de DNA[71,75].

Além do sangue, foram colhidos nove órgãos de cada animal para a avaliação da carga parasitária por qPCR: tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino grosso, músculo esquelético, pulmão e rins. Os tecidos adiposo e cardíaco foram arbitrariamente selecionados para os testes de imunoistoquímica.

A escolha dos órgãos foi elaborada de modo a se estudar a carga parasitária naqueles que são sabidamente importantes na infecção chagásica, tais como o coração e o intestino, além de outros órgãos para conhecermos melhor a cinética da infecção chagásica ao longo das fases aguda e crônica no camundongo Swiss.

Todos os órgãos foram extraídos utilizando-se pinças e tesouras cirúrgicas estéreis. Após a excisão, cada órgão foi extensivamente lavado com solução salina para não haver contaminação com sangue ou material fecal, no caso do intestino grosso. A amostra de tecido adiposo foi extraída da região abdominal ventral, e a de músculo esquelético, do membro inferior esquerdo. Os órgãos extraídos foram acondicionados em microtubos do tipo *eppendorf* de 1,5 mL e mantidos em freezer -86ºC [53], até o momento da extração de DNA ou da confecção dos cortes histológicos.

Do coração, metade do órgão foi utilizado para extração de DNA e metade para confecção das lâminas para realização da imunoistoquímica. Este órgão foi

selecionado para a imunoistoquímica, pois é um órgão-alvo do *T. cruzi* no organismo, onde ocorrem as principais manifestações clínicas da doença de Chagas[4], enquanto o tecido adiposo foi selecionado por ter sido relatado como um local de persistência das formas amastigotas e possível fonte de parasitos nos episódios de reativação da doença[72]. Além disso, caso a carga parasitária dos adipócitos seja equivalente à do tecido cardíaco, o tecido adiposo poderia ser usado como indicador do número de parasitos teciduais presente em pacientes cronicamente infectados, uma vez que a biópsia neste local seria menos invasiva em relação à biópsia de tecido cardíaco ou outros órgãos de acesso ainda mais difícil. Sendo assim, além de confirmar a presença das formas amastigotas, procuramos averiguar se a quantidade de formas encontradas no tecido adiposo estaria relacionada àquela do tecido cardíaco, nas diferentes fases da infecção (13º, 26º e 61º dpi).

## 4.11 EXAMES CONVENCIONAIS DE DIAGNÓSTICO: HEMOCULTURA E MICROSCOPIA ÓTICA

Para a confirmação da infecção por *T. cruzi*, no 3º e 4º dpi foi realizado o exame microscópico direto do sangue caudal de cada camundongo. As amostras foram examinadas entre lâmina e lamínula por microscopia óptica para a pesquisa de formas tripomastigotas de *T. cruzi* [75].

Foram realizadas hemoculturas de todos animais em cada um dos tempos de colheita. Foram adicionados 0,4 mL de sangue a 4 mL de meio LIT (*Liver Infusion Triptose*), conforme protocolo previamente descrito por Martins et al.[52]. Os microtubos foram mantidos em estufa a 28ºC. A leitura das hemoculturas foi realizada no 10º, 30º e 60º dias após a semeadura do meio[53,75].

## 4.12 EXTRAÇÃO DE DNA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E ÓRGÃOS

Foram colhidas dez amostras de cada animal, sendo uma de sangue e nove de órgãos (tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino grosso, músculo esquelético, pulmão e rins). O total de animais utilizados no experimento foi de 120, portanto, tivemos 1.200 amostras de DNA extraídas, conforme descrito abaixo.

As extrações de DNA das amostras de sangue e órgãos foram feitas utilizando

o kit de extração de DNA da QIAGEN (QIAamp® DNA Mini Kit, 51306, São Paulo-SP, Brasil), segundo as recomendações do fabricante. Foram adicionados 20 µL de proteinase K (Sigma) 20 mg/ mL e 200 µL do tampão de lise "AL" a 200 µL de sangue, ou de solução contendo 25 mg de tecido, re-suspenso em tampão de extração. Antes dos fragmentos de órgãos serem adicionados ao tampão de lise, eles foram macerados em placa de petri com auxílio de uma lâmina de bisturi. A solução de sangue ou de fragmentos de órgãos macerados foi homogeneizada e colocada em banho seco por 10 minutos a 56°C. Em seguida foram acrescidos 200 µL de etanol absoluto, e a mistura foi homogeneizada. Os 600 µL de solução foram transferidos para a coluna do kit QIAamp, e em seguida, realizada centrifugação a 6.000 x g por um minuto a 25ºC. O sobrenadante foi desprezado, em seguida, foram acrescentados 500 µL do tampão *wash 1* e a coluna foi centrifugada a 6.000 x g por 1 minuto. O sobrenadante foi desprezado novamente, e foram acrescentados 500 µL do tampão *wash 2*. A centrifugação foi repetida novamente por 3 minutos a 13.000 x g, e o sobrenadante desprezado. A esta coluna, foram acrescidos 100 µL do tampão de eluição "AE", e a mistura deixada em temperatura ambiente por 5 minutos. Em seguida, foi centrifugada por 1 minuto a 6.000 x g. O sobrenadante obtido após a centrifugação (contendo o DNA) foi armazenado a -20°C até o momento da quantificação e uso.

Todas as amostras de DNA foram quantificadas em aparelho Nanodrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington DE, USA), e se necessário, diluídas para obtenção da concentração de 25 ng de DNA por µL de solução, de modo que utilizássemos dois microlitros em cada qPCR, totalizando 50 ng de DNA genômico total por reação.

## 4.13 OBTENÇÃO DE DNA BRUTO DE *Trypanosoma cruzi*

DNA bruto de *T. cruzi* foi utilizado para realização da curva-padrão, testada juntamente com as amostras em cada microplaca de qPCR.

Foram previamente testadas as metodologias de extração de DNA de *T. cruzi* por choque térmico e com o Kit da QIAGEN (QIAamp® DNA Mini Kit, 51306, São Paulo-SP, Brasil). O método que resultou na maior quantidade de DNA, e na melhor reprodutibidade na curva de calibração foi escolhido como o método padrão do estudo,

isto é, foi selecionado o método de extração de DNA bruto do parasito por choque térmico, conforme descrição a seguir.

A obtenção do DNA bruto partiu de parasitos cultivados em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Triptose*); 10 mL de meio LIT contendo $10^6$ formas epimastigotas de *T. cruzi* por mL, contados em câmara de Neubauer, obtidos em fase exponencial de crescimento, foram centrifugados a 4.000 x g por 15 minutos. Todo sobrenadante foi descartado e o *"pellet"* contendo os parasitos foi re-suspenso em 1 mL de água destilada estéril. Esse conteúdo foi agitado em *"vortex"* e aquecido a 100ºC por 10 minutos em banho-maria seco para promover a lise de parasitos, seguido de resfriamento em gelo por 10 minutos. O procedimento foi repetido duas vezes. Após as duas etapas de aquecimento e resfriamento, a solução foi centrifugada a 750 x g por 5 minutos. O DNA presente no sobrenadante foi passado para outro tubo, e teve sua concentração determinada por espectrofotometria em aparelho NanoDrop 1000. A amostra foi armazenada a -86ºC até o momento da utilização.

Esse protocolo resultou em solução de DNA contendo $10^7$ parasitos/ mL de solução, correspondendo a $10^4$ parasitos/ µL[101,103]. Como cada *Trypanosoma cruzi* possui 220 fentogramas de DNA total[104], foi verificado se a quantificação de DNA obtida pelo Nanodrop correspondia ao número previsto de parasitos na solução.

## 4.14 GERAÇÃO DA CURVA-PADRÃO DA qPCR

A extração de DNA por choque térmico foi testada antes e após a diluição da solução de meio LIT com os parasitos, sendo que a extração realizada antes das diluições foi escolhida por apresentar melhor reprodutibilidade. Sendo assim, as diluições foram feitas com o equivalente genômico do DNA de *T. cruzi*, e não com o meio LIT contendo os parasitos íntegros.

A partir da solução de DNA de *T. cruzi* contendo $10^4$ parasitos/ µL, extraída conforme metodologia citada acima, foram utilizados 2 µL (DNA de 2 x $10^4$ parasitos) para realização de diluição seriada 1/10 em água deionizada. Para as qPCR utilizamos curvas de calibração com sete pontos, correspondendo a: 200 parasitos; 20; 2; 2 x $10^{-1}$, 2 x $10^{-2}$, 2 x $10^{-3}$ e 2 x $10^{-4}$ frações de parasito.

A cada uma das diluições da curva de calibração foram adicionados 50 ng de DNA extraído de sangue de camundongo Swiss livre de infecção[86]. Nas curvas-padrão utilizadas nos testes de amostras de tecidos, foram adicionandos 50 ng de DNA do mesmo tecido proveniente de camundongo Swiss livre de infecção (DNA de tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino grosso, músculo esquelético, pulmão e rins)[53,71].

## 4.15 PCR UNIVERSAL

Para avaliar se as amostras de DNA extraídas de sangue, órgãos e de *T. cruzi* estavam íntegras foram feitos géis de agarose 0,8% com o DNA total após extração. Para avaliar se as amostras de DNA continham inibidores da amplificação foram utilizados os *primers sense* NS31: 5'-TTGGAGGGCAAGTCTGGTGCC-3' e *anti-sense* NS41: 5'-CCCGTGTTGAGTCAAATTA-3' do gene que codifica a porção 18S do DNA ribossomal de organismos eucariotos. Esses *primers* amplificam fragmento de 651 pares de base[105].

## 4.16 PCR EM TEMPO REAL (qPCR)

As reações foram processadas no termociclador 7500 *Real-Time PCR System* da Applied Biosystems do Laboratório de Protozoologia do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, com o marcador fluorescente SYBR Green do kit Máxima SYBR Green/ROX qPCR Master Mix (Thermo Scientific, K0223, Waltham MA USA).

Em cada microplaca de 96 reações foi analisada uma curva-padrão com sete pontos em triplicata, totalizando 21 reações. Em cada microplaca foram incluídos dois controles negativos, analisados em triplicata, somando mais seis reações. Para os controles negativos foi utilizada água milli-Q estéril em lugar do DNA, sendo um deles preparado na sala de reagentes e o outro no momento da aplicação das amostras de DNA dos animais, na sala de extração. Excluindo as 27 reações, referentes a curva-padrão e aos controles negativos, foram aproveitadas 69 reações em cada microplaca,

usadas para processar 23 amostras em triplicata. Como tinhamos 1.250 amostras, utilizamos 55 microplacas, totalizando 5.280 qPCR.

## 4.17 *PRIMERS* DO DNA MITOCONDRIAL (32f / 148r) USADOS NA qPCR

No âmbito da dissertação de mestrado do aluno Marcos Luiz Alves Andrino, foram padronizadas e validadas duas qPCR, uma delas com *primers* do DNA mitocondrial (32f e 148r), obtidos do trabalho de Schijman et al., (2011)[106] e posteriormente utilizados por Qvarnstrom et al., (2012)[107], e *primers* do DNA nuclear (F2 e B3), descritos por Braz et al. (2007)[41].

Os *primers* do alvo mitocondrial apresentaram maior sensibilidade analítica, detectando DNA equivalente a $2 \times 10^{-4}$ de parasito (0,02 parasitos por mL), enquanto os *primers* do DNA nuclear detectaram $2 \times 10^{-3}$ de parasito (0,2 parasitos por mL). Além disso, o sistema mitocondrial apresentou maior número de amostras detectadas, menor discordância entre as triplicatas, provavelmente pelo fato do alvo mitocondrial apresentar repetições distribuídas de forma mais homogênea no genoma do parasito.

Por outro lado, a sequência TCZ do DNA nuclear de *T. cruzi* apesar de apresentar maior número de cópias por parasito (200.000 versus 10.000 a 20.000 cópias do DNA mitocondrial), possui repetições que estão dispostas em *tandem* (contíguas, lado a lado), o que provoca o fenômeno do “tudo ou nada” nas reações de PCR, isto é, em baixas concentrações de DNA a reação pode ser positiva ou negativa, na dependência da alíquota de DNA conter as repetições em *tandem* ou não.

Ramirez et al., 2015, também fizeram a validação de duas qPCR com *primers* do DNA nuclear e mitocondrial, e chegaram a conclusão que a PCR com o DNA mitocondrial foi mais sensível, detectando 0,23 parasitos por mL, enquanto o DNA nuclear detectou 0,7 parasitos/ mL.

Por estes motivos, os *primers* sense 32f: 5′-TTTGGGAGGGGCGTTCA-3′ e anti-sense 148r: 5′-ATATTACACCAACCCCAATCGAA-3′, que amplificam fragmento de 120 pares de bases do DNA mitocondrial de *T. cruzi*[107] foram selecionados para a realização do presente estudo.

As condições para a realização da qPCR com os *primers* 32f e 148r foram: em volume total de 25 μL, *1X Maxima SYBR Green/ROX Master Mix*, 0,2 μM de primers,

50 ng de DNA, água milli-Q estéril RNAse-free qsp 25 µL. As condições de temperatura em que a reação ocorreu foram: desnaturação inicial a 95ºC por 10 minutos; 40 ciclos de 95ºC por 15 segundos, 60ºC por 15 segundos e 72ºC por 30 segundos, finalizando com a curva de dissociação.

Com estas condições, a amplificação da sétima e última diluição (2 x1 $0^{-4}$ de parasito), nas três amostras da triplicata, ocorreu no Ct = 37,22. Na curva de dissociação, a temperatura de *melting* (Tm) dos produtos de amplificação foi de 78,14ºC, e somente reações com eficiência entre 90 e 110% e *slope* entre -3,10 e -3,58 foram interpretadas, de acordo com recomendações de Nolan et al.[108] (Figura 2).

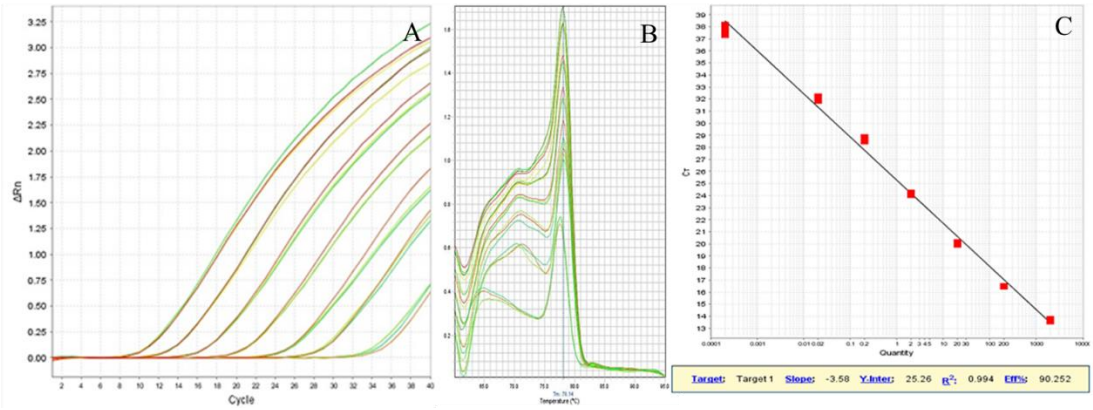



**Figura 2 -** Real Time PCR (qPCR) com os primers 32f e 148r do kDNA. **A)** Curva padrão com sete diluições de DNA de *T. cruzi*, em triplicata, correspondendo a 200 parasitos, 20, 2, $2x10^{-1}$, $2x10^{-2}$, $2x10^{-3}$ e $2x10^{-4}$ de parasito (Ct = 37,22). **B)** Curva de *melting* das amostras da curva padrão, com Tm de 78,14ºC. **C)** Pontos da curva padrão destacados em vermelho, mostrando reação com eficiência de 90,25% e slope de -3,58.

## 4.18 QUANTIFICAÇÃO DA qPCR EM PARASITOS/ 50 ng DE DNA DE TECIDOS E PARASITOS/ mL DE SANGUE

Em cada qPCR foram utilizados 50 ng de DNA de amostras na concentração de 25 ng/ µL (2 µL de DNA em cada reação). A extração de DNA de sangue partiu de 200 µL de amostra, e foi eluída em 100 µL de tampão AE, conforme metodologia já descrita. Sendo assim, cada µL de DNA de sangue é equivalente a 2 µL de sangue.

Nos resultados, os gráficos dos órgãos isolados (Figuras 5 a 13), bem como os da comparação do número de parasitos entre sangue e órgãos (Figuras 14 a 21), foram expressos em parasitos/ 50 ng de DNA (quantidade de DNA utilizada nas reações).

A conversão dos resultados de parasitos/ 50 ng de DNA para parasitos/ mL, utilizada no gráfico da parasitemia (Figura 4), foi feita multiplicando por 250 os valores obtidos na qPCR das amostras de sangue. Como cada 1 µL de DNA de sangue equivale a 2 µL de sangue do animal (eluição feita em 100 µL de AE), e a qPCR foi feita com 2 µL de DNA (4 µL de sangue), multiplicando os resultados obtidos por 250, obtivemos a quantidade de parasitos presentes em 500 µL de DNA (ou 1 mL de sangue).

## 4.19 CRITÉRIOS DE POSITIVIDADE

Utilizando critérios arbitrários, baseados nos preconizados por Nolan et al.[108], foram validadas apenas as reações com inclinação da curva (*slope*) entre -3,10 e -3,58 e eficiência compreendida entre 90 e 110%. Foram consideradas positivas as amostras que apresentaram valor de Tm variando em no máximo em 1º C em relação ao Tm de 78,14ºC; tiveram carga parasitária maior ou igual ao limite de detecção do sistema (2 x $10^{-4}$ de parasito); e apresentaram valores de Ct na triplicata sem diferir em mais de um Ct.

## 4.20 TESTES DE ESPECIFICIDADE DOS *PRIMERS*

A amostra de DNA de *Trypanosoma rangeli* apresentou reatividade cruzada quando avaliada com os *primers* deste estudo, corroborando resultados observados por outros autores[107]. No entanto, o *Trypanosoma rangeli* não é patogênico para o homem, e nenhuma outra amostra de DNA, dos demais parasitos testados, apresentou amplificação (Tabela 3).

**Tabela 3 -** DNA de parasitos testados com os *primers* 32f e 148r.

| Espécie | Cepa | Origem |
|---|---|---|
| *Crithidia fasciculata* | TCC 039 | Coleção de tripanossomatídeos ICB-USP |
| *Leishmania (L.) amazonensis* | MHO/BR/73/M2269 | Dr. José Angelo L. Lindoso[1] |
| *Leishmania (V.) braziliensis* | MHOM/BR/75/M2903 | Dr. José Angelo L. Lindoso[1] |
| *Leishmania (V.) guyanensis* | MHOM/BR/1975/M4147 | Dr. José Angelo L. Lindoso[1] |
| *Leishmania chagasi* | MHOM/BR/72/M6445 | Dra. Lúcia Maria Almeida Braz[3] |
| *Leptomonas seymouri* | TC 011E | Prof. Dr. Paulo Cotrim[1] |
| *Plasmodium falciparum* | Palo Alto | Dra. Sandra do Lago Moraes[1] |
| *Toxoplasma gondii* | ME49 | Prof. Dr. Heitor Franco de Andrade Jr. [2] |
| *Trypanosoma rangeli* | Cepa não relatada | Dra. Lúcia Maria Almeida Braz[3] |

[1] Laboratório de Soroepidemiologia e Imunobiologia, [2] Laboratório de Protozoologia e [3]Laboratório de Parasitologia do IMT-USP/SP

## 4.21 ANÁLISES ESTATÍSTICAS DA qPCR

Para cada animal estudado, foi calculada a média dos valores da triplicata das cargas parasitárias. A seguir, o valor de média das cargas parasitárias, dos oito animais utilizados em cada grupo foi usado para o cálculo da mediana da carga parasitária por meio do teste não paramétrico de Mann Whitney U (Mann- Whitney- Wilcoxon). Diferenças com $p<0,05$ foram consideradas significantes. Outros autores utilizaram estes testes estatísticos para análise de resultados[53,77].

Foram apresentados gráficos tanto com os resultados da parasitemia ou de cada órgão individualmente, quanto da comparação das cargas parasitárias entre todos os tecidos (sangue + órgãos). Cada gráfico está acompanhado de uma tabela com os valores das cargas parasitárias correspondentes. Todas as análises e gráficos foram processados com o software Graph Pad Prism, versão 5.02.

## 4.22 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICLONAIS ANTI-*T. CRUZI* EM COELHOS

A produção dos anticorpos foi necessária para que pudéssemos realizar os testes imunoistoquímicos com marcação de anticorpo policlonal anti- *T. cruzi* com peroxidase, uma vez que anticorpos anti-*T. cruzi* não se encontram disponíveis comercialmente. As etapas de produção de antígenos de *T. cruzi*, o teste dos antígenos,

inoculação dos antígenos nos coelhos, coleta de sangue e purificação dos anticorpos, foram detalhadas no Apêndice 2.

## 4.23 REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

Os testes de imunoistoquímica foram padronizados e realizados no Laboratório de Imunopatologia de Doenças Infecciosas e Parasitárias do Instituto de Medicina Tropical (IMT-USP), sob supervisão da Dra. Ana Maria Gonçalves da Silva, para a evidenciação de formas amastigotas de *T. cruzi* presentes nos tecidos adiposo e cardíaco de cada um dos oito animais de cada grupo.

Os fragmentos do coração e tecido adiposo, órgãos selecionados para a imunoistoquímica, foram armazenados em freezer -86ºC, posteriormente fixados em formol 10% tamponado em pH 7,2, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol, embebidos e incluídos em parafina, e finalmente submetidos à microtomia para a obtenção de quatro cortes seriados com espessura de 5 μm. Em seguida, foram desparafinizados com dois banhos de xilol por cinco minutos, um a 60ºC e outro em temperatura ambiente. Os cortes foram hidratados em soluções de etanol com concentrações decrescentes (100, 100, 90, 80 e 70%) por dois minutos cada, e lavados em água corrente por cinco minutos.

Antes da reação de imunoistoquímica, algumas lâminas foram coradas por hematoxilina e eosina para avaliação da qualidade dos cortes histológicos[109]. As reações de imunoistoquímica foram realizadas pelo método de imunoperoxidase[51,54]. Inicialmente, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio a 3%, em dois banhos de 10 minutos à temperatura ambiente para eliminar a atividade da peroxidase endógena dos tecidos. Em seguida, passaram por três banhos de cinco minutos em tampão fosfato salino (PBS)[51,104].

Os sítios de ligação inespecíficos dos tecidos foram bloqueados com solução de PBS com leite desnatado a 6%, durante 30 minutos a 37ºC, seguidos por mais três lavagens de cinco minutos em PBS. As lâminas foram secadas e incubadas com anticorpo primário diluído a 1:250 em PBS com soro albumina bovina (BSA) a 1%, em câmara úmida *overnight* a 4ºC. Os anticorpos policlonais anti-*T. cruzi* foram produzidos pelo nosso grupo em coelhos imunizados com a cepa Y de *T. cruzi*,

segundo metodologia descrita anteriormente. Na sequência, foram realizadas três lavagens em tampão PBS por cinco minutos. Em seguida, as lâminas foram incubadas por 30 minutos a 37ºC com anticorpo secundário (Histofine 414181F, Biogen, São Paulo-SP, Brasil, anti-anticorpo marcado com peroxidase, específico para anticorpos de coelho). A reação foi revelada com substrato cromogênico composto por solução de diaminobenzidina DAB 0,6% em tampão PBS com peróxido de hidrogênio 0,02% (60 mg de diaminobenzidina diluídos em 100 mL de PBS e 1 mL de peróxido de hidrogênio 20 volumes), seguida de lavagem em água corrente e destilada. Por fim, foi realizada contracoloração em hematoxilina de Carrazi por 30 segundos, e as lâminas foram submetidas à desidratação em concentrações crescentes de etanol (50, 80, 95, absoluto e absoluto) por dois minutos cada e dois banhos de xilol de cinco minutos cada. A montagem das lâminas foi feita com solução Entellan (107960, Merk Millipore, Darmstadt, Alemanha) e lamínula[51,54].

## 4.24 QUANTIFICAÇÃO NAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

Foi realizada análise quantitativa das formas de *T. cruzi* (amastigotas ou dispersas no tecido) presentes em tecido adiposo e cardíaco, para comparação por meio do método Mann Whitney U (Mann- Whitney- Wilcoxon), entre ambos os tecidos, e ainda entre animais tratados em relação aos não tratados, de acordo com a fase de infecção. Diferenças com $p < 0,05$ foram consideradas significantes. Em cada amostra, foram analisados 20 campos em cada um dos quatro cortes histológicos não consecutivos realizados, e então foi somada a área total das formas de *T. cruzi* que foi dividida pela área total analisada (em $\mu m^2$). Os resultados foram apresentados em porcentagem de *T. cruzi* no tecido analisado. As áreas, tanto de marcação de *T. cruzi*, quanto dos campos, foram calculadas utilizado o *software* Axio Vision[54].

## 4.25 FLUXOGRAMA DOS PROCEDIMENTOS DO ESTUDO (FIGURA 3)

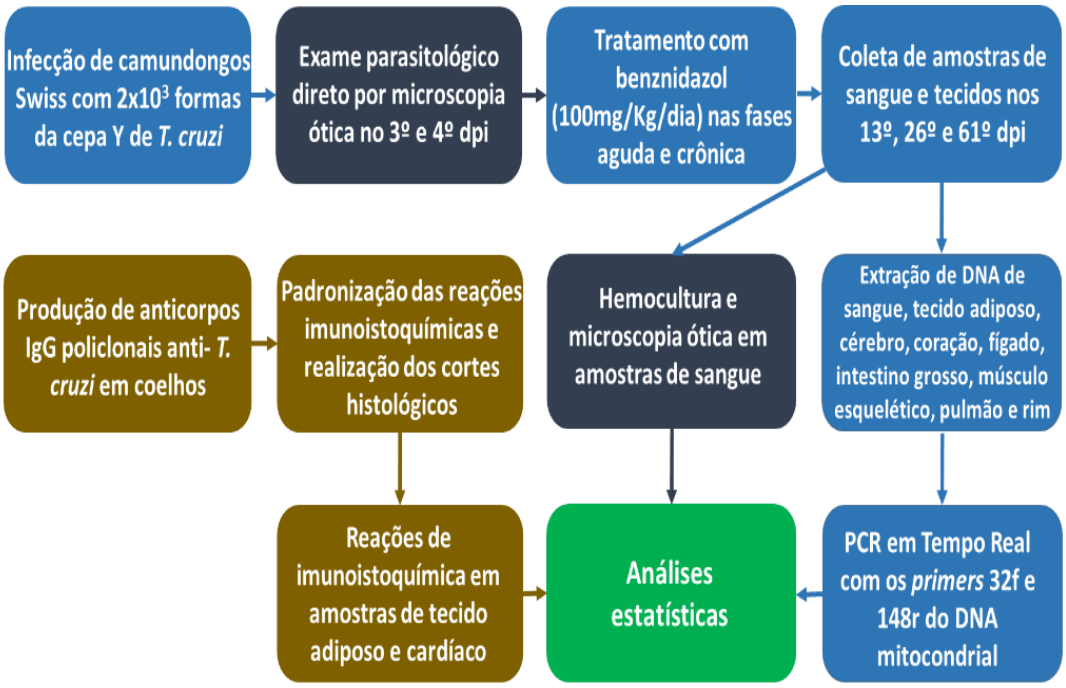



**Figura 3 -** Fluxograma dos procedimentos experimentais. As caixas em marrom indicam as etapas relacionadas à imunoistoquímica, azul claro a PCR em Tempo Real e azul escuro aos exames parasitológicos convencionais.

# 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

## 5.1 TESTES DE REFERÊNCIA (MICROSCOPIA ÓTICA E HEMOCULTURA)

Todos os animais infectados apresentaram exame microscópico direto positivo entre o 3º e 4º dias pós infecção (dpi), fato que nos permitiu iniciar o tratamento dos camundongos com benznidazol no dia seguinte (5º dpi), conforme planejado. Exceto os animais não infectados (grupo I - controle negativo), no 13º dpi, todos os exames de sangue a fresco e hemoculturas foram positivos (100%), como era esperado, por se tratar do pico da parasitemia na fase aguda.

No 26º dpi, correspondendo ao final da fase aguda, somente um resultado de microscopia ótica foi positivo (12,5%), tanto nos animais não tratados (NT) quanto nos tratados na fase aguda (TA). Neste mesmo período, duas hemoculturas foram positivas no 10º dia de leitura, uma nos animais NT e uma nos TA. No 30º dia de leitura, três hemoculturas foram positivas nos animais NT e duas nos TA, e no 60º dia de leitura, quatro hemoculturas foram positivas (50%) nos animais NT e três (37,5%) nos TA.

Os resultados de microscopia ótica positivos no 26º dpi, apesar da baixa sensibilidade (12,5%), foram indicadores da fase aguda da infecção. Cencig et al., (2011), também determinaram que a fase aguda da infecção de camundongos BALB/C infectados com $10^3$ formas da cepa Tulahuen aconteceu até o 30º dpi, enquanto foi possível detectar a parasitemia por microscopia ótica.

Ao final do experimento, no 61º dpi, apenas uma hemocultura foi positiva entre os animais NT no 30º dia de leitura, e no 60º dia de leitura obtivemos duas hemoculturas positivas (25%) em cada um dos grupos de estudo: não tratados (NT), tratados na fase aguda (TA), tratados na fase crônica (TC), e tratados nas fases aguda e crônica (TAC). Todas as microscopias óticas foram negativas ao final do experimento (Tabela 4).

Portela-Lindoso & Shikanai-Yasuda[38], em artigo de revisão sobre as técnicas de xenodiagnóstico, hemocultura e PCR, relataram que a hemocultura pode apresentar variação entre 0 e 94% de resultados positivos em amostras de sangue colhidas na fase

crônica da infecção, e que a sensibilidade deste método aumenta com o emprego do meio de cultura *Liver Infusion Tryptose* (LIT), exatamente o meio usado no presente estudo, quando se utiliza maior volume de sangue, quando são realizados mais exames, e quando se aumenta o tempo de observação das hemoculturas.

**Tabela 4** - Resultados de hemocultura e microscopia ótica nas amostras de sangue dos oito animais de cada grupo (NT, TA, TC e TAC), nos três tempos de colheita.

| Tempos de colheita | Grupos | Microscopia ótica | Tempos de leitura | | |
|---|---|---|---|---|---|
| | | | 10 dias | 30 dias | 60 dias |
| 13º dpi | NT | + | + | + | + |
| | TA | + | + | + | + |
| 26º dpi | NT | 7- 1+ | 7- 1+ | 5- 3+ | 4- 4+ |
| | TA | 7- 1+ | 7- 1+ | 6- 2+ | 5- 3+ |
| 61º dpi | NT | - | - | 7- 1+ | 6- 2+ |
| | TA | - | - | - | 6- 2+ |
| | TC | - | - | | 6- 2+ |
| | TAC | - | - | - | 6- 2+ |

Em amostras de sangue colhidas no 54ºdpi, Olivieri et al.[75], obtiveram hemocultura negativa em todos os animais (oito) tratados com posaconazol, e entre os tratados com benznidazol, 50% foram positivos. Os três animais sobreviventes do grupo não tratado apresentaram hemocultura positiva no 30ºdpi.

Martins et al.[52], encontraram positividade de 18.1% no exame de sangue a fresco, 79.1% nas hemoculturas e 97.2% na PCR realizada em sangue periférico no 60º dpi. Caldas et al.[77], encontraram resultados positivos na PCR em 100% dos animais infectados e o exame direto apresentou 16,6% de positividade no 40º dpi. A partir do 60º dpi todos os resultados do exame direto foram negativos.

Aguiar et al.[85], em amostras de pacientes com doença de Chagas crônica não encontraram nenhuma hemocultura positiva, 48,3% das nested-PCR foram positivas e 100% dos resultados foram positivos por ELISA (detecção de IgG), demonstrando a baixa sensibilidade da hemocultura em relação aos demais métodos.

Gruedling et al.[80], encontraram 37% de hemoculturas positivas em camundongos tratados na fase aguda, e 100% de positividade nos não tratados, em amostras colhidas no 65º dpi. Os resultados encontrados são semelhantes aos deste

estudo, exceto pela maior positividade que os autores encontraram nos animais não tratados, o que pode ser justificado pelo maior inóculo que utilizaram ($10^4$ formas de um isolado de linhagem TcII) em camundongos Swiss.

Teston et al.[83], colheram amostras de sangue no 55º dpi para realização de hemocultura (em duplicata), exame de sangue a fresco e PCR. Na hemocultura, encontraram 67,4% de positividade quando os parasitos eram da linhagem TcI; 100% para a linhagem TcII e 44,7% para a linhagem TcIV. Na microscopia ótica 8,7%, 94,1% e 83% dos resultados foram positivos, e utilizando a PCR, a taxa de positividade foi de 80,4%, 100% e 68,1% para as cepas TcI, TcII e TcIV, respectivamente.

Apesar de os resultados de hemocultura serem muito variáveis, a depender da linhagem de *T. cruzi* e da maneira como a técnica é realizada[38], parece haver consenso de que a hemocultura é menos sensível que a PCR para o diagnóstico da doença de Chagas[53,78,83]. Isso também pode ser evidenciado no nosso estudo, uma vez que com a qPCR foi possível detectar parasitemia em todas as amostras de sangue analisadas, em todos os grupos de animais infectados, até o 61º dpi.

## 5.2 PCR UNIVERSAL COM OS *PRIMERS* NS31 E NS41

Todas as amostras de DNA extraídas no estudo apresentaram o produto de amplificação de 651 pares de base, confirmando a qualidade do DNA extraído e a ausência de inibidores da amplificação.

## 5.3 ESTUDO PILOTO (qPCR)

Seguindo orientações da Comissão de Pesquisa do IMT-USP, inicialmente realizamos o procedimento experimental com três animais em cada grupo (NT, TA, TC e TAC), em cada um dos oito tempos de colheita de amostras estipulados inicialmente e de forma arbitrária neste estudo: 5º, 10º, 13º, 18º, 26º, 47º, 53º e 61º dpi. Os tempos 5º, 10º, 13º, 18º e 26º dpi englobaram o período de 20 dias de tratamento na fase aguda da infecção, e os tempos 47º, 53º e 61º dpi abrangeram os 20 dias de tratamento na fase crônica da infecção chagásica murina. O objetivo inicial foi estudar a cinética da infecção causada pelo *T. cruzi* em camundongos Swiss (linhagem não

isogênica), com o inóculo escolhido (2 x $10^3$ *T. cruzi* da cepa Y), e observar os benefícios do tratamento avaliados por meio da redução da carga parasitária.

Com os resultados obtidos neste estudo piloto, observamos que no 13º, 26º e 61º dpi, referentes a metade da fase aguda, final da fase aguda e fase crônica, respectivamente, foram encontradas as maiores diferenças de cargas parasitárias entre as amostras de animais tratados e não tratados. Por isso, selecionamos estes três tempos para ampliar o número de animais, aprimorar as análises estatísticas, incluindo mais cinco camundongos em cada grupo.

O pico da infecção na fase aguda foi atingido no 13º dpi, quando foi possível observar carga parasitária mais baixa nos animais tratados, conforme será apresentado a seguir no gráfico de parasitemia (Figura 4), assim como no gráfico dos órgãos (Figuras 5 a 13). No 18º dpi observamos o início da queda da carga parasitária em todos animais infectados, sinalizando que a fase aguda estaria caminhando para o final, o que foi evidenciado no 26º dpi. O 26º dpi foi o último tempo de colheita em que foi observado um exame de sangue a fresco positivo, por este motivo foi considerado representativo do final da fase aguda da infecção chagásica murina deste estudo (Tabela 4).

Nos tempos de colheita 47º e 53º dpi (resultados não apresentados), as cargas parasitárias detectadas foram baixas, tanto em sangue quanto em órgãos, indicando a fase crônica da infecção. Ademais, todos os resultados de microscopia ótica passaram a ser negativos nessa fase, e entre estes dois tempos, não houve redução dos valores das cargas parasitárias, tanto nos animais NT quanto nos tratados. Lembramos que o tratamento durante a fase crônica ainda estava em curso, e também não foram observadas diferenças significativas entre os grupos de animais tratados e não tratados. Ao final do tratamento, no 61º dpi, foi possível evidenciar queda da carga parasitária nos animais tratados, e carga menor nos tratados em relação aos não tratados, especialmente nos órgãos (Figuras 5 a 13).

O grupo I, de animais não infectados e não tratados, utilizados como controle negativo da infecção, se mantiveram livres de infecção, quando analisados por todas as metodologias utilizadas.

Todos os animais do grupo II, não infectados e tratados com benznidazol (Tabela 1), utilizados para análise de toxicidade do benznidazol, sobreviveram e

toleraram de maneira satisfatória, tanto a dosagem do medicamento de 100 mg/ Kg/ dia, quanto o processo de gavagem realizado a cada administração.

## 5.4 PARASITEMIA (PARASITOS/ mL DE SANGUE)

Com a qPCR utilizando os *primers* 32f e 148r[86] do DNA mitocondrial de *T. cruzi* foi possível detectar parasitemia em 100% dos animais analisados, isto é, em animais de todos os grupos infectados e em todos os tempos analisados. Além disso, foi possível observar a redução da quantidade de parasitos nos animais que receberam tratamento em relação aos não tratados, conforme será apresentado a seguir. Os animais não infectados (grupo I), utilizados como controle negativo no estudo, não apresentaram amplificação de DNA de *T. cruzi* em nenhuma reação de qPCR, como era esperado.

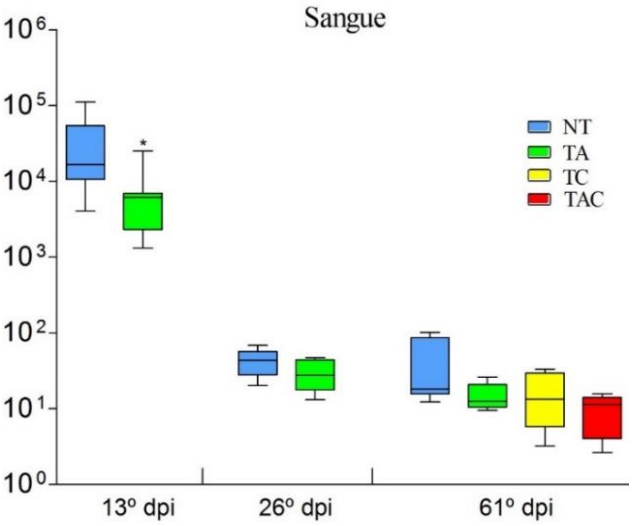
Na metade da fase aguda da infecção (13º dpi), os animais NT tiveram mediana de parasitemia de 16.630,4 parasitos/ mL de sangue e os TA apresentaram 6.153,6 parasitos/ mL, diferença estatisticamente significante ($p<0,05$), segundo o teste de Mann-Whitney, evidenciando o benefício do tratamento. Ao final da fase aguda (26º dpi), as cargas parasitárias foram de 43,2 no grupo NT e 27,5 parasitos/ mL no grupo TA, sem diferenças estatísticas (Figura 4).

Gruendling et al.[80], utilizando inóculo de $10^4$ formas de uma cepa de linhagem TcII (mesma linhagem da cepa Y) em camundongos Swiss, encontrando pico de parasitemia na fase aguda entre o 13º e 17º dpi, com carga parasitária de $5 \times 10^5$ parasitos/ mL de sangue. Os autores relataram que a fase aguda terminou entre o 26º e 28º dpi, fato também observado no presente estudo.

Considerando o pico da fase aguda, correspondendo n o modelo murino usado no presente estudo ao 13º dpi, até o final do estudo que ocorreu no 61º dpi, durante a fase crônica, a parasitemia sofreu redução de cerca de 1.000 vezes tanto nos animais NT quanto nos TA (Figura 4). A parasitemia dos animais NT durante a fase aguda é combatida naturalmente pela resposta imune do camundongo que produz anticorpos específicos contra *T. cruzi* promovendo queda da parasitemia[102].

No 61º dpi, os animais NT tiveram mediana de 18,2 parasitos/ mL de sangue, os TA apresentaram 12,4 parasitos/ mL (sem diferença estatística em relação aos NT);

os animais TC apresentaram 13,3 parasitos/ mL (sem diferença estatística em relação aos NT) e o grupo TAC 11,4 parasitos/ mL (p=0,05 em relação aos NT). Apesar de não ter havido diferenças estatísticas, existe uma tendência a obtenção de menores valores de parasitemia entre os animais tratados nas duas fases em relação aos NT, e é possível que a utilização de número maior de camundongos em cada grupo pudesse ter mostrado essas diferenças, considerando a tendência (p=0,05) na comparação entre os animais TAC e os NT. O gráfico e tabela com os valores mínimo, máximo, e a mediana da parasitemia (em parasitos/ mL) dos oito animais de cada grupo, foram apresentados na Figura 4.




| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 4.027,4 | 111.492,2 | 16.630,4 |
| NT | 26º | 20,2 | 68,2 | 43,2 |
| | 61º | 12,3 | 101,2 | 18,2 |
| | 13º | 1.305,0 | 25.297,8 | 6.153,6 |
| TA | 26º | 13,1 | 47,1 | 27,5 |
| | 61º | 9,5 | 26,2 | 12,4 |
| TC | 61º | 3,2 | 33,3 | 13,3 |
| TAC | 61º | 2,6 | 15,6 | 11,4 |

**Figura 4 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da **parasitemia** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ mL de sangue. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística de $p < 0,05$ na comparação com NT.

Martins et al.[81] mostraram, por meio de microscopia ótica, que no 30º dia após o tratamento realizado na fase aguda com a associação de benznidazol e itraconazol, em camundongos Swiss infectados com $5 \times 10^3$ parasitos da cepa Y (grupos com dez animais), os animais não tratados apresentaram 28 parasitos /mL de sangue, os animais tratados somente com benznidazol tiveram 5 parasitos/ mL, os tratados com itraconazol tiveram 7,5 parasitos/ mL, e os tratados com ambos os medicamentos apresentaram 2 parasitos/ mL, sendo este o único grupo que apresentou diferença estatística com o grupo não tratado ($p < 0,05$).

Assim como foi observado no presente estudo, outros autores que utilizaram a qPCR para a quantificação da parasitemia em modelo murino, também detectaram DNA de *T. cruzi* em 100% das amostras de sangue coletadas durante as fases aguda e crônica da infecção, demonstrando que esta técnica é extremamente sensível e adequada para o acompanhamento da parasitemia ao longo da infecção chagásica, bem como para a avaliação de tratamento[55,73,74,77,80,81,82].

Na infecção chagásica humana, seria possível que a qPCR fosse aplicada à análise de amostras de sangue de pacientes na fase crônica da infecção, uma vez que comparada aos métodos convencionais de detecção direta, apresenta maior sensibilidade, podendo detectar com maior precocidade e rapidez casos de falha terapêutica[1], ou comprovar, também de forma mais rápida, a cura, representada por resultado ou resultados negativos de PCR[46]. Em casos de qPCR negativa, devido à parasitemia inconstante na fase crônica, decorrente do próprio ciclo biológico do *T. cruzi*, que transita entre as formas amastigota nos tecidos e tripomastigota sanguíneo[104], seria provavelmente necessário testar várias amostras de sangue, de forma seriada.

Para amostras de sangue de pacientes na fase aguda[70], e de pacientes transplantados com ou sem reativação da doença[40,84], a técnica de qPCR foi 100% sensível para detecção da parasitemia. Os autores que utilizaram esta técnica para avaliação da parasitemia de pacientes chagásicos crônicos obtiveram sensibilidade de 75,3%[86], 84,14%[70], 86% em pacientes com manifestações clínicas e 70% em pacientes sem manifestações[49], além de 51,3% em indivíduos que foram doar sangue e apresentaram sorologia positiva, tendo sido posteriormente diagnosticados com manifestações clínicas da doença de Chagas, e 75,2% de indivíduos que foram doar sangue, apresentaram sorologia positiva, e não apresentaram manifestações clínicas[50].

Além disso, alguns autores também utilizaram a qPCR para quantificação da parasitemia em pacientes chagásicos crônicos, antes e depois do tratamento com benznidazol, encontrando menos resultados positivos após o tratamento[37,57]. Álvarez et al. [47], utilizando qPCR com primers do kDNA, encontraram positividade de 65% antes e 6% após o tratamento de pacientes na fase crônica. Duffy et al.[37], detectaram parasitemia variando de 0,06 e 70,29 parasitos/ mL, utilizando qPCR (nDNA) em pacientes chagásicos crônicos antes do tratamento com benznidazol. Após o

tratamento, 94% deles (29 de 31) apresentaram resultado negativo. Freitas et al.[84], com qPCR (kDNA), encontraram 5 parasitos/ mL em pacientes com doença de Chagas crônica co-infectados pelo HIV sem reativação da doença, e $10^3$ parasitos/ mL em pacientes co-infectados com reativação, associando a magnitude da parasitemia à reativação da doença de Chagas.

Ramirez et al.[70], utilizando qPCR cujo alvo foi o kDNA, obtiveram positividade em todas as onze amostras testadas de pacientes com doença de Chagas aguda, e uma das amostras apresentou resultado sorológico negativo, portanto, de acordo com as normas vigentes, este paciente seria considerado curado. Neste paciente com sorologia negativa, a parasitemia foi de 3,71 parasitos em 10 mL de sangue, ou seja, 0,371 de parasito/ mL. De um total de 145 amostras, sendo 70 de pacientes assintomáticos na fase crônica e 75 de indivíduos com sintomas cardíacos ou digestivos, a mesma técnica detectou 122 amostras positivas (sensibilidade de 84,14%). Em pacientes na fase aguda, a parasitemia média foi de 4,67 parasitos em 10 mL de sangue (0,467 de parasito/ mL), e em pacientes na fase crônica foi de 1,66 parasitos/ 10 mL (0,166 de parasito/ mL), demonstrando a alta sensibilidade desta técnica.

Álvarez et al.[47], trataram 17 pacientes chagásicos crônicos com 5 mg/ kg/ dia de benznidazol divididos em duas doses diárias, a cada cinco dias, por um total de 60 dias. Encontraram parasitemias variando entre 0,63 a 2,81 parasitos/ mL de sangue utilizando qPCR (kDNA). Somente um paciente apresentou qPCR positiva ao final do tratamento, indicando falha terapêutica.

Sabino et al.[50], encontraram em média 1,77 parasitos/ mL de sangue em pacientes com cardiomiopatia chagásica; 0,31 de parasito/ mL em indivíduos que foram doar sangue, apresentavam sorologia positiva e foram diagnosticados com cardiomiopatia chagásica; 0,05 de parasito/ mL em indivíduos que foram doar sangue, apresentavam sorologia positiva e não apresentavam manifestações clínicas; e somente resultados negativos da qPCR em doadores soronegativos. Concluíram que a detecção de *T. cruzi* por qPCR com primers do kDNA foi significativamente maior nos pacientes com a fase crônica da infecção e manifestações clínicas, e nos indivíduos que foram doar sangue, eram soropositivos, e mais tarde apresentaram manifestações clínicas, em relação aos soropositivos sem manifestações clínicas.

## 5.5 CARGA PARASITÁRIA NOS ÓRGÃOS (PARASITOS/ 50 ng DE DNA)

A partir da análise da quantificação da carga parasitária nos órgãos, realizada por qPCR com os *primers* 32f e 148r do kDNA de *T. cruzi*, foi possível observar que todos os órgãos analisados apresentaram respostas semelhantes ao tratamento com benznidazol: no 13º e no 26º dpi, os órgãos dos animais do grupo TA tiveram menor carga parasitária que os NT, e no 61º dpi, os animais TAC finalizaram o experimento com as menores cargas parasitárias do estudo, indicando a maior eficácia do tratamento administrado na fase aguda e repetido na fase crônica. Diante deste resultado seria possível sugerir que pacientes com doença de Chagas fossem tratados mais de uma vez, na fase aguda e crônica ou, alternativamente, duas ou mais vezes na fase crônica indeterminada da infecção, com a finalidade de diminuir a carga parasitária de *T. cruzi* no organismo, reduzindo assim o risco de desenvolvimento de manifestações clínicas futuras, além de episódios de reativação da doença em pacientes com algum grau de imunodeficiência (co-infectados pelo HIV, transplantados, oncológicos etc).

As diferenças estatísticas encontradas em cada órgão estão colocadas a seguir, nos gráficos e tabelas do tecido adiposo (Figura 5), baço (Figura 6), cérebro (Figura 7), coração (Figura 8), fígado (Figura 9), intestino grosso (Figura 10), músculo esquelético (Figura 11), pulmão (Figura 12) e rim (Figura 13).

No 13º dpi, referente a metade do tratamento durante a fase aguda, foram observadas menores cargas parasitárias nos animais TA em relação aos NT, no cérebro e pulmão ($p < 0,001$), assim como no fígado e intestino grosso ($p < 0,01$).

No 26º dpi, quando o tratamento da fase aguda já havia terminado (total de 20 dias de tratamento), os animais TA apresentaram diferenças estatísticas em relação ao grupo NT, no intestino grosso ($p < 0,001$); cérebro, fígado e rim ($p < 0,01$); no tecido adiposo, coração, músculo esquelético e pulmão ($p < 0,05$), comprovando o benefício do tratamento em relação a redução da carga parasitária em todos os órgãos analisados.

No 61º dpi, foi possível observar que os animais TA mantiveram menores cargas parasitárias em relação aos NT no cérebro e coração ($p < 0,05$), não havendo diferenças estatísticas em músculo esquelético e rim, evidenciando, ao menos em

relação a alguns órgãos, dentre os quais o coração (alvo da infecção chagásica com o desenvolvimento de cardiomiopatias), o benefício a longo prazo do tratamento realizado somente na fase aguda da infecção, fato também observado em amostras de coração analisadas por Caldas et al.[55].

Os animais TC apresentaram redução significativa da carga parasitária em relação aos NT, no rim ($p < 0,001$); no cérebro, coração e músculo ($p < 0,05$), apesar de não ter havido diferença no intestino, indicando que o tratamento realizado exclusivamente na fase crônica da infecção também apresentou benefícios relacionados à redução da carga parasitária na maior parte dos órgãos. Além disso, o tratamento realizado somente na fase crônica (TC) conferiu maior redução da carga parasitária em relação ao tratamento somente na fase aguda (TA) em todos os órgãos com exceção do músculo esquelético e rim. Este resultado demonstra a importância da administração do tratamento na fase crônica da infecção, corroborando as recomendações de tratamento para esta fase da infecção[1].

O tratamento com benznidazol nas duas fases da infecção (grupo TAC), realizado exclusivamente neste estudo, resultou nas menores cargas parasitárias de todo o estudo, com redução significativa em relação aos animais NT, em todos os órgãos analisados: no baço, cérebro e músculo esquelético ($p < 0,001$); no fígado, pulmão e rim ($p < 0,01$); em tecido adiposo e intestino ($p < 0,05$), sendo inclusive mais eficaz que o tratamento realizado somente na fase aguda ou somente na fase crônica.

Comparado aos animais TA, os TAC apresentaram redução da carga parasitária em tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, pulmão e rim, comparações com diferenças estatísticas muito significantes ($p < 0,001$); e também no intestino grosso e músculo esquelético ($p < 0,01$).

Em relação aos animais TC, os TAC apresentaram redução da carga parasitária em todos os órgãos (diferenças com $p < 0,001$), exceto em músculo esquelético (sem diferença estatística).

Cencig et al.[53], utilizando camundongos BALB/c e inóculo de $10^3$ formas da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, realizaram tratamento com anfotericina B lipossomal (25 mg/Kg em dias anternados, durante 12 dias, via intraperitoneal), nas fases aguda recente (início no 1º dpi), aguda (10º dpi), crônica (45º dpi) e em ambas as fases da infecção (inícios no 10º e 45º dpi), porém não realizaram comparação com o

tratamento com benznidazol, que ainda é o recomendado para tratamento da doença de Chagas[1]. Os autores observaram que o tratamento realizado na fase aguda recente conferiu menores taxas de mortalidade e cargas parasitárias nos órgãos, e além disso, que o tratamento realizado em ambas as fases não apresentou benefícios em relação ao realizado somente na fase crônica. Os autores sugerem que a associação de anfotericina B lipossomal com outros medicamentos poderia ser testada para aumentar a eficácia do tratamento.

Chamamos a atenção para o fato do tratamento realizado somente na fase aguda da infecção (TA), que por muito tempo foi o único consensualmente indicado em pacientes infectados por *T. cruzi*, não foi o que resultou nas menores cargas parasitárias em órgãos no presente estudo, tendo sido superado pelo tratamento administrado apenas na fase crônica (TC), fato também observado por Oliveira-Silva et al.[68], e principalmente pelo tratamento com benznidazol administrado em ambas as fases da infecção (TAC), esquema de tratamento relatado somente no presente estudo.

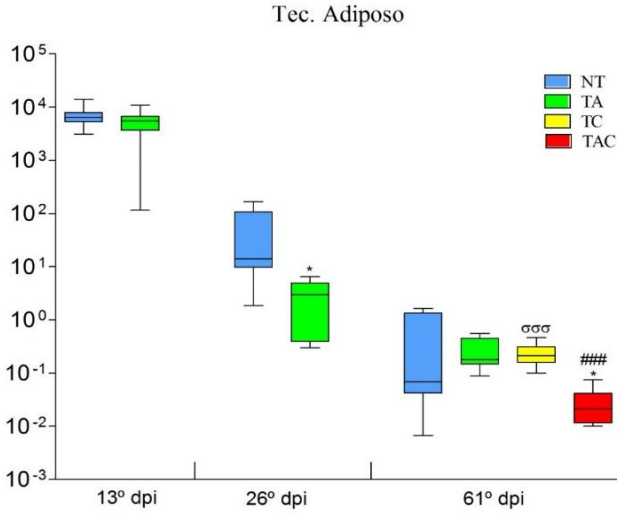
O II Consenso Brasileiro em doença de Chagas de 2015[1] não menciona o tratamento da doença de Chagas nas duas fases da infecção, porém, os resultados aqui apresentados mostram que os animais do grupo TAC, foram os que apresentaram as menores cargas parasitárias, sobretudo nos órgãos, reduzindo desta forma o número de parasitos que permanecem quiescentes em órgãos e que podem, em casos de imunossupressão, causar episódios de reativação da doença de Chagas.

Garcia et al.[59] relataram um percentual de cura de 20% em indivíduos entre 19 e 50 anos com a forma crônica indeterminada da doença de Chagas após um ciclo de tratamento. Ademais, se o tratamento na fase crônica indeterminada já foi associado a menor progressão da doença de Chagas para cardiomiopatias, o tratamento realizado sistematicamente nas duas fases da infecção (aguda e crônica), e possivelmente mais de uma vez ao longo da fase crônica, poderia auxiliar na obtenção de taxas de cura mais elevadas.

As amostras de tecido adiposo, baço, fígado e pulmão, obtidas no 61º dpi dos grupos TA e TC, tiveram cargas parasitárias mais elevadas que o grupo NT, resultado inverso ao esperado, sugerindo uma menor atividade do benznidazol nestes órgãos em relação aos demais. Além disso, é possível que, pelo fato do benznidazol ser um medicamento relativamente tóxico, e com mecanismo de ação geral (aumento de *stress*

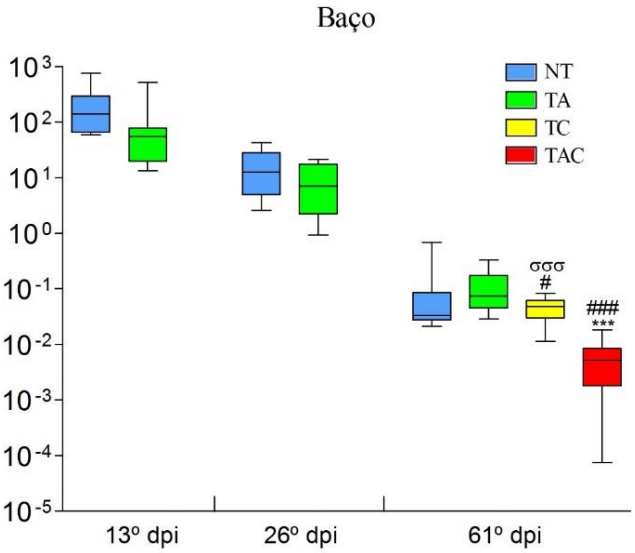
oxidativo), poderia causar um quadro de imunossupressão temporária nos animais, elevando a carga parasitária nos órgãos em que o medicamento apresente menor ação[48].

Oliveira-Silva et al.[68], avaliaram a sensibilidade de oito isolados de *T. cruzi* obtidos de pacientes chagásicos. Os isolados foram usados para infectar camundongos Swiss com inóculo de $10^4$ formas do parasito, e os animais foram tratados na fase aguda ou na fase crônica da infecção. Os autores observaram que no 120º dpi, dentre os animais tratados na fase aguda havia 95,2% de positividade, e a positividade foi de 75% nos tratados na fase crônica, segundo avaliação realizada por PCR convencional com primers do kDNA, analisando amostras de sangue dos camundongos. No presente estudo também foi observado que o tratamento realizado na fase crônica conferiu maior redução da carga parasitária que o realizado na fase aguda, no entanto, o tratamento em ambas as fases foi o que apresentou as maiores diferenças em todos os órgãos em relação aos animais NT, com $p < 0,01$. Apesar de termos feito a análise da fase crônica no 61º dpi, período mais recente que o analisado por Oliveira-Silva et al.[68] (120º dpi), encontramos positividade em todos animais, de todos os grupos, o que pode ser explicado pela técnica de qPCR ser mais sensível que a PCR convencional.



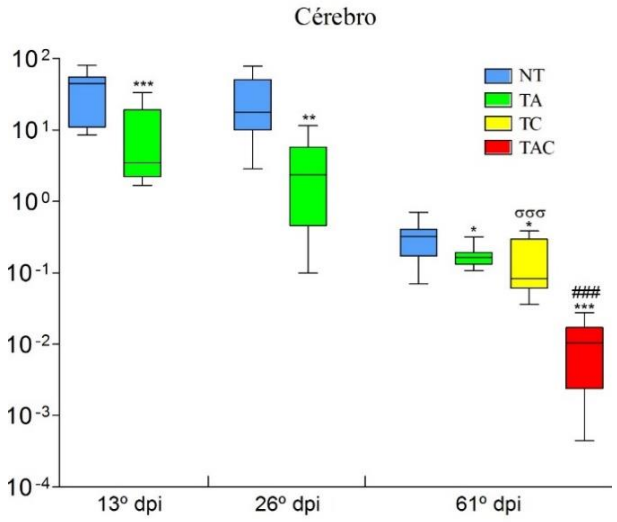

| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 3.100,8 | 13.922,0 | 6.695,0 |
| NT | 26º | 1,9 | 166,0 | 14,1 |
| | 61º | 0,04 | 1,6 | 0,1 |
| | 13º | 115,2 | 10.877,7 | 4.584,9 |
| TA | 26º | 0,3 | 6,5 | 2,8 |
| | 61º | 0,1 | 0,6 | 0,2 |
| TC | 61º | 0,1 | 0,5 | 0,2 |
| TAC | 61º | 0,01 | 0,08 | 0,02 |

**Figura 5** - Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **tecido adiposo** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.



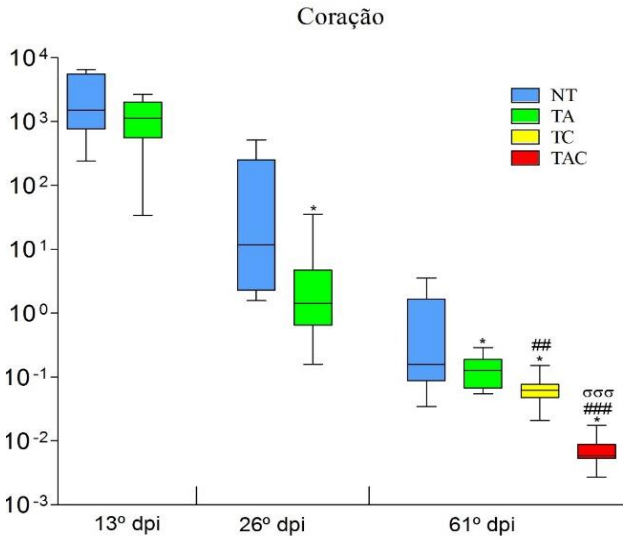

| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 58,9 | 757,9 | 191,2 |
| NT | 26º | 2,6 | 42,7 | 13,5 |
| | 61º | 0,02 | 0,7 | 0,03 |
| | 13º | 13,4 | 517,6 | 49,7 |
| TA | 26º | 0,9 | 21,4 | 8,7 |
| | 61º | 0,03 | 0,3 | 0,1 |
| TC | 61º | 0,01 | 0,1 | 0,05 |
| TAC | 61º | 0,001 | 0,02 | 0,005 |

**Figura 6** - Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **baço** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.



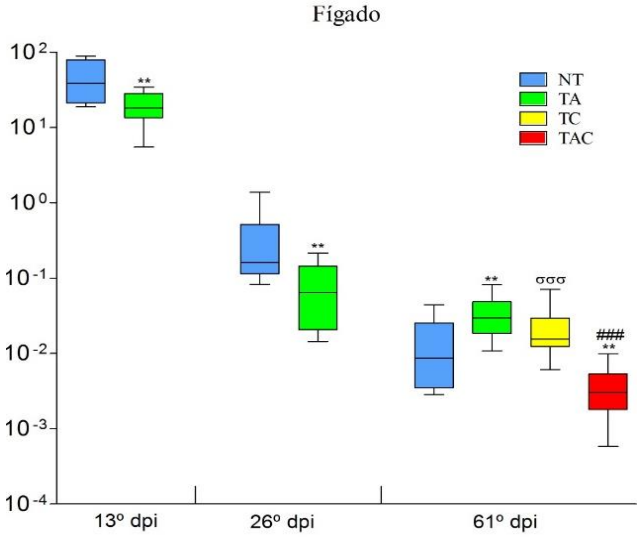

| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 8,6 | 81,3 | 45,3 |
| NT | 26º | 2,9 | 78,5 | 17,6 |
| | 61º | 0,1 | 0,7 | 0,3 |
| | 13º | 1,7 | 33,6 | 3,5 |
| TA | 26º | 0,1 | 11,5 | 2,6 |
| | 61º | 0,11 | 0,3 | 0,2 |
| TC | 61º | 0,04 | 0,4 | 0,08 |
| TAC | 61º | 0,001 | 0,03 | 0,01 |

**Figura 7 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **cérebro** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.



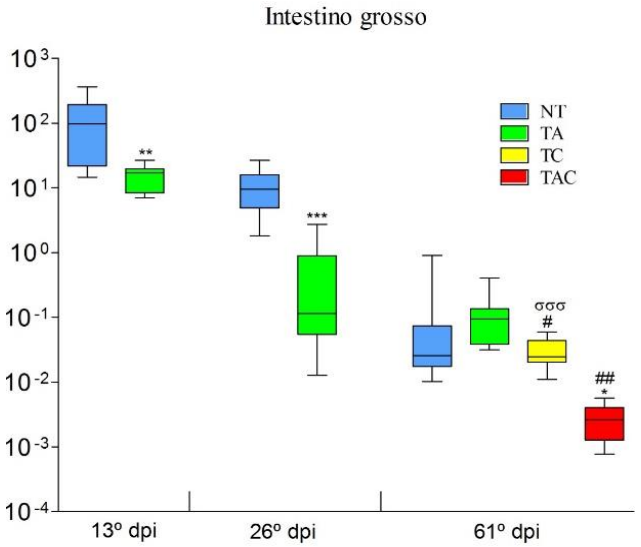

| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 239,9 | 6.458,8 | 1.714,5 |
| NT | 26º | 1,6 | 514,0 | 11,6 |
| | 61º | 0,03 | 3,5 | 0,2 |
| | 13º | 33,9 | 2.656,5 | 852,8 |
| TA | 26º | 0,2 | 35,3 | 1,4 |
| | 61º | 0,05 | 0,3 | 0,1 |
| TC | 61º | 0,02 | 0,15 | 0,06 |
| TAC | 61º | 0,003 | 0,02 | 0,01 |

**Figura 8 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **coração** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.



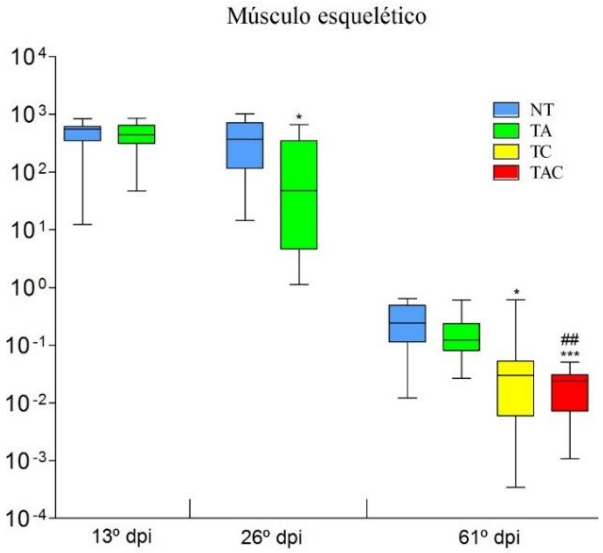

| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 18,9 | 88,6 | 54,7 |
| NT | 26º | 0,1 | 1,4 | 0,2 |
| | 61º | 0,003 | 0,04 | 0,01 |
| | 13º | 5,5 | 34,5 | 15,1 |
| TA | 26º | 0,01 | 0,21 | 0,07 |
| | 61º | 0,01 | 0,08 | 0,03 |
| TC | 61º | 0,01 | 0,07 | 0,02 |
| TAC | 61º | 0,002 | 0,01 | 0,003 |

**Figura 9 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **fígado** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < ,.01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.



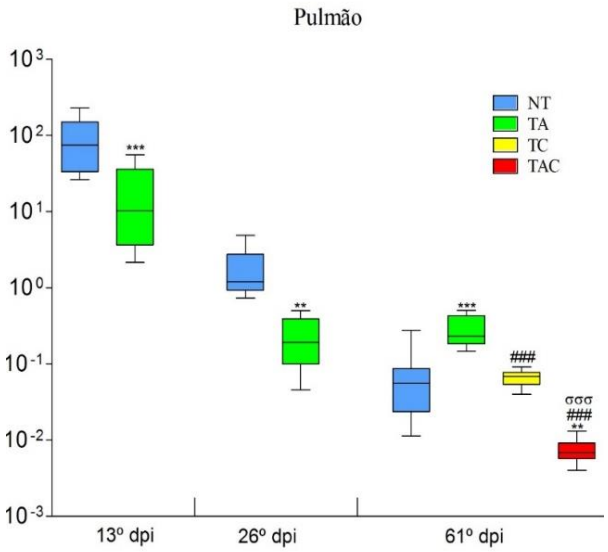

| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 14,7 | 363,8 | 121,1 |
| NT | 26º | 1,8 | 26,5 | 9,2 |
| | 61º | 0,01 | 0,9 | 0,03 |
| | 13º | 7,0 | 26,6 | 8,8 |
| TA | 26º | 0,01 | 2,7 | 0,1 |
| | 61º | 0,03 | 0,4 | 0,1 |
| TC | 61º | 0,01 | 0,1 | 0,02 |
| TAC | 61º | 0,001 | 0,01 | 0,003 |

**Figura 10 -** Valores mínimo, máximo e a mediana da carga parasitária no **intestino grosso** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.



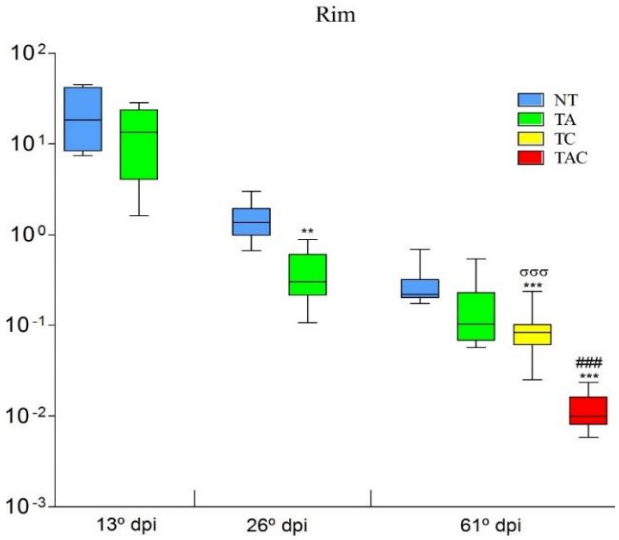

| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 12,3 | 840,2 | 526,1 |
| NT | 26º | 14,4 | 1.007,5 | 389,6 |
| | 61º | 0,01 | 0,6 | 0,2 |
| | 13º | 47,4 | 855,5 | 694,5 |
| TA | 26º | 1,1 | 663,1 | 49,4 |
| | 61º | 0,03 | 0,6 | 0,2 |
| TC | 61º | 0,0003 | 0,6 | 0,03 |
| TAC | 61º | 0,001 | 0,05 | 0,02 |

**Figura 11 -** Valores mínimo, máximo e mediana da carga parasitária no **músculo esquelético** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.




| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 26,3 | 229,0 | 52,6 |
| NT | 26º | 0,7 | 4,9 | 1,1 |
| | 61º | 0,01 | 0,3 | 0,1 |
| | 13º | 2,1 | 55,7 | 7,7 |
| TA | 26º | 0,05 | 0,5 | 0,2 |
| | 61º | 0,1 | 0,5 | 0,2 |
| TC | 61º | 0,04 | 0,1 | 0,1 |
| TAC | 61º | 0,004 | 0,01 | 0,007 |

**Figura 12 -** Valores mínimo, máximo e mediana da carga parasitária no **pulmão** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.




| Grupos | dpi | Mín. | Máx. | Mediana |
|---|---|---|---|---|
| | 13º | 7,4 | 45,0 | 13,8 |
| NT | 26º | 0,7 | 3,0 | 1,3 |
| | 61º | 0,2 | 0,7 | 0,2 |
| | 13º | 1,6 | 28,5 | 13,5 |
| TA | 26º | 0,1 | 0,9 | 0,3 |
| | 61º | 0,1 | 0,5 | 0,1 |
| TC | 61º | 0,03 | 0,2 | 0,1 |
| TAC | 61º | 0,01 | 0,02 | 0,01 |

**Figura 13 -** Valores mínimo, máximo e mediana da carga parasitária no **rim** dos oito animais de cada grupo no 13º, 26º e 61º dpi. Valores apresentados em parasitos/ 50 ng de DNA. NT - animais não tratados; TA - tratados na fase aguda; TC - tratados na fase crônica; TAC - tratados nas fases aguda e crônica. * indica diferença estatística com NT; # indica diferença estatística com TA; σ indica diferença estatística entre TC x TAC; *, #, σ $p < 0,05$; **, ##, σσ $p < 0,01$; ***, ###, σσσ $p < 0,001$.

## 5.6 COMPARAÇÃO DAS CARGAS PARASITÁRIAS ENTRE TECIDOS (PARASITOS/ 50 ng DE DNA)

Nesta etapa foi feita a comparação entre as cargas parasitárias obtidas nos tecidos dos oito animais de cada grupo, utilizando a unidade de parasitos/ 50 ng de DNA, inclusive para o sangue (cujos resultados foram anteriormente expressos em parasitos/ mL) para que a comparação pudesse ser realizada. Esta análise buscou averiguar se existe associação entre as cargas parasitárias encontradas nos diferentes órgãos, ou se existiria maior afinidade (tropismo) de *T. cruzi* por algum órgão específico, em determinada fase da infecção.

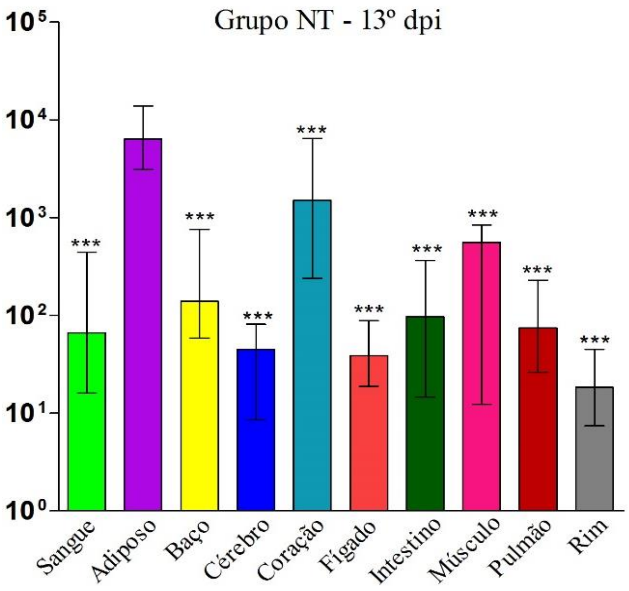
Em especial, buscamos saber se a carga parasitária do sangue estaria relacionada àquela dos demais órgãos ao longo da infecção, uma vez que o sangue é a amostra biológica de mais fácil acesso para a investigação de pacientes com doença de Chagas, independentemente da fase de infecção, e caso exista associação da parasitemia com a carga parasitária encontrada em outros tecidos, o sangue poderia ser

utilizado com muito mais segurança tanto no diagnóstico parasitológico, quanto no acompanhamento do tratamento de pacientes com doença de Chagas crônica.

Para tanto, a análise estatística foi realizada com o teste de Mann-Whitney, comparando o órgão com maior carga parasitária em relação aos demais. A apresentação aconteceu na seguinte sequência: amostras colhidas no 13º dos animais NT (Figura 14) e dos TA (Figura 15); amostras do tempo 26º dpi dos animais NT (Figura 16) e dos TA (Figura 17); e amostras do tempo 61º dos animais NT (Figura 18), TA (Figura 19), TC (Figura 20), e TAC (Figura 21).

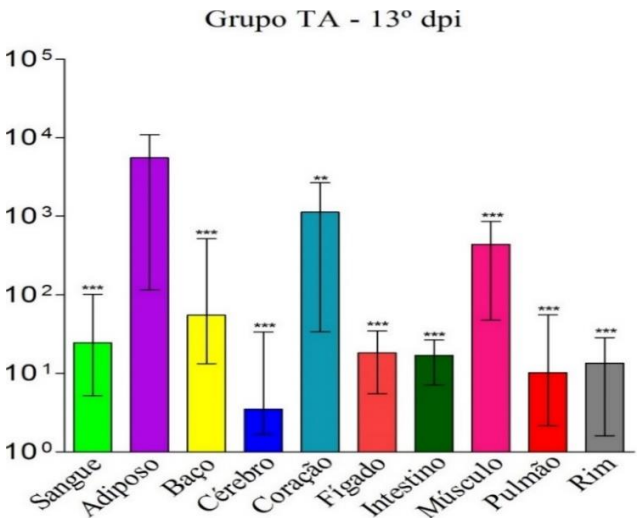
Na Figura 14, referente as amostras colhidas no 13º dpi dos animais NT, o tecido adiposo foi o que apresentou a maior carga parasitária, com mediana de 6.695 parasitos/ 50 ng de DNA. O coração foi o segundo mais parasitado com 1.714,5 parasitos, seguido pelo músculo esquelético com 526,1; baço com 191,2 e intestino grosso com 121,1 parasitos/ 50 ng de DNA. No fígado com 54,7; pulmão com 52,6, cérebro com 45,3 e rim com 13,8 parasitos/ 50 ng de DNA foram encontradas as menores cargas parasitárias. Todos os tecidos apresentaram diferenças estatísticas em relação ao tecido adiposo ($p < 0,001$), indicando que nesta fase da infecção, existe predileção de *T. cruzi* por este tecido.

No mesmo tempo de coleta (13º dpi), entre os animais tratados (Figura 15), a disposição dos quatro primeiros órgãos mais parasitados permaneceu igual a dos animais não tratados. O tecido adiposo se manteve como o mais parasitado, apresentando diferenças estatísticas ($p < 0,01$) em relação aos demais tecidos. O sangue, que era o sexto colocado com maior carga parasitária nos animais NT, passou a ser o quinto entre os TA, e o intestino grosso ficou em quinto lugar dentre os animais NT e nos TA ficou na oitava posição.




| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Adiposo | 6.695,0 | |
| 2º | Coração | 1.714,5 | 0,0001 |
| 3º | Músculo | 526,1 | 2,6 E-06 |
| 4º | Baço | 191,2 | 1,8 E-06 |
| 5º | Intestino | 121,1 | 1,6 E-06 |
| 6º | Sangue | 64,1 | 1,4 E-06 |
| 7º | Fígado | 54,7 | 1,4 E-06 |
| 8º | Pulmão | 52,6 | 1,5 E-06 |
| 9º | Cérebro | 45,3 | 1,4 E-06 |
| 10º | Rim | 13,8 | 1,3 E-06 |

**Figura 14 -** Comparação das medianas de carga parasitária encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **NT no 13º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

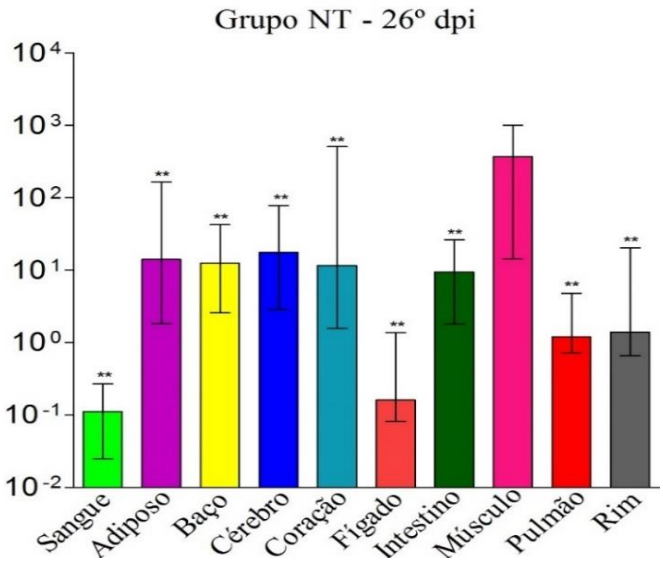



| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Adiposo | 4.584,9 | |
| 2º | Coração | 852,8 | 0,0013 |
| 3º | Músculo | 694,5 | 0,0003 |
| 4º | Baço | 49,7 | 0,0002 |
| 5º | Sangue | 24,5 | 0,0001 |
| 6º | Fígado | 15,1 | 0,0001 |
| 7º | Rim | 13,5 | 0,0001 |
| 8º | Intestino | 8,8 | 0,0001 |
| 9º | Pulmão | 7,7 | 0,0001 |
| 10º | Cérebro | 3,5 | 0,0001 |

**Figura 15 -** Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TA no 13º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

No 26º dpi, o músculo esquelético foi o mais parasitado, tanto nos animais NT (Figura 16) com 389,9 parasitos/ 50 ng de DNA, quanto nos TA (Figura 17) com 49,4 parasitos/ 50 ng de DNA. Em ambos os grupos, os demais tecidos apresentaram diferenças estatísticas em relação ao músculo esquelético, demonstrando que ele é um importante alvo da infecção chagásica neste momento da infecção, fato também observado por Cencig et al., 2011. O tecido adiposo esteve na terceira colocação em ambos os grupos no 26º dpi, com 14,1 parasitos/ 50 ng de DNA nos NT e 2,8 nos TA. O sangue, foi um dos alvos com menor carga parasitária nesta fase, correspondendo a expectativa por se tratar do final da fase aguda, quando se espera que a parasitemia seja muito baixa e se torne indetectável pelos métodos parasitológicos convencionais.

Cencig et al.[53], encontraram no 21º dpi no coração, baço, músculo esquelético e tecido adiposo resultados variando entre 6.220 e 108.000 parasitos/ 50 ng de DNA, enquanto no fígado a carga parasitária foi mais baixa com 85,9 parasitos/ 50 ng de DNA. Para os autores, o músculo esquelético apresentou maiores cargas parasitárias que os demais órgãos dos animais NT, tanto na fase aguda quanto na crônica. No presente estudo, no 26º dpi a maior carga parasitária entre os animais não tratados foi no músculo esquelético com 389,6 parasitos/ 50 ng de DNA e a menor no fígado com 0,2 parasito/ 50 ng de DNA, resultados semelhantes aos do estudo de Cencig et al., 2011, apesar de divergirem em relação ao número de parasitos encontrados, o que pode ser justificado pelos diferentes modelos animais e inóculos utilizados.

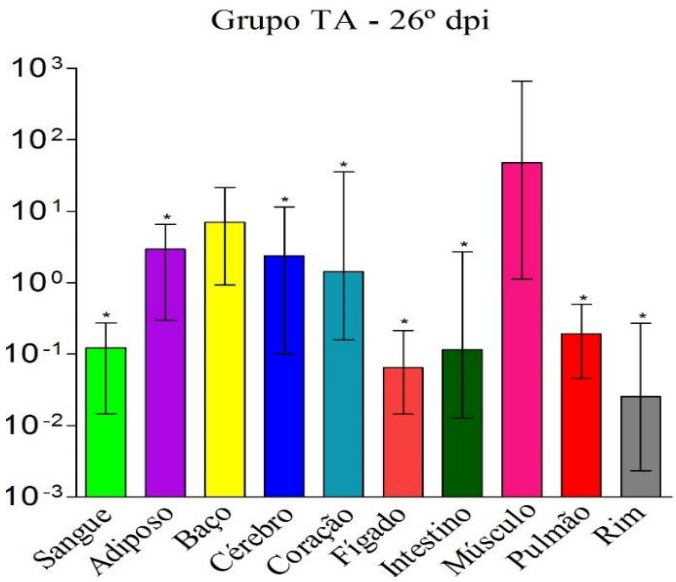



| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Músculo | 389,6 | |
| 2º | Cérebro | 17,6 | 0,0027 |
| 3º | Adiposo | 14,1 | 0,0035 |
| 4º | Baço | 13,5 | 0,0021 |
| 5º | Coração | 11,6 | 0,0140 |
| 6º | Intestino | 9,2 | 0,0019 |
| 7º | Rim | 1,3 | 0,0016 |
| 8º | Pulmão | 1,1 | 0,0016 |
| 9º | Fígado | 0,2 | 0,0016 |
| 10º | Sangue | 0,1 | 0,0016 |

**Figura 16** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **NT no 26º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

No 61º dpi, entre os animais NT (Figura 18), o cérebro foi o órgão mais parasitado com 0,28 parasito/ 50 ng de DNA, seguido pelo músculo esquelético, rim, coração e tecido adiposo, que não apresentaram diferenças estatísticas com o cérebro, indicando que a infecção pelo *T. cruzi* é equivalente nestes órgãos/tecidos. Nos animais NT apesar do sangue, que foi o sétimo colocado com maior carga parasitária, ter apresentado diferenças estatísticas com o cérebro, não apresentou diferenças com o coração (quarta posição), tecido adiposo (quinta posição) e pulmão (sexta posição), assim como com o intestino grosso (oitavo), baço (nono) e fígado (décimo lugar, com a menor carga parasitária) que tiveram cargas parasitárias mais baixas que o sangue (Figura 18).

No 61º dpi, nos animais TA (Figura 19), o tecido adiposo foi o que apresentou a maior carga parasitária, seguido do pulmão e músculo, sem diferenças estatísticas. O tecido adiposo que esteve na quinta colocação entre os animais NT, passou a ser o mais parasitado nos animais TA, sugerindo que o benznidazol apresente menor efeito neste órgão/tecido em relação aos demais.




| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Músculo | 49,4 | |
| 2º | Baço | 8,7 | 0,0170 |
| 3º | Adiposo | 2,8 | 0,0137 |
| 4º | Cérebro | 2,6 | 0,0139 |
| 5º | Rim | 0,26 | 0,0126 |
| 6º | Pulmão | 0,2 | 0,0125 |
| 7º | Coração | 1,4 | 0,0150 |
| 8º | Intestino | 0,1 | 0,0126 |
| 9º | Sangue | 0,1 | 0,0124 |
| 10º | Fígado | 0,07 | 0,0124 |

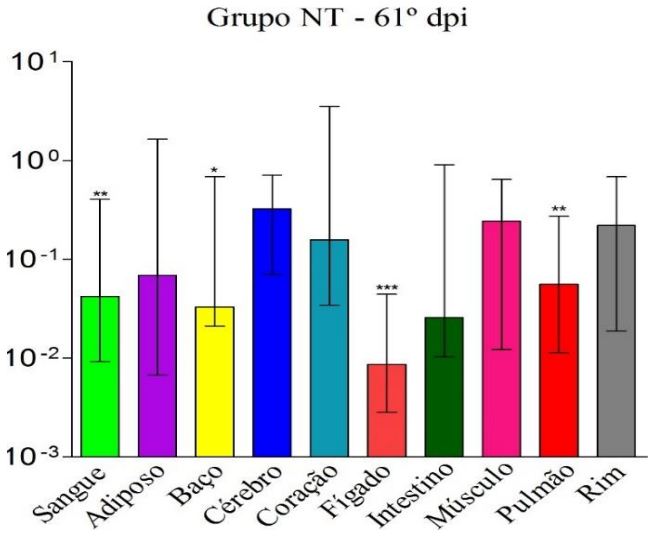
**Figura 17** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TA no 26º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Ao final do experimento, na fase crônica (61º dpi), nos animais TC (Figura 20), o tecido adiposo também foi o mais parasitado com 0,2 de parasito/ 50 ng de DNA, seguido pelo cérebro, sem diferenças estatísticas. Nos animais TAC (Figura 21), o sangue foi o material biológico com a maior carga parasitária, com 0,05 de parasito/ 50 ng de DNA, apresentando diferenças estatísticas, inclusive em relação ao segundo local mais parasitado que foi o tecido adiposo, indicando que na situação de tratamento em ambas as fases, houve maior redução da carga parasitária nos órgãos do que no sangue. Desta forma, seria possível afirmar que o sangue é de fato um bom marcador biológico para o diagnóstico e o acompanhamento de pacientes tratados na fase crônica da infecção pelo fato de apresentar cargas parasitárias altas em relação aos órgãos, e ainda, que o efeito de redução da carga parasitária devido ao tratamento ocorreu de forma mais acentuada em órgãos do que em sangue, fato que pode ser considerado benéfico aos pacientes chagásicos crônicos pois haverá menor número de parasitos em órgãos que poderão sofrer reativação.

Cencig et al.[53] encontraram na fase crônica da infecção (74º dpi) maior carga parasitária no sangue dos animais tratados com anfotericina lipossomal B em relação aos animais não tratados, resultado inverso ao esperado. Os autores atribuíram o resultado à lise dos parasitos instalados nos tecidos, causada pelo tratamento com a anfotericina lipossomal B, acarretando aumento da quantidade de DNA de *T. cruzi* na corrente sanguínea. No presente estudo, também poderíamos inferir que o tratamento com benznidazol promoveria a lise dos parasitos instalados nos tecidos, elevando a carga parasitária no sangue (parasitemia), fato observado pela comparação da carga parasitária entre o sangue e os órgãos dos animais TAC (Figura 21).

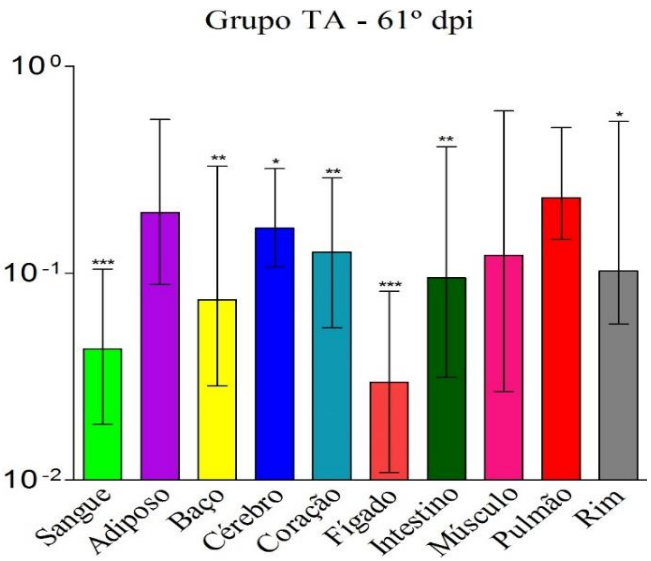
No presente estudo, foi observado que a parasitemia dos animais NT no 13º dpi, foi de 64,1 parasitos/ 50 ng de DNA, e nos órgãos de 1.046 parasitos/ 50 ng de DNA (Figura 14). Entre os animais NT, no tempo 61ºdpi, havia 0,05 de parasito/ 50 ng de DNA em sangue e em média 0,12 parasito/ 50 ng de DNA nos órgãos (Figura 18), indicando que no sangue dos animais NT, da fase aguda para a crônica, houve uma redução da carga parasitária de 1.282 vezes, e nos órgãos essa redução foi de 8.716 vezes. Entre os animais TA, no 13º dpi (Figura 15), a parasitemia foi de 24,5 parasitos/ 50 ng de DNA, e média de 692,3 parasitos/ 50 ng de DNA nos órgãos. No 61ºdpi, nos animais TA (Figura 19) a parasitemia foi de 0,04, e 0,13 de parasito/ 50 ng de DNA nos órgãos, indicando redução de 612 vezes no sangue e 5.325 vezes nos órgãos. Desta maneira, podemos observar que a queda da carga parasitária, observada em sangue da fase aguda para a crônica, também acontece nos órgãos, e que, além disso, nos órgãos a redução foi ainda maior. Desta forma, seria possível inferir que a parasitemia pode e deve ser utilizada para se chegar ao diagnóstico e para monitorar o tratamento etiológico da doença de Chagas por meio da qPCR, inclusive na fase crônica da infecção.

Amostras de sangue vem sendo utilizadas para avaliação da presença de *T. cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da infecção[37,40,47,49,50,68,70,84,86]. Caldas et al.[55, 77] associaram a carga parasitária de sangue e tecido cardíaco na fase crônica da infecção. No presente estudo, essa mesma associação foi observada, uma vez que a carga parasitária no 61º dpi no grupo de animais NT (Figura 18) encontrada no coração (0,16 de parasito/ 50 ng de DNA) foi comparável a encontrada em sangue (0,05 de parasito /50ng de DNA).



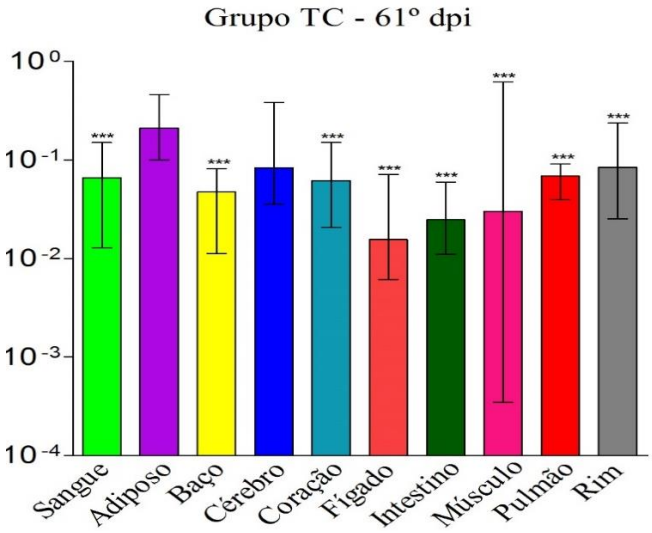

| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Cérebro | 0,28 | |
| 2º | Músculo | 0,24 | 0,8663 |
| 3º | Rim | 0,22 | 0,9332 |
| 4º | Coração | 0,16 | 0,0989 |
| 5º | Adiposo | 0,09 | 0,2812 |
| 6º | Pulmão | 0,06 | 0,0016 |
| 7º | Sangue | 0,05 | 0,0077 |
| 8º | Intestino | 0,03 | 0,0599 |
| 9º | Baço | 0,03 | 0,0426 |
| 10º | Fígado | 0,01 | 0,0002 |

**Figura 18** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **NT no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.



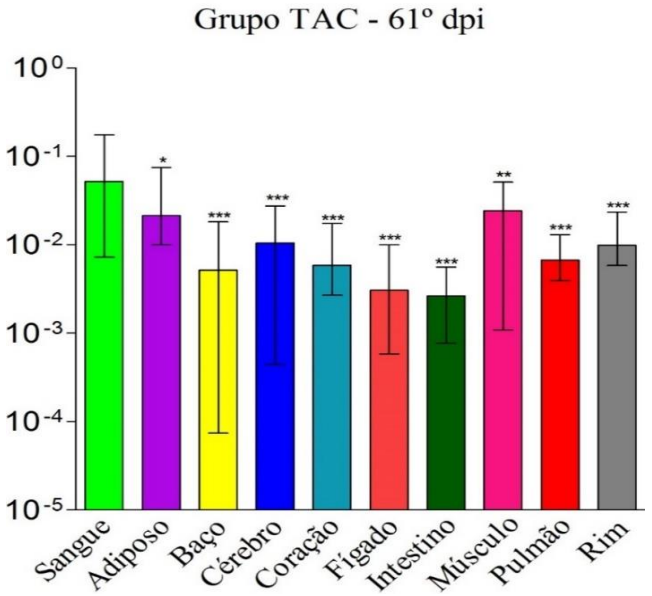

| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Adiposo | 0,24 | |
| 2º | Pulmão | 0,19 | 0,8745 |
| 3º | Músculo | 0,16 | 0,1744 |
| 4º | Cérebro | 0,16 | 0,0342 |
| 5º | Coração | 0,14 | 0,0078 |
| 6º | Rim | 0,10 | 0,0489 |
| 7º | Intestino | 0,10 | 0,0033 |
| 8º | Baço | 0,07 | 0,0021 |
| 9º | Sangue | 0,04 | 0,0001 |
| 10º | Fígado | 0,03 | 9,9 E-5 |

**Figura 19** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TA no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p <0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.




| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Adiposo | 0,20 | |
| 2º | Cérebro | 0,08 | 0,0920 |
| 3º | Rim | 0,08 | 0,0008 |
| 4º | Pulmão | 0,07 | 0,0001 |
| 5º | Sangue | 0,06 | 0,0002 |
| 6º | Coração | 0,06 | 0,0001 |
| 7º | Baço | 0,05 | 5,5E-5 |
| 8º | Músculo | 0,03 | 0,0322 |
| 9º | Intestino | 0,02 | 2,2E-5 |
| 10º | Fígado | 0,01 | 2,2E-5 |

**Figura 20** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TC no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.




| Clas. | Órgãos | Mediana | Valor de p |
|---|---|---|---|
| 1º | Sangue | 0,055 | |
| 2º | Adiposo | 0,023 | 0,0101 |
| 3º | Músculo | 0,021 | 0,0034 |
| 4º | Cérebro | 0,010 | 0,0004 |
| 5º | Rim | 0,010 | 0,0005 |
| 6º | Pulmão | 0,007 | 0,0002 |
| 7º | Coração | 0,006 | 0,0002 |
| 8º | Baço | 0,005 | 0,0002 |
| 9º | Fígado | 0,003 | 0,0001 |
| 10º | Intestino | 0,003 | 0,0001 |

**Figura 21** - Comparação da mediana das cargas parasitárias encontradas no sangue, tecido adiposo, baço, cérebro, coração, fígado, intestino, músculo, pulmão e rim. Classificação dos tecidos em ordem decrescente e comparação estatística com o tecido de maior carga parasitária dos oito animais **TCA no 61º dpi**. Resultados expressos em parasitos/ 50 ng de DNA. * indica diferença estatística com o tecido de maior carga parasitária (tecido adiposo). * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

O tecido cardíaco, que constitui um dos principais alvos de *T. cruzi* no organismo, foi o segundo mais parasitado no 13º dpi nos animais NT (Figura 14) e nos animais TA (Gráfico 15). No 61º dpi, entre os animais NT (Gráfico 18), ficou na quarta colocação, porém sem apresentar diferenças estatísticas com o cérebro, que foi o órgão mais parasitado. Entre os animais TAC (Gráfico 21), este órgão alvo de *T. cruzi* caiu para a sétima posição, com diferença estatística com o sangue (tmaterial biológico mais parasitado), indicando uma ação efetiva do benznidazol na redução da carga parasitária em tecido cardíaco. Alguns estudos indicam que a carga parasitária está diretamente relacionada ao desenvolvimento de manifestações clínicas, portanto, a redução da carga parasitária no coração contribuiria para prevenir ou reduzir a incidência de complicações cardíacas[1,49,50,54].

No 61º dpi, entre os animais NT (Figura 18), que representam o estágio crônico da infecção que seguiu seu curso natural, sem intervenções, o músculo esquelético, rim, coração e tecido adiposo não apresentaram diferenças estatísticas com o cérebro, que foi o mais parasitado, indicando que as cargas parasitárias desses tecidos seriam equivalentes, e que, em especial o tecido adiposo, poderia ser utilizado como material biológico a ser testado para a pesquisa de *T. cruzi*, uma vez que ele é representativo do que ocorre no coração e em outros órgãos (cérebro, músculo esquelético e rim), e sua obtenção seria mais fácil e menos invasiva em pacientes, sobretudo naqueles com algum grau de instabilidade hemodinâmica e cardíaca.

O tecido adiposo foi o que apresentou a maior carga parasitária com mais frequência (mais tempos de colheita) ao longo da infecção. Esteve em primeiro lugar no 13º dpi, tanto nos animais NT (Figura 14) quanto nos TA (Gráfico 15), e no 61º dpi nos TA (Gráfico 19) e TC (Gráfico 20). No 61º dpi, nos animais NT (Figura 18), o tecido adiposo ficou em quinto lugar, sem apresentar diferença estatística com o cérebro (tecido mais parasitado), e foi o segundo mais parasitado depois do sangue nos animais TAC no 61º dpi (Figura 21), porém sem apresentar diferença estatística, indicando que o tecido adiposo poderia constituir um local estratégico para a manutenção e perpetuação de *T. cruzi* no organismo do hospedeiro, mesmo após tratamento com benznidazol.

Nagajyothi et al.[89], detectaram cargas parasitárias comparáveis em tecido adiposo e músculo cardíaco por qPCR com *primers* da sequência TCZ (DNA nuclear), 300 dias após a infecção de camundongos CD-1 com 5 x $10^4$ formas da cepa Brasil de *T. cruzi*. Esses resultados são semelhantes aos do presente estudo para as amostras colhidas no 61º dpi, nos animais NT (Gráfico 13), nos quais o tecido adiposo e o cardíaco não apresentaram diferenças estatísticas, enquanto nos animais TAC (Figura 21) o sangue e tecido adiposo foram os mais parasitados, porém novamente, sem diferenças estatísticas.

Castro-Sesquen et al.[110], estudaram morte celular (apoptose) e necrose durante manifestações cardíacas decorrentes da infecção por *T. cruzi* em porcos cronicamente infectados. Além das células do miocárdio, os autores encontraram resultados semelhantes de morte celular em linfócitos, células endoteliais e adipócitos, sugerindo que o tecido adiposo poderia ser utilizado como marcador de morte celular na infecção chagásica.

De acordo com os resultados obtidos no presente estudo, e também observados pelos autores citados acima, sugere-se que o tecido adiposo poderia ser utilizado em pacientes chagásicos crônicos para a avaliação da resposta ao tratamento. A biópsia deste tecido poderia ser realizada com maior facilidade e menor risco ao paciente por ser um procedimento mais simples e menos invasivo que a biópsia de micárdio, requerendo somente 25 mg de tecido para a extração de DNA. Normalmente, as biópsias de tecido adiposo são realizadas por incisão cirúrgica infra-umbilical e retirada de amostra do tecido adiposo subcutâneo abdominal, ou por técnica conhecida como *punch* dermatológico, técnica pouco invasiva que já foi empregada na análise de material retirado da região lombar de pacientes diabéticos[111].

Neste estudo foi observado que o músculo esquelético, no 13º dpi, ocupou o terceiro lugar tanto nos NT (Figura 14) quanto no TA (Figura 15). No 26º dpi, foi o mais parasitado em ambos os grupos de animais (Figuras 16 e 17), e no 61º dpi, ocupou a segunda posição nos animais NT (Figura 18), e terceira nos TA (Figura 19) e TAC (Figura 21). Estes dados colocam o músculo esquelético como importante reservatório de *T. cruzi* no organismo, assim como também foi observado por Cummings & Tarlenton[71] e Cencig et al.[53].

Entre os órgãos menos parasitados, que estiveram mais vezes nas três últimas colocações, estão o baço e o fígado. Em especial, o fígado foi o tecido com menor carga parasitária no 26º dpi nos animais TA (Figura 16), e no 61º dpi nos grupos NT (Figura 18), TA (Figura 19) e TC (Figura 20). Neste mesmo tempo de colheita, nos animais TAC (Figura 21), o fígado foi o segundo local com menor carga parasitária, ficando atrás somente do intestino grosso, o tecido com menor carga parasitária dentre todos. Guarner et al.[112]; Cencig et al.[53] e Gruendling et al.[80] também observaram que o fígado apresentou carga parasitária mais baixa em relação a outros órgãos.

## 5.7 PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*T. CRUZI*

Os resultados referentes à colheita de sangue dos coelhos, teste e purificação dos anticorpos estão apresentados no Apêndice 3.

## 5.8 PADRONIZAÇÃO DAS REAÇÕES DE IMUNOISTOQUÍMICA

Após a confecção de cortes histológicos e coloração com hematoxilina e eosina, para certificação da qualidade dos cortes histológicos, foi realizada a padronização das reações de imunoistoquímica, conforme protocolo descrito no Apêndice 2. Foram testadas diferentes diluições do soro (1/750, 1/500 e 1/250), e selecionada a diluição de 1/250. Assim, pudemos evidenciar as formas de *T.cruzi* presentes em tecidos, tanto isoladas, quanto em ninhos de amastigotas (Figura 22).

Utilizamos um método quantitativo de análise no qual se calcula a área de *T. cruzi* (delimitada com o auxílio de *software* Axio Vision), dividida pela área total do campo analisado. O resultado expressa a porcentagem da área ocupada por *T. cruzi* no tecido[49].

A Figura 23 exemplifica o cálculo da área de *T. cruzi* e da área total de um campo analisado. A área total de *T. cruzi* no campo é (721,69 + 880,1 = 1.601,79 $\mu m^2$), e a área total do campo analisada 37.290,53 $\mu m^2$. A porcentagem de área de *T. cruzi* deste campo = 1.609,79 x 100/ 37.290,53 = 4,32%. Para obtenção do resultado final de cada amostra, foram consideradas a área ocupada por *T. cruzi* e a área total de tecido em 20 campos de cada um dos quatro cortes histológicos realizados.

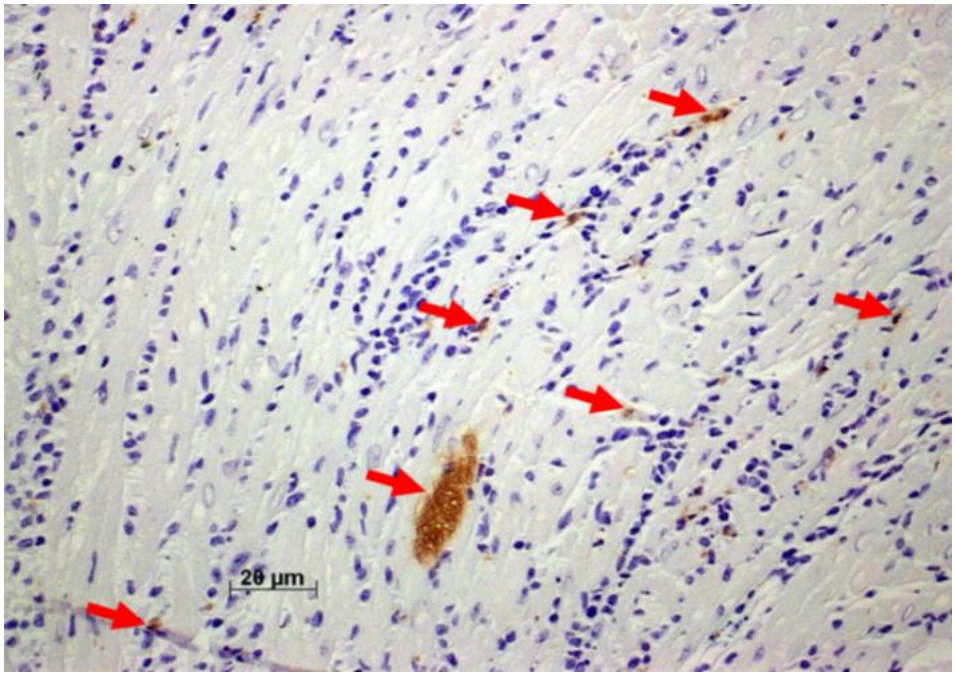



**Figura 22 -** Reação de imunoistoquímica em tecido cardíaco de animal não tratado, coletado no 13º dia após a infecção experimental. As setas indicam a marcação de um ninho de amastigotas e de algumas formas isoladas de *T. cruzi*. Microscopia ótica em aumento de 40 x.

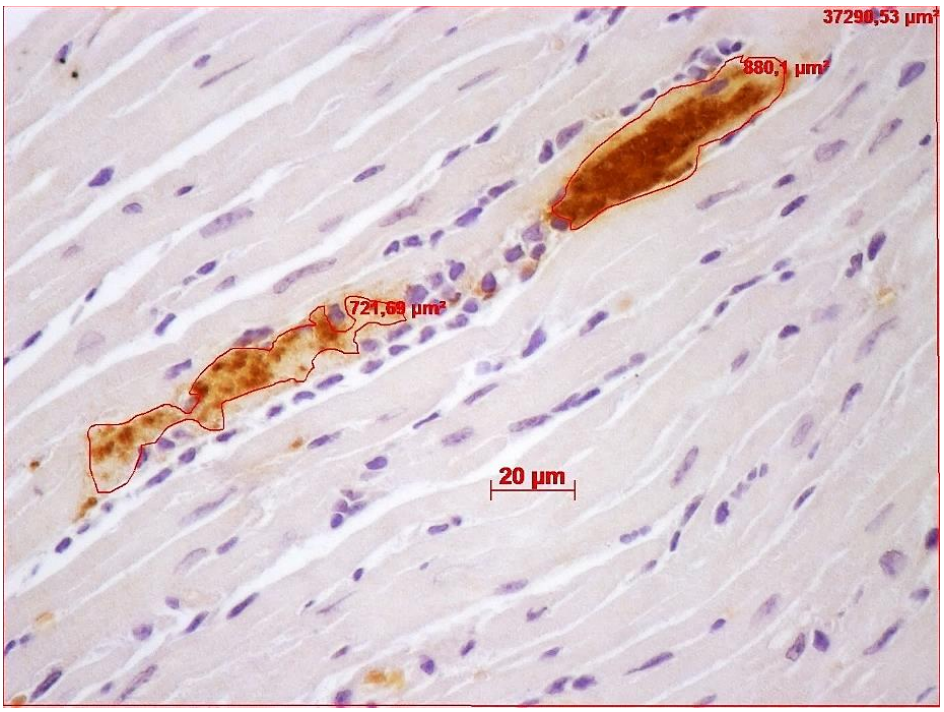



**Figura 23 -** Demonstração da marcação da área ocupada pelo *T. cruzi*, e área total de um campo de corte histológico de tecido cardíaco, observado por microscopia ótica em aumento de 40 x. Marcação realizada por imunoistoquímica.

## 5.9 IMUNOISTOQUÍMICA DOS TECIDOS ADIPOSO E CARDÍACO (ÁREA DE *T. CRUZI*, PORCENTAGEM)

Nos tecidos adiposo (Figura 26) e cardíaco (Figura 27) dos animais NT no 13º dpi foram visualizados ninhos de amastigota em grande quantidade (cerca de oito ninhos em 20 campos). Raros ninhos de amastigotas foram observados no 26º dpi (dois ninhos em 20 campos), e na fase crônica (61º dpi), predominaram as formas de *T. cruzi* isoladas e dispersas no tecido (nenhum ou apenas um ninho de amastigota em 20 campos). Em todos os tempos de colheita, especialmente na fase crônica, foram detectadas formas dispersas de *T. cruzi* nos tecidos, além de ninhos de amastigota. Resultados semelhantes foram encontrados por Guarner et al.[112] em tecido adiposo, cardíaco, pulmão, cérebro, fígado, estômago, intestino.

Em amostras de tecido cardíaco (Figura 25) colhidas no 13º dpi, a mediana das porcentagens de área de *T. cruzi* foi de 0,6% do tecido nos animais NT e 0,4% nos animais TA, sem diferenças estatísticas (Tabela 5). No mesmo tempo de colheita, para o tecido adiposo (Figura 24), os animais NT apresentaram mediana de 1,3% e os tratados de 1,0% de *T. cruzi* no tecido, sem diferenças estatísticas. No 26º dpi, tanto no tecido cardíaco quanto no adiposo, os animais NT tiveram 0,08% da área do tecido ocupada por *T. cruzi*, enquanto nos animais TA essa área foi de 0,01%, ambos com $p < 0,05$. No 61º dpi, para o tecido cardíaco, os animais NT apresentaram 0,006% de área ocupada pelos parasitos, os TA tiveram 0,003%, os TC 0,002%, sem diferenças estatísticas, enquanto os animais TAC apresentaram 0,0008% com diferença estatisticamente significante em relação aos animais NT ($p = 0,02$). No tecido adiposo, os valores para os respectivos grupos no 61º dpi foram: NT- 0,005%, TA- 0,006%, TC-0,004% e TAC-0,0006%, sendo que somente os TAC apresentaram diferença estatística em relação aos NT ($p = 0,04$).

Da fase aguda para a fase crônica houve quantificação 100 vezes menor de *T. cruzi* nos tecidos segundo a técnica de imunoistoquímica, que diferiu do encontrado com a qPCR (redução de 1.000 vezes), possivelmente pelo fato da técnica molecular ser mais sensível. No entanto, por meio da técnica de imunoistoquímica foram obtidos resultados que concordam com os obtidos por qPCR, demonstrando menor presença de parasitos nos animais tratados em relação aos não tratados, em todos as etapas do estudo.

**Tabela 5 -** Mediana dos resultados (em porcentagem de *T. cruzi* no tecido) das amostras de tecido adiposo e tecido cardíaco dos oito animais de cada grupo, analisados por imunoistoquímica nos três tempos da infecção chagásica.

| Colheita (dpi) | 13º | | 26º | | 61º | | | |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Grupos | NT | TA | NT | TA | NT | TA | TC | TAC |
| Tec. adiposo | 1,3 | 1,0 | 0,08 | 0,01 | 0,005 | 0,006 | 0,004 | 0,0006 |
| Tec. cardíaco | 0,6 | 0,4 | 0,08 | 0,01 | 0,006 | 0,003 | 0,002 | 0,0008 |

Os resultados das reações de imunoistoquímica obtidos em tecido adiposo e cardíaco foram comparados com o teste de Mann Whitney, de acordo com cada grupo de estudo e tempo de colheita, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os dois tecidos analisados, indicando que a carga parasitária é comparável nos dois tecidos, portanto o tecido adiposo poderia ser utilizado como marcador da carga parasitária de *T. cruzi* presente no coração.

Nagajyothi et al.[72], realizaram infecção de camundongos CD-1 com 5 x $10^4$ formas da cepa Brasil de *T. cruzi* para avaliação da carga parasitária em tecido adiposo por meio de imunoistoquímica e qPCR. Observaram que houve presença significativamente maior do parasito em tecido adiposo em relação ao coração e baço na fase aguda da infecção. No presente trabalho, também observamos, que no 13º dpi, o tecido adiposo apresentou maior carga parasitária (com diferenças significativas) em relação aos demais tecidos estudados, tanto no grupo de animais NT com 7.085,0 parasitos/ 50 ng de DNA (Figura 14) quanto nos TA com 5.363,4 parasitos/ 50 ng de DNA (Figura 15). Em ambos os casos foi possível observar que os resultados de imunoistoquímica foram concordantes com os de qPCR.

A seguir foram apresentados os gráficos (Figuras 24 e 25) comparando os resultados da quantificação de *T. cruzi* nos tecidos analisados, cujos valores foram apresentados na Tabela 5, com a barra indicando o valor da mediana dos oito animais analisados, e na sequência, são apresentadas imagens de microscopia ótica em aumento de 40 x (Figuras 26 e 27), representativas das reações de imunoistoquímica das amostras referidas nos respectivos gráficos. As marcações em cor marrom nas imagens se referem às formas de *T. cruzi* presentes nos tecidos.

Todos as amostras dos animais do grupo I (não infectados) não apresentaram marcações, evidenciando que não houve reação do anticorpo anti-*T. cruzi* com o tecido dos animais não infectados (sem a presença de antígenos de *T. cruzi*).

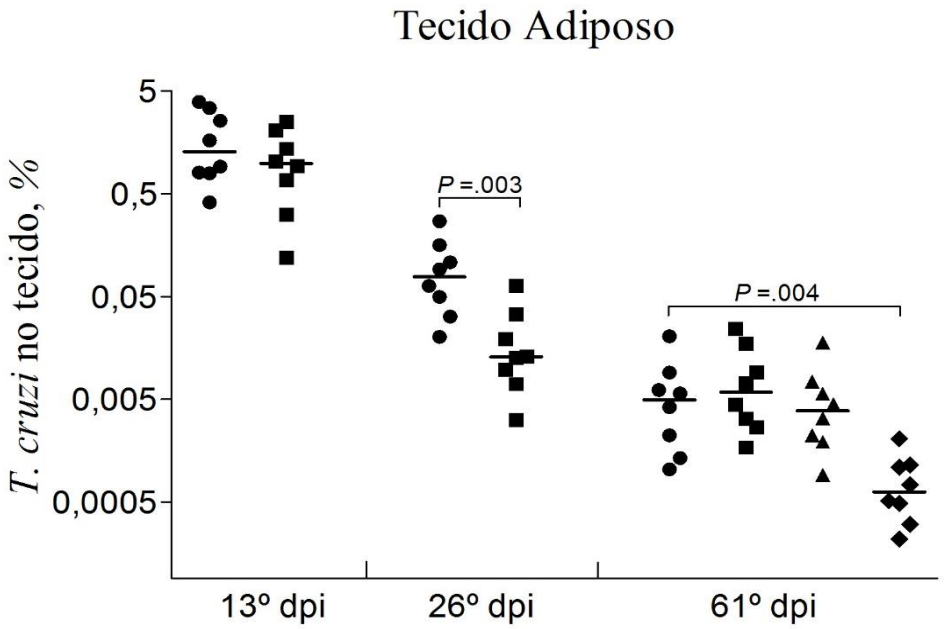



**Figura 24 -** Gráfico com a mediana dos valores da área de *T. cruzi* (%) ocupada em **tecido adiposo**, das oito amostras coletadas no 13º, 26 e 61º dpi. Os circulos representam os animais não tratados; os quadrados os animais tratados na fase aguda; os triângulos os animais tratados na fase crônica e os alosangos onimais s tratados em ambas as fases da infecção.

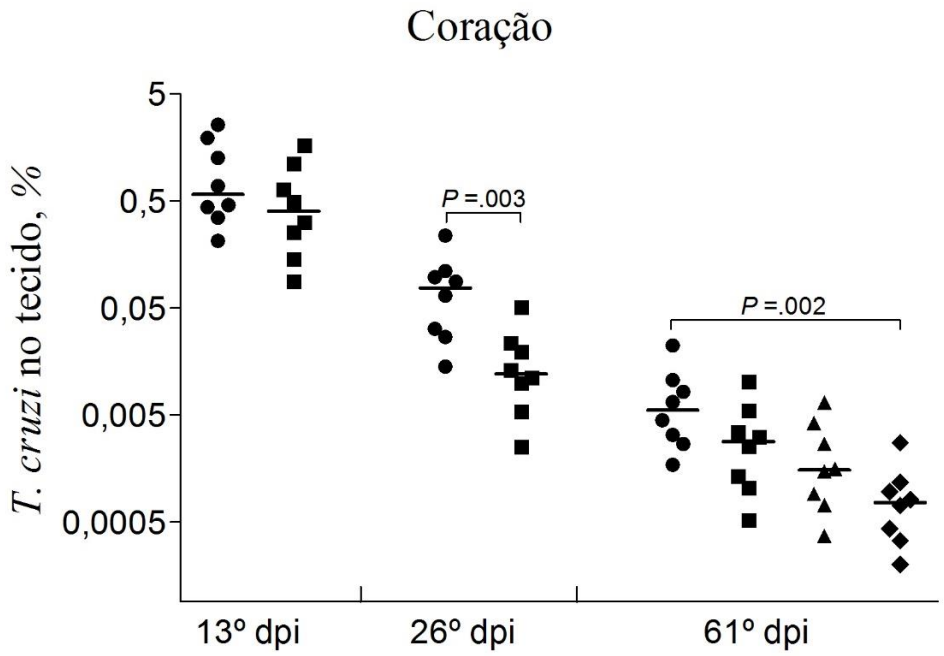



**Figura 25 -** Gráfico com a mediana dos valores da área de *T. cruzi* (%) ocupada em **tecido cardíaco**, das oito amostras coletadas no 13º, 26 e 61º dpi. Os circulos representam os animais não tratados; os quadrados os animais tratados na fase aguda; os triângulos os animais tratados na fase crônica e os losangos os animais tratados em ambas as fases da infecção.

Bilate et al.[54], avaliaram o parasitismo em miocárdio de hamsters infectados com $10^5$ formas da cepa Y de *T. cruzi*. Observaram que no 21º dpi, 50% dos animais apresentavam perda de peso e sinais da fase aguda da infecção (letargia, vômitos e diarreia), e que tanto a detecção de *T. cruzi* no tecido cardíaco (avaliada por imunoistoquímica) quanto a presença de marcadores inflamatórios e de necrose, estavam aumentados nos animais que apresentavam os sinais da infecção. Em média havia 0,1% de *T. cruzi* em tecido cardíaco dos animais com os sintomas, e 0,01% nos que não apresentavam sintomas. Este resultado corrobora outros estudos que correlacionam a presença de *T. cruzi* nos tecidos com a intensidade da resposta inflamatória e o desenvolvimento de manifestações clínicas.

Gruendling et al.[80], estudaram por meio de parâmetros histológicos e parasitológicos, inclusive com qPCR cujo alvo era o nDNA, a resposta ao tratamento com benznidazol na fase aguda em camundongos Swiss infectados com $10^4$ formas das cepas do tipo TcI, TcII e TcIV. DNA de *T. cruzi* foi detectado em todos os tecidos analisados (cérebro, coração, músculo esquelético abdominal, pata posterior esquerda, diafragma, intestino grosso, fígado e baço), e a proporção de órgãos parasitados variou em relação a linhagem do parasito. O tratamento com benznidazol reduziu a maioria dos parâmetros parasitológicos e inflamatórios em todos estágios da infecção e para todas linhagens de *T. cruzi* testadas. Os autores observaram que a positividade da qPCR confirmou os resultados histopatológicos, mostrando menor carga parasitária entre os animais tratados em relação aos não tratados, fato que também foi observado no presente estudo.

Benvenuti et al.[51], compararam amostras cardíacas de 18 receptores de transplante cardíaco que apresentaram reativação da doença de Chagas, com amostras de 16 pacientes igualmente transplantados que não apresentaram reativação. Utilizaram parâmetros quantitativos com qPCR e imunoistoquímica. Os parâmetros - taxa de miocardite, persistência do parasito, mediana da carga parasitária e carga parasitária/ $10^6$ células, no grupo com reativação foram: 83,3%, 77,8%, 8,43 x $10^{-3}$ e 9,9 respectivamente, enquanto no grupo sem reativação, os valores foram de 87,5%, 50%, 7.49 x $10^{-3}$, e 17,8. Não houve diferença estatística entre os grupos. Miocardite estava presente em todas as 22 amostras (100%) nas quais havia persistência do

parasito, e em sete de 12 amostras (58,3%) sem a persistência do parasito ($p < 0,003$). Os autores concluíram que embora a persistência do parasito no miocárdio estivesse relacionada à miocardite, não houve associação com a reativação da doença.

Fuenmayor et al.[113], analisaram por meio de imunoistoquímica, 12 amostras de tecido cardíaco de pacientes com doença de Chagas aguda com o intuito de associar a frequência de *T. cruzi* ao número de células T (CD4+ e CD8+) presentes nos tecidos. Os autores encontraram *T. cruzi* em sete dos 12 pacientes estudados (58%) e observaram miocardite em todos os pacientes, estando a doença cardíaca relacionada à presença do parasito e de células CD4+ e CD8+ no tecido.

Lewis et al.[79], desenvolveram uma técnica de marcação bioluminescente para identificar *T. cruzi* no organismo de camundongos BALB/c infectados com $5 \times 10^3$ formas da cepa CL Brener de *T. cruzi*. Encontraram ampla distribuição do parasito pelo organismo do animal durante a fase aguda da infecção (14º dpi), no entanto, na fase crônica (159º dpi), o parasito só pode ser observado consistentemente no cólon e no estômago, fato que foi corroborado pela técnica de qPCR. No presente estudo, a técnica de qPCR e a imunoistoquímica também apresentaram resultados concordantes, evidenciando que a qPCR é capaz de quantificar de forma confiável o número de parasitos presentes nos tecidos.

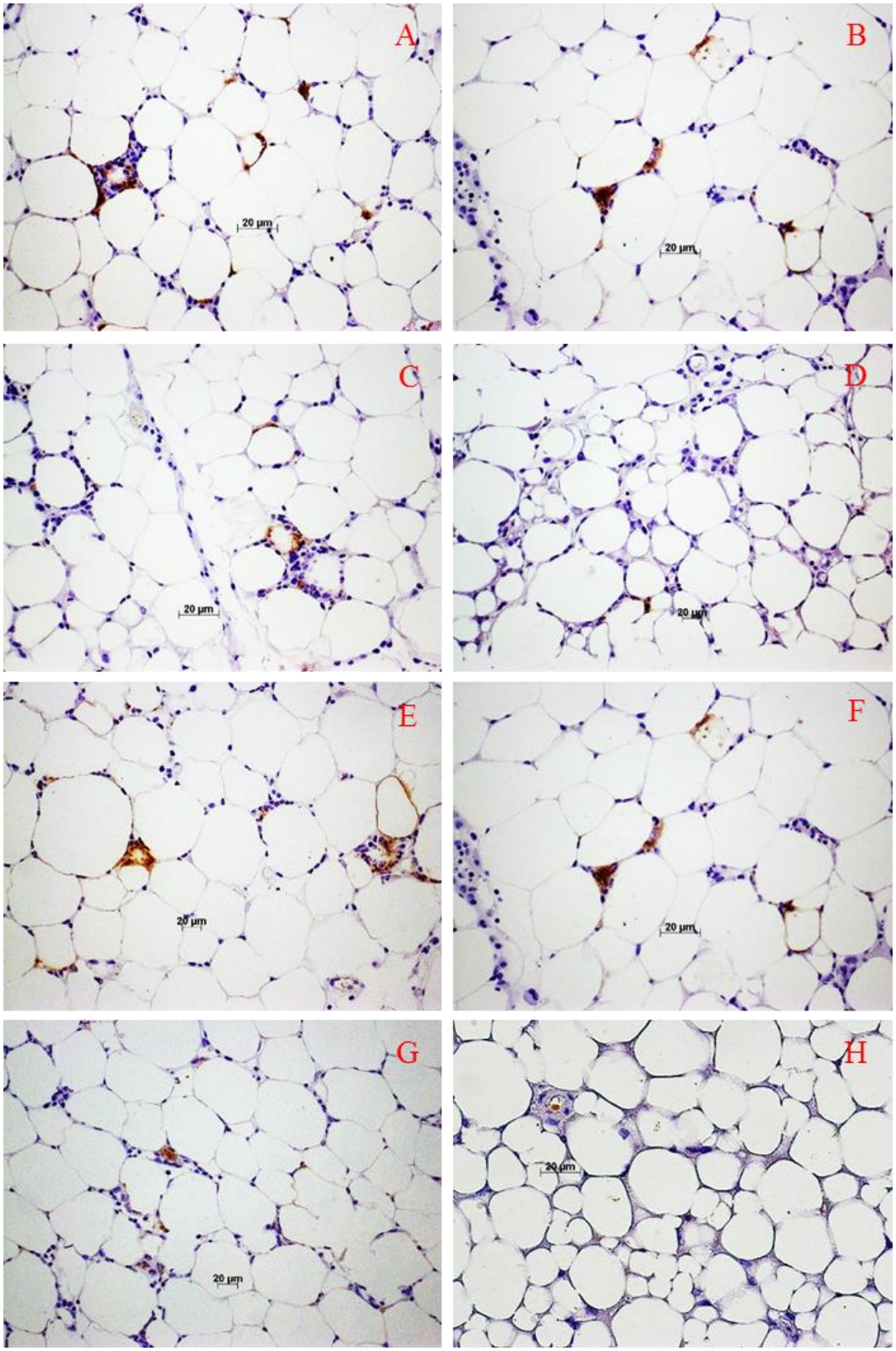



**Figura 26 -** Reações de imunoistoquímica evidenciando marcações de *T. cruzi* (em marrom) em amostras de tecido adiposo coletadas no 13ºdpi de animal NT (A) e TA (B), no 26ºdpi de animal NT (C) e TA (D), e no 61ºdpi de animal NT (E), TA (F), TC (G) e TAC (H).

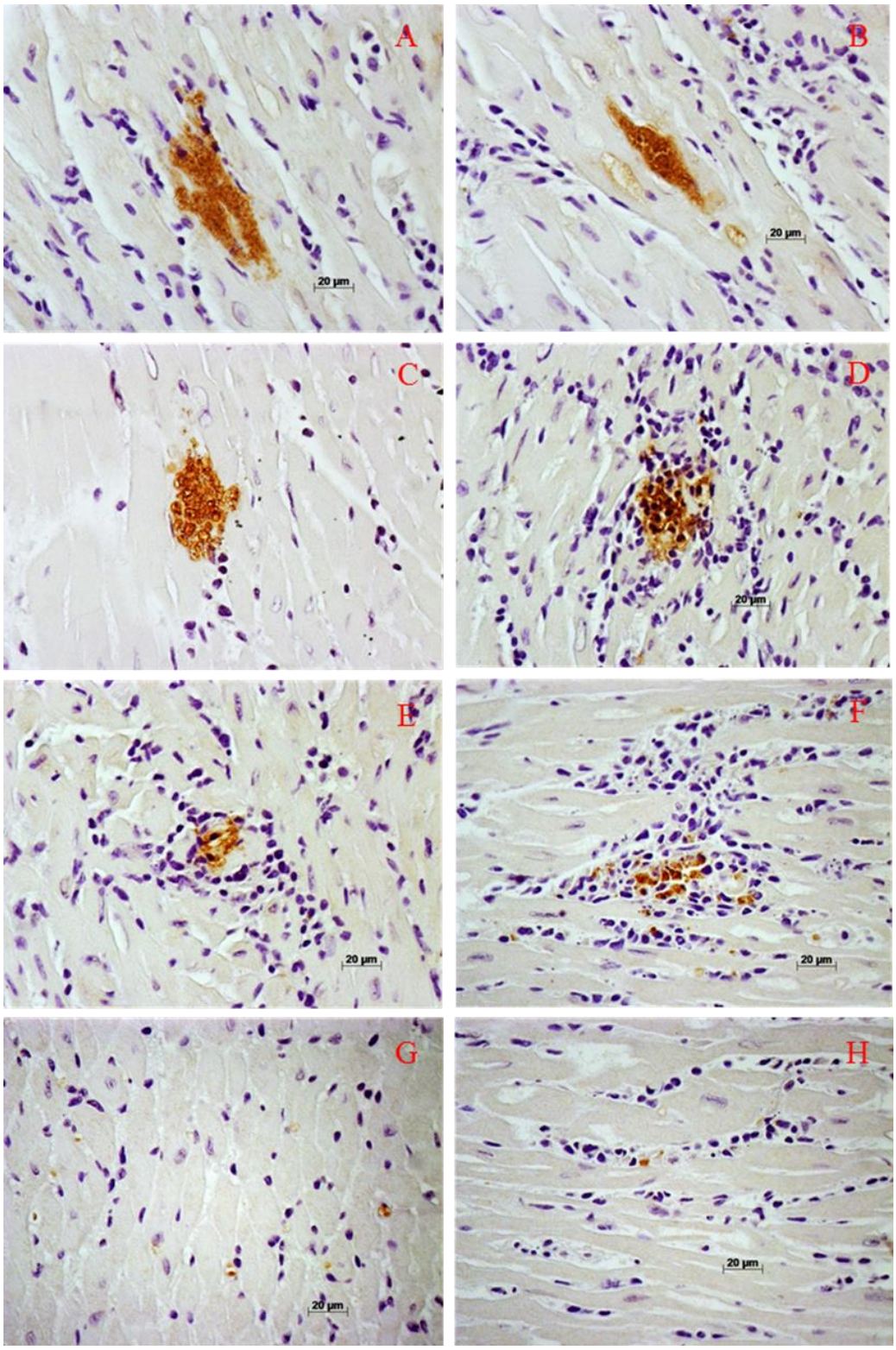



**Figura 27 -** Reações de imunoistoquímica evidenciando marcações de *T. cruzi* (em marrom) em amostras de **coração** coletadas no 13ºdpi de animal NT (A) e TA (B), no 26ºdpi de animal NT (C) e TA (D), e no 61ºdpi de animal NT (E), TA (F), TC (G) e TAC (H).

Barreto de Albuquerque et al.[11], em estudo experimental com camundongos BALB/c infectados com 5 x $10^4$ formas da cepa Tulahuen de *T. cruzi*, estudaram as possibilidades de infecção oral via contaminação da mucosa oral e gastrintestinal. Descobriram que os camundongos infectados via mucosa oral apresentaram maior parasitemia e mortalidade. Para comparação entre os grupos de animais, fizeram a avaliação da parasitemia e análise histopatológica do coração. Encontraram que a área de *T. cruzi* ocupada no tecido cardíaco, no 21º dpi, foi em média 0,075% nos animais infectados via gastrintestinal e 0,12% nos infectados via mucosa oral. No presente estudo, nas amostras colhidas no 13º dpi, havia 0,23% de *T. cruzi* no tecido cardíaco dos animais NT, e 0,04% no 26º dpi. Considerando que Barreto de Albuquerque et al. (2015) utilizaram um inóculo maior, uma cepa mais virulenta e animais mais susceptíveis à infecção, esperava-se que a quantificação de *T. cruzi* fosse significativamente maior que a encontrada no presente estudo. Por outro lado, os autores utilizaram uma técnica simples de histopatologia para a contagem das formas de *T. cruzi* no tecido, enquanto no presente estudo foi utilizada a imunoistoquímica, considerada mais sensível.

## 5.10 INDICAÇÃO DE TRATAMENTO

Assim como no presente trabalho, utilizando modelos experimentais diferentes, Cencig et al., 2011; Caldas et al., 2012; e Gruendling et al., 2015 avaliaram a carga parasitária de *T. cruzi* em sangue e órgãos de animais tratados e observaram que houve redução da carga parasitátia mediante os diferentes esquemas terapêuticos utilizados. Cencig et al.[53], realizaram tratamento em ambas as fases da infecção, porém com anfotericina B lipossomal (Ambisome), e concluíram que o tratamento, apesar de ter falhado na obtenção de cura completa dos animais uma vez que DNA de *T. cruzi* foi detectado no sangue e nos órgãos analisados após o tratamento, impediu a mortalidade e reduziu significativamente a carga parasitária na maioria dos tecidos analisados. Apesar dos autores também terem realizado tratamento em ambas as fases da infecção, não fizeram a comparação do tratamento com benznidazol (tratamento preconizado na doença de Chagas), e observaram que no grupo que recebeu o tratamento por duas vezes, somente o coração e o fígado apresentaram maior redução

da carga parasitária, fato que no presente estudo foi observado em todos os órgãos analisados. Além disso, os autores não observaram benefícios no tratamento em ambas as fases em relação ao tratamento realizado somente na fase aguda ou crônica, fato que foi demonstrado neste estudo (que utilizou infecção com a cepa Y, da linhagem TcII). Esta cepa está comprovadamente relacionada às principais manifestações clínicas da doença de Chagas[24,93], bem como ao tratamento com benznidazol, que é o medicamento indicado para o tratamento da infecção pelo *T. cruzi*. Por outro lado, tanto o trabalho de Cencig et al.[53] quanto o presente estudo concordam que o tratamento realizado nas fase aguda ou crônica geram benefícios, observados pela queda da carga parasitária nos tecidos, em relação aos animais não tratados.

Jackson et al.[44], Álvarez et al.[47], Bianchi et al.[45], Dias et al.[46], e Niborski et al.[48], avaliaram a parasitemia em pacientes antes e após o tratamento e observaram menor presença de *T. cruzi* no sangue dos pacientes tratados. Alguns autores observaram que as manifestações clínicas da doença de Chagas estão diretamente relacionadas à presença de *T. cruzi* no organismo, seja no sangue[1,46,50] ou em tecido cardíaco[51,113] de pacientes, bem como em tecidos de animais[11,54,55]. Desta forma, o presente estudo demonstrou que o tratamento administrado na fase aguda da infecção chagásica, na fase crônica e especialmente em ambas as fases da infecção, poderia ser utilizado em pacientes com o objetivo de reduzir a carga parasitária no organismo, e assim diminuir a probabilidade de desenvolvimento das complicações mais tardias, tais como as cardiomiopatias, além de episódios de reativação da doença de Chagas em pacientes com algum grau de imunodepressão (co-infectados pelo HIV, transplantados, oncológicos).

# 6 CONCLUSÕES

A qPCR utilizada no presente estudo foi capaz de avaliar a carga parasitária e monitorar o tratamento dos animais com benzonidazol, em todas as fases da infecção chagásica. Além disso, apresentou sensibilidade elevada, tendo sido positiva em todos os animais infectados, tanto em sangue quanto nos diferentes órgãos estudados, nos três tempos analisados (pico da fase aguda, final da fase aguda e fase crônica da infecção).

Tanto o tratamento realizado na fase aguda quanto na fase crônica resultaram na redução da carga parasitária em sangue e órgãos em relação aos animais não tratados, no entanto os animais que receberam tratamento repetido nas duas fases da infecção, finalizaram o experimento com a menor quantidade de parasitos em sangue e em todos os órgãos analisados.

O presente estudo demonstrou que da fase aguda para a crônica, existiu uma redução tanto da carga parasitária em sangue quanto em órgãos, e que, nos órgãos essa redução foi ainda maior. Durante a fase crônica nos animais não tratados, o sangue apresentou carga parasitária comparável a do coração, tecido adiposo, pulmão, intestino, baço e fígado, e nos animais TAC o sangue foi o material biológico com a maior carga parasitária, confirmando que a parasitemia pode e deve ser utilizada para o diagnóstico e monitoramento da infecção por *T. cruzi* no organismo na fase crônica da infecção.

Entre os tecidos analisados, o adiposo foi o que apresentou mais frequentemente a carga parasitária mais elevada, e foi o que sofreu a menor redução após o tratamento com benznidazol, corroborando ser um sítio de persistência do parasito no hospedeiro[72,89], mesmo após tratamento.

A técnica de imunoistoquímica, além de evidenciar e quantificar as formas de *T. cruzi* presentes nos tecidos adiposo e cardíaco, confirmou os resultados da qPCR, em especial aqueles que poderiam suscitar dúvidas por serem muito baixos (< 1 parasito/ mL ou < 1 parasito/ 50 ng de DNA). Como houve concordância entre os resultados da qPCR e imunistoquímica, a qPCR, por ser a técnica mais sensível, seria a mais indicada para a detecção da parasitemia de *T. cruzi* em pacientes com infecção crônica, tanto para o diagnóstico quanto para o monitoramento do tratamento.

# 7 PERSPECTIVAS

Os resultados do presente estudo sustentam as recomendações de se tratar pacientes chagásicos na fase crônica indeterminada da doença[1], e também indicam um caminho para se obter a maior redução possível do número de parasitos no organismo, reduzindo as chances de manifestações clínicas futuras, principalmente as cardíacas. Neste sentido, o tratamento em ambas as fases da infecção, cujos resultados foram determinados pela primeira vez em modelo murino de infecção chagásica tratada com benznidazol, ou alternativamente, com tratamento repetido ao longo da fase crônica indeterminada, poderia ser mais eficaz para se atingir a maior redução possível da carga parasitária, e eventualmente a cura da doença de Chagas.

O Consenso Brasileiro em doença de Chagas de 2015[1] menciona o emprego da PCR (porém não citam a qPCR) para a tomada de decisão no diagnóstico de pacientes chagásicos crônicos que apresentem resultados sorológicos inconclusivos (positivo por uma técnica e negativo pela outra). Caso a qPCR seja empregada no diagnóstico e principalmente no monitoramento de pacientes tratados na fase crônica da infecção, e o resultado seja positivo, haverá confirmação da falha do tratamento em período de tempo muito mais curto quando comparado à avaliação sorológica[46]. Em casos de qPCR negativa, mesmo considerando a elevada sensibilidade da técnica, devido à parasitemia muito baixa e inconstante na fase crônica[102,104] decorrente do próprio ciclo biológico do parasito que transita entre as formas amastigota nos tecidos e tripomastigota sanguíneo, seria recomendável testar várias amostras de sangue, de forma seriada, para assegurar a cura.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


1. Dias JCP, Ramos Jr. AN, Contijo ED, Luquetti A, Shikanai-Yasuda MA, Coura JR, et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiol Serv Saúde. 2016;25:7-86.

2. Martins-Melo FR, Ramos Júnior AN, Alencar CH, Heukelbach J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: a systematic review and meta-analysis. Acta Trop. 2014 Feb;130:167-74.

3. Martins-Melo FR, Alencar CH, Ramos Júnior AN, Heukelbach J. Epidemiology of mortality related to Chagas' disease in Brazil, 1999-2007. PLoS Negl Trop Dis. 2012 Feb;6(2):e1508.

4. Rassi A Jr, Rassi A, Rezende JM. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). Infect Dis Clin N Am. 2012;26:275–291.

5. Coura JR, Viñas PA, Junqueira AC. Ecoepidemiology, short history and control of Chagas disease in the endemic countries and the new challenge for nonendemic countries. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2014 Nov;109(7):856-62.

6. Booney KM. Chagas disease in the 21st Century: a public health success or an emerging threat? Parasite. 2014;21(11).

7. Schofield C J, Galvão CJ. Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. Acta Tropica. 2009;110:88–100.

8. Souza ES, Von Atzingen NCB, Furtado MB, Oliveira J, Nascimento JD, Vendrami DP, et al. Description of *Rhodnius marabaensis* sp. n. (Hemiptera, Reduviidade, Triatominae) from Pará State, Brazil. ZooKeys. 2016;621:45–62.

9. Galvão C, Carcavallo R, Rocha DS, Jurberg JA. Checklist of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel, (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. Zootaxa. 2003;202:1-36.

10. Dias JCP. Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2007;102(Suppl. I):11-18.

11. Barreto-de-Albuquerque J, Santos SD, Pérez AR, Berbert LR, Santana-van-Vliet Ed, Farias-de-Oliveira DA. *Trypanosoma cruzi* infection through the oral route promotes a severe infection in mice: new disease form an old infection? PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(6):e0003849.

12. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Doença de Chagas aguda no Brasil: série histórica de 2000 a 2013. Bol Epidemiol. 2015;46(21):1-9.

13. Blanchet D, Brenière SF, Schijman AG, Bisio M, Simon S, Véron V, et al. First report of a family outbreak of Chagas disease in French Guiana and posttreatment follow-up. Infection, Genet and Evol. 2014;28:245–250.

14. Steindel M, Pacheco LK, Scholl D, Soares M, de Moraes MH, Eger I, et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectores, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. Diagn Microbiol Infect Dis. 2008 Jan;60(1):25-32.

15. Coura JR, Viñas PA. Chagas disease: a new worldwide challenge. Nature. 2010;465: S6-S7.

16. Hotez PJ, Dumonteil E, Betancourt Cravioto M, Bottazzi ME, Tapia-Conyer R, Meymandi S, et al. An unfolding tragedy of Chagas disease in North America. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Oct;7(10):e2300.

17. Argolo AM. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Rio de Janeiro: Imperial Novo Milênio. 2008.

18. Noireau F, Diosque P, Jansen AM. *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. Vet Res. 2009 Mar-Abr;40(2):26.

19. Teixeira AR, Hecht MM, Guimaro MC, Sousa AO, Nitz N. Pathogenesis of chagas' disease: parasite persistence and autoimmunity. Clin Microbiol Rev. 2011;24(3):592-630.

20. Takle GB, Snary D. South American trypanosomiasis (Chagas'disease). In: Warren, KS, editor. Immunology of Parasitic Infec-tions. London: Blackwell Scientific Publications; 1993

21. Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA, Zingales B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi. Mol Biochem Parasitol. 1996 Dec 20;83(2):141-52.

22. Andrade SG, Magalhaes JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30: 27-35.

23. Brisse S, Barnabé C, Tibayrenc M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electroforesis. Int J Parasitol. 2000;30:35–44.

24. Zingales B, Andrade SG; Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraespecific nomenclature: second

revision meeting recommends TcI to TcVI. Mem do Inst Oswaldo Cruz. 2009;104:1051–54.

25. Andrade SG, Magalhaes JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. Rev Soc Bras Med Trop. 1997;30: 27-35.

26. Mielniczki-Pereira AA, Chiavegatto CM, López JA, Colli W, Alves MJM, Gadelha FR. *Trypanosoma cruzi* strains, Tulahuen 2 and Y, besides the difference in resistance to oxidative stress, display differential glucose-6-phosphate and 6-phosphogluco-nate dehydrogenases activities. Acta Tropica. 2007;101:54-60.

27. Pereira da Silva LH, Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin Biol (São Paulo). 1953;20:191-208.

28. Brener Z, Chiari, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. Rev Inst Med Trop São Paulo. 1963;5:220-224.

29. Pizzi TP, Rubio M, Prager R, Silva R. Acción de la cortisona en la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*. Bol Chileno Parasitol. 1952;7:22–24.

30. Rassi A Jr, Rassi A, Marin-Neto JA. Antitrypanosomal agents: treatment or threat? Lancet. 2010;376:768–9.

31. Álvarez JM, Fonseca R, Borges da Silva H, Marinho CRF, Bortoluci KR, Sardinha LR, et al. Chagas Disease: Still Many Unsolved Issues. Mediators Inflam. 2014;3:1-9.

32. Sartori AM, Ibrahim KY, Nunes Westphalen EV, Braz LM, Oliveira OC Jr, Gakiya E, et al. Manifestations of Chagas'disease (American trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. Ann Trop Med Parasitol. 2007 Jan;101(1):31-50.

33. Ferreira, AW. Diagnóstico laboratorial das principais doenças infecciosas e autoimunes: correlações clínico-laboratoriais. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2013.

34. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Programa Nacional de Controle de Chagas. Doença de Chagas aguda: aspectos epidemiológicos, diagnóstico e tratamento: guia de consulta rápida para profissionais de saúde. Rev Patol Trop. 2007 Set-Dez;36(3):1-32.

35. Castro AM, Luquetti AO, Rassi A, Rassi GG, Chiari E, Galvão LMC. Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. Parasitol Res. 2002 Oct;88(10):894-900.

36. Ramírez JD, Guhl F, Umezawa ES, Morillo CA, Rosas F, Marin-Neto JA, et al. Evaluation of adult chronic Chagas' heart disease diagnosis by molecular and serological methods. Clin Microbiol. 2009 Dez;47(12):3945-3951.

37. Duffy T, Bisio M, Altcheh J, Burgos JM, Diez M, Levin MJ, et al. Accurate Real-Time PCR Strategy for Monitoring Bloodstream Parasitic Loads in Chagas Disease Patients. PLoS Negl Trop Dis. 2009;3(4): e419.

38. Portela-Lindoso AAB, Shikanai-Yasuda MA. Doença de Chagas crônica: do xenodiagnóstico e hemocultura à reação em cadeia da polimerase. Rev Saúde Pública. 2003 Fev;37(1)107-115.

39. Britto CC. Usefulness of PCR-based assays to assess drug efficacy in Chagas disease chemotherapy: value and limitations. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2009 Jul;104:122-35.

40. Cura CI, Lattes R, Nagel C, Gimenez MJ, Blanes M, Calabuig E, et al. Early Molecular Diagnosis of Acute Chagas Disease After Transplantation With Organs From *Trypanosoma cruzi*–Infected Donors. Am J Transplant. 2013;13:3253–3261.

41. Braz LM, Raiz R Jr, Neto A, Alárcon RS, Gakyia E, Okay TS. The detection of *Trypanosoma cruzi* in *Triatoma infestans*: comparison of a PCR-based assay with microscopical examination. Ann Trop Med Parasitol. 2007 Jul;101(5):461-465.

42. Espy MJ, Uhl JR, Sloan LM, Buckwalter SP, Jones MF, Vetter EA, et al. Real-Time PCR in Clinical Microbiology: Applications for Routine Laboratory Testing. Clin Microbiol Rev. 2006 Jan;19(1):165–256.

43. Piron M, Fisa R, Casamitjana N, López-Chejade P, Puig L, Vergés M, et al. Development of a real-time PCR assay for *Trypanosoma cruzi* detection in blood samples. Acta Tropica. 2007 Set;103(3):195–200.

44. Jackson Y, Chatelain E, Mauris A, Holst M, Miao Q, Chappuis F, Ndao M. Serological and parasitological response in chronic Chagas patients 3 years after nifurtimox treatment. BMC Infectious Diseases. 2013,13:85.

45. Bianchi F, Cucunubá Z, Guhl F, González NL, Freilij H, Nicholls RS. Follow-up of an asymptomatic Chagas Disease Population of Children after Treatment with Nifurtimox (Lampit) in a Sylvatic Endemic Transmission Area of Colombia. PLoS Negl Trop Dis. 2015;9(2):e0003465.

46. Dias JCP, Dias E, Nóbrega GCC. Long-term follow-up of a patient since the acute phase of Chagas disease (South American trypanosomiasis): further treatment and cure of the infection. Rev Soc Bras Med Trop. 2015 Set-Out; 48(5):629-32.

47. Álvarez MG, Hernández Y, Bertocchi G, Fernández M, Lococo B, Ramírez JC, et al. New scheme of intermittent benznidazole administration in patients chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: a pilot short-term follow-up study with adult patients. Antimicrob Agents Chemother. 2016;60:833–7.

48. Niborski LL, Grippo V, Lafón SO, Levitus G, García-Bournissen F, Ramirez JC, et al. Serological based monitoring of a cohort of patients with chronic Chagas disease treated with benznidazole in a highly endemic area of northern Argentina. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 2016;111(6):365-71.

49. Apt W, Arribada A, Zulantay I, Saavedra M, Araya E, Solari A, et al. *Trypanosoma cruzi* burden, genotypes, and clinical evaluation of Chilean patients with chronic Chagas cardiopathy. Parasitol Res. 2015;114:3007–18.

50. Sabino EC, Ribeiro AL, Lee TH, Oliveira CL, Carneiro-Proietti AB, Antunes AP, et al. Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in blood by PCR is associated with Chagas cardiomyopathy and disease severity. Eur J Heart Fail. 2015;17(4):16–423.

51. Benvenuti LA, Roggério A, Nishiya AS, Campos SV, Fiorelli AI, Levi JE. *Trypanosoma cruzi* persistence in the native heart is associated with high-grade myocarditis, but not with Chagas' disease reactivation after heart transplantation. J Heart Lung Transplant. 2014;33:698–703.

52. Martins HR, Figueiredo LM, Valamiel-Silva JC, Carneiro CM, Machado-Coelho GL, Vitelli-Avelar DM, et al. Persistence of PCR-positive tissue in benznidazole-treated mice with negative blood parasitological and serological tests in dual infections with *Trypanosoma cruzi* stocks from different genotypes. J Antimicrob Chemoter. 2008 Jun;61(6):1319-27.

53. Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. Parasitic loads in tissues of mice infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with AmBisome. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jun; 5(6):e1216.

54. Bilate AM, Teixeira PC, Ribeiro SP, Brito T, Silva AM, Russo M, Kalil J, et al. Distinct outcomes of *Trypanosoma cruzi* infection in hamsters are related to myocardial parasitism, cytokine/chemokine gene expression, and protein expression profile. J Infect Dis. 2008;198:614 –23.

55. Caldas S, Caldas IS, Cecílio AB, Diniz LF, Talvani A, Ribeiro I, et al. Therapeutic responses to different anti-*Trypanosoma cruzi* drugs in experimental infection by benznidazole-resistant parasite stock. Parasitology. 2014;141(12):1628-37.

56. Pinto AY, Valente VC, Coura JR, Valente SAS, Junqueira AC, Santos LC, et al. Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. Plos One. 2013 May;8(5):e64450.

57. Andrade AL, Zicker F, Oliveira RM, Silva SA, Luquetti A, Travassos LR. Randomised trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. Lancet. 1996 Nov;348(9039):1407-13.

58. Bern C, Montgomery SP, Herwaldt BL, Rassi Júnior A, Marin-Neto JA, Dantas RO, et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review. JAMA. 2007 Nov;298(18):2171-81.

59. Garcia S, Ramos CO, Senra JFV, Vilas-Boas F, Rodrigues MM, Campos-de-Carvalho AC, et al. Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. Antimicrob Agents Chemother. 2005 Apr;49(4):1521-8.

60. Morillo CA, Marin-Neto JA, Avezum A, Sosa-Estani S, Rassi Júnior A, Rosas F, et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. N Engl J Med. 2015 Oct;373(14):1295-306.

61. Prata A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. Lancet Infect Dis. 2001 Sep;1(2):92-100.

62. Navarrete MN, Gutiérrez-Gutiérrez B, Arellano-Ramos R, Castillo SF, Domínguez Castellano A. Low Incidence of Adverse Effects Using a Progressive Regimen of Benznidazole in Chagas Disease. Clin Infect Dis. 2016.

63. Viotti R, Vigliano C, Lococo B, Bertocchi G, Petti M, Alvarez MG, et al. Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. Ann Intern Med. 2006 Mai;144(10):724-34.

64. Machado de Assis GF, Diniz GA, Montoya RA, Dias JC, Coura JR, Machado-Coelho GL, et al. A serological, parasitological and clinical evaluation of untreated Chagas disease patients and those treated with benznidazole before and thirteen years after intervention. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013 Nov;108(7):873-80.

65. Viotti R, Alarcón de Noya B, Araujo-Jorge T, Grijalva MJ, Guhl F, López MC, et al. Towards a paradigm shift in the treatment of chronic Chagas disease. Antimicrob Agents Chemother. 2014 Fev;58(2):635-639.

66. Machado de Assis GF, Silva AR, Bem VAL, Bahia MT, Martins-Filho OA, Dias JCP. Posttherapeutic cure criteria in Chagas' disease: conventional serology followed by supplementary serological, parasitological, and molecular tests. Clin Vaccine Immunology. 2012 Ago;19(8):1283-91.

67. Fragata-Filho AA, França FF, Fragata CS, Lourenço AM, Faccini CC, Costa CAJ. Evaluation of Parasiticide Treatment with Benznidazol in the Electrocardiographic, Clinical, and Serological Evolution of Chagas Disease. PLoS Negl Trop Dis. 2016 Mar;10(3): e0004508.

68. Oliveira-Silva JCV, Machado-de-Assis GF, Oliveira MT, Paiva NC, Araújo MS, Carneiro CM, et al. Experimental benznidazole treatment of *Trypanosoma cruzi* II strains isolated from children of the Jequitinhonha Valley, Minas Gerais, Brazil, with Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2015 Jan;110(1):86-94.

69. Vallejo A, Monge-Maillo B, Gutiérrez C, Normanb FF, López-Vélez R, Pérez-Molina JA. Changes in the immune response after treatment with benznidazole versus

no treatment in patients with chronic indeterminate Chagas disease. Acta Tropica. 2016;164:117–124.

70. Ramirez JC, Cura CI, Moreira OC, Lages-Silva E, Juiz N, Velázquez E, et al. Analytical Validation of Quantitative Real-Time PCR Methods for Quantification of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. J Mol Diagn. 2015 Sep;17(5):605–615.

71. Cummings KL, Tarleton RL. Rapid quantitation of *Trypanosoma cruzi* in host tissue by real-time PCR. Mol Biochem Parasitol. 2003;129(1):53–59.

72. Nagajyothi F, Machado FS, Burleigh BA, Jelicks LA, Scherer PE, Mukherjee S, et al. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi* persistence in Chagas disease. Cell Microbiol. 2012 Mai;14(5):634-43.

73. Batista DGJ, Batista MM, de Oliveira GM, do Amaral PB, Lannes-Vieira J, Britto CC, et al. Arylimidamide DB766, a Potential Chemotherapeutic Candidate for Chagas' Deisease Treatment. Antimicrob Agents Chemother. 2010 Jul;54(7):2940-52.

74. Miguel DC, Ferraz ML, Alvez RO, Yokoyama-Yasunaka JK, Torrecilhas AC, Romanha AJ, et al. The anticancer drug tamoxifen is active against *Trypanosoma cruzi* in vitro but ineffective in the treatment of the acute phase of Chagas disease in mice. Mem Ins Oswaldo Cruz. 2010 Nov;105(7):945-8.

75. Olivieri BP, Molina JT, Castro SL, Pereira MC, Calvet CM, Urbina JA, et al. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. Int J Antimicrob Agents. 2010 Jun;36(1):79–83.

76. Batista DGJ, Batista MM, de Oliveira GM, Britto CC, Rodrigues ACM, Stephens CE, et al. Combined Treatment of Heterocyclic Analogues and Benznidazole upon *Trypanosoma cruzi* In Vivo. PLoS ONE. 2011;6(7):e22155

77. Caldas S, Caldas IS, Diniz LF, Lima WG, Oliveira RP, Cecílio AB, et al. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Acta Tropica. 2012 Set;123(3):170–7.

78. Cencig S, Coltel N, Truyens C, Carlier Y. Evaluation of benznidazole treatment combined with nifurtimox, posaconazole or AmBisome® in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains. Int J Antimicrob Agents. 2012 Dez;40(6):527-32.

79. Lewis MD, Francisco AF, Taylor MC, Burrell-Saward H, McLatchie AP, Miles MA, et al. Bioluminescence imaging of chronic *Trypanosoma cruzi* infections reveals tissue-specific parasite dynamics and heart disease in the absence of locally persistent infection. Cell Microbiol. 2014 Sep;16(9):1285–1300.

80. Gruendling AP, Massago M, Teston APM, Monteiro WM, Kaneshima EN, Araújo SM, et al. Impact of Benznidazole on Infection Course in Mice Experimentally

Infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. Am J Trop Med Hyg. 2015;92(6):1178–1189.

81. Martins AF, Figueiredo DL, Mazzeti AL, Silva do Nascimento AF, Caldas S, Caldas IS, et al. Benznidazole/Itraconazole Combination Treatment Enhances Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity in Experimental Chagas Disease. PLoS ONE. 2015;10(6): e0128707.

82. Guedes-da-Silva FH, Batista DGJ, Silva CF, Meuser MBG, Simões-Silva MR, de Araújo JS, et al. Different Therapeutic Outcomes of Benznidazole and VNI Treatments in Different Genders in Mouse Experimental Models of *Trypanosoma cruzi* Infection. Antimicrob Agents Chemother. 2015 Dec;59(12):7564-70.

83. Teston APM, Abreu AP, Gruendling AP, MT Bahia, ML Gomes, SM Araújo, et al. Differential parasitological, molecular, and serological detection of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV in blood of experimentally infected mice. Exp Parasitol. 2016;166:44-50.

84. Freitas VL, da Silva SC, Sartori AM, Bezerra RC, Westphalen EV, Molina TD, et al. Real-Time PCR in HIV/*Trypanosoma cruzi* Coinfection with and without Chagas Disease Reactivation: Association with HIV Viral Load and CD4 Level. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Ago;5(8):e1277.

85. Aguiar C, Batista AM, Pavan TBS, Almeida EA, Guariento ME, Wanderley JS, Costa SCB. Serological profiles and evaluation of parasitaemia by PCR and blood culture in individuals chronically infected by *Trypanosoma cruzi* treated with benzonidazole. Trop Med Int Health. 2012 Mar;17(3):368–373.

86. Moreira OC, Ramírez JD, Velázquez E, Melo MF, Lima-Ferreira C, Guhl F, et al. Towards the establishment of a consensus real-time qPCR to monitor *Trypanosoma cruzi* parasitemia in patients with chronic Chagas disease cardiomyopathy: a substudy from the BENEFIT trial. Acta Tropica. 2013 Jan;125(1):23-31.

87. Murcia L, Carrilero B, Ferrer F, Roig M, Franco F, Segovia1 M. Success of benznidazole chemotherapy in chronic Trypanosoma cruzi-infected patients with a sustained negative PCR result. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 2016;35:1819–1827.

88. Sguassero Y, Cuesta CB, Roberts KN, Hicks E, Comandé D, Ciapponi A, et al. Course of Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection after Treatment Based on Parasitological and Serological Tests: A Systematic Review of Follow-Up Studies. PLoS One. 2015;10(10):e0139363.

89. Nagajyothi F, Desruisseaux MS, Jelicks LA, Machado FS, Chua S, Scherer PE, Tanowitz HB. Perspectives on Adipose Tissue, Chagas Disease and Implications for the Metabolic Syndrome. Interdiscip Perspect Infect Dis. 2009 Jul: 824324.

90. Raymundo MM, Goldin JR. Diretrizes Para Utilização de Animais em Experimentos Científicos. 2000 [citado 2014 ago 7]. Disponível em: http://www.bioetica.ufrgs.br/animdi r.htmL

91. Oliveira HP, Alves GES, Rezende CMF. Eutanásia em Medicina Veterinária. Resumo das apresentações junto ao Comitê de ética em experimentação animal da UFMG, 2002.

92. Diniz LF, Urbina JA, Andrade IM, Mazzeti AL, Martins TA, Caldas IS, et al. Benznidazole and posaconazole in experimental Chagas disease: positive interaction in concomitant and sequential treatments. PLoS Negl Trop Dis. 2013 Ago;7(8): e2367.

93. Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD, Macedo AM. Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. Int J Parasitol. 2005 Abr;35(4):411-7.

94. Reagan-Shaw S, Nihal M, Ahmad N. Dose translation from animal to human studies revisited. FASEB J. 2008 Mar;22(3):659-61.

95. Guedes PM, Oliveira FS, Gutierrez FR, da Silva GK, Rodrigues GJ, Bendhack LM, et al. Nitric oxide donor *trans*-[RuCl([15]aneN4)NO]2+ as a possible therapeutic approach for Chagas' disease. Br J Pharmacol. 2010 Mai;160(2):270–82.

96. Bulffer RF, Castro JA, Fanelli SL. Benzonidazole levels in blood vary with age in rats. Rio de Janeiro: Mem Inst Oswaldo Cruz. 2011 Mai;106(3):374-377.

97. Pupulin AR, Marques-Araujo S, Toledo MJ, Gomes ML, Takejima E, Cuman RK, et al. Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Exp Parasitol. 2010 Dez;126(4):435–40.

98. Ferraz ML, Gazzinelli RT, Alves RO, Urbina JA, Romanha AJ. Absence of CD4+ T lymphocytes, CD8+ T lymphocytes, or b lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. Antimicrob Agents Chemother. 2009 Jan;53(1):174–9.

99. Reimão JQ, Colombo FA, Pereira-Chioccola VL, Tempone AG. *In vitro* and experimental therapeutic studies of the calcium channel blocker bepridil: Detection of viable *Leishmania (L.) chagasi* by real-time PCR. Exp Parasitol. 2011 Jun;128(2):111–5.

100. Saavedra M, Zulantay I, Apt W, Castillo J, Araya E, Martínez G, et al. Quantification by real-time PCR of *Trypanosoma cruzi* DNA in samples of Triatoma infestans used in xenodiagnosis of chronic Chagas disease patients. Parasit Vectors. 2016;9:382.

101. Braz LMA, Raiz-Jr R, Alárcon RS, Gakiya E, Amato-Neto V, Okay TS. Suitability of a rapid DNA isolation and amplification for detection of *Trypanosoma*

*cruzi* in *Triatoma infestans* dry fecal spots collected on filter paper. Parasite. 2008 Dez;15(4):595-8.

102. Araújo-Jorge TC. Modelos animais para o estudo in vivo da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos: O camundongo. In: Araújo-Jorge TC, Castro SL, organizadores. Doença de Chagas: Manual para experimentação animal. Rio de Janeiro: Fio Cruz; 2000. p. 134-40.

103. Breniere SF, Bosseno MF, Telleria J, Carrasco R, Vargas F, Yaksic N, Noireau F. Field application of polymerase chain reaction diagnosis and strain typing of *Trypanosoma cruzi* in Bolivian triatomines. Am J Trop Med Hyg. 1995 Ago;53(2):179-184.

104. Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M. Trypanosoma cruzi e Doença de *Chagas*. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

105. Guay JM, Dubois D, Morency MJ, Gagnon S, Mercier J, Levesque RC. Detection of the pathogenic parasite *Toxoplasma gondii* by specific amplification of ribosomal sequences using comultiplex polymerase chain reaction. J Clin Microbiol. 1993 Fev;31(2):203-207.

106. Schijman AG, Bisio M, Orellana L, Sued M, Duffy T, Mejia Jaramillo AM, et al. International Study to Evaluate PCR Methods for Detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in Blood Samples from Chagas Disease Patients. PLoS Negl Trop Dis. 2011 Jan;5(1):e931.

107. Qvarnstrom Y, Schijman AG, Veron V, Aznar C, Steurer F, da Silva AJ. Sensitive and specific detection of Trypanosoma cruzi DNA in clinical specimens using a multi-target real-time PCR approach. PLoS Negl Trop Dis. 2012;6(7): e1689.

108. Nolan T, Hands RE, Ogunkolade W, Bustin SA. SPUD: A quantitative PC R assay for the detection of inhibitors in nucleic acid preparations. Analyt Biochem. 2006;351:308–310.

109. Barbosa Jr. AA, Andrade ZA. Identificação do Trypanosoma cruzi nos tecidos extracardíacos de portadores de miocardite crônica chagásica. Ver Soc Bras Med Trop. 1984 Jul-Set;17:123-126.

110. Castro-Sesquen YE, Gilman RH, Paico H, Yauri V, Angulo N, Ccopa F, et al. Cell death and serum markers of collagen metabolism during cardiac remodeling in Cavia porcellus experimentally infected with Trypanosoma cruzi. PLoS Negl Trop Dis. 2013;7(2):e1996.

111. Hamasaki MY, Hirata MH, Hirata RDC, Himelfarb ST, Campos LMG, Nogueira MI. Análise da expressão do mRNA da proteína S100β em adipócitos de pacientes com diabetes melito tipo 2. Arq Bras Endocrinol Metabol. 2012 Ago;56(7):435-440.

112. Guarner J, Bartlett J, Zaki SR, Colley DG, Grijalva MJ, Powell MR. Mouse model for Chagas disease: immunihistochemical distribution of different stages of *Trypanosoma cruzi* in tissues throughout infection. Am J Trop Med Hyg. 2001;65(2):152–158.

113. Fuenmayor C, Higuchi ML, Carrasco H, Parada H, Gutierrez P, Aiello V, Palomino S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T-cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. Acta Cardiol. 2005;60:33–7.

114. Santoro F, Sadigursky M, Sherlock I, Afchain D, Capron A. Studies on anti-component 5 antibodies in animal infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev Soc Bras Med Trop. 1987;20(2):91-4.

115. Glaser V. Adjuvants boost safety, efficacy while lowering the costs of new vaccines. Gen Eng News. 1995 Jun;15(11):6-7.

116. Harlow E, Lane D. Antibodies: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Publications; 1988.

117. Audibert FM, Lise LD. Adjuvants: current status, clinical perspectives and future prospects. Immunol Today. 1993 Jun;14(6):281-4.

118. Harth G, Haidaris CG, So M. Neuraminidase from *Trypanosoma cruzi*: Analysis of enhanced expression of the enzyme in infectious forms. Proc Nail Acad Sci. USA. 1987 Dec;84:8320-8324.

119. Ey PL, Prowse SJ, Jenkin CR. Isolation of pure $IgG_1$, $IgG_{2a}$ and $IgG_{2b}$ immunoglobulins from mouse serum using protein A-Sepharose. Immunochemistry. 1978 Jul;15(7):429-436.

## APÊNDICE 1 - ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS qPCR

Análises estatísticas das amostras analisadas por qPCR com *primers* do DNA mitocondrial, entre os grupos de animais (NT, TA, TC e TAC) nos três tempos de colheita (13º, 26º e 61º dpi).

**Cérebro.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,0004 | 0,0015 | 0,0220 |
| NT x TC | | | 0,0165 |
| NT x TAC | | | 0,0002 |
| TA x TC | | | 0,6274 |
| TA x TAC | | | 0,0000 |
| TC x TAC | | | 0,0003 |

**Fígado.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,0020 | 0,0730 | 0,0015 |
| NT x TC | | | 0,0695 |
| NT x TAC | | | 0,0093 |
| TA x TC | | | 0,1433 |
| TA x TAC | | | 0,0000 |
| TC x TAC | | | 0,0008 |

**Músculo esquelético.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,9023 | 0,0465 | 0,2400 |
| NT x TC | | | 0,0210 |
| NT x TAC | | | 0,0004 |
| TA x TC | | | 0,1893 |
| TA x TAC | | | 0,0042 |
| TC x TAC | | | 0,1593 |

**Coração.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,0817 | 0,0453 | 0,0405 |
| NT x TC | | | 0,0262 |
| NT x TAC | | | 0,0187 |
| TA x TC | | | 0,0013 |
| TA x TAC | | | 0,0000 |
| TC x TAC | | | 0,0000 |

**Baço.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,1356 | 0,0715 | 0,0086 |
| NT x TC | | | 0,5575 |
| NT x TAC | | | 0,0004 |
| TA x TC | | | 0,0133 |
| TA x TAC | | | 0,0003 |
| TC x TAC | | | 0,0000 |

**Tecido adiposo.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,1948 | 0,0138 | 0,3766 |
| NT x TC | | | 0,2363 |
| NT x TAC | | | 0,0290 |
| TA x TC | | | 0,3348 |
| TA x TAC | | | 0,0001 |
| TC x TAC | | | 0,0000 |

**Pulmão.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,0007 | 0,0036 | 0,0000 |
| NT x TC | | | 0,7395 |
| NT x TAC | | | 0,0049 |
| TA x TC | | | 0,0000 |
| TA x TAC | | | 0,0000 |
| TC x TAC | | | 0,0000 |

**Rim.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,6294 | 0,0149 | 0,0792 |
| NT x TC | | | 0,0059 |
| NT x TAC | | | 0,0006 |
| TA x TC | | | 0,0821 |
| TA x TAC | | | 0,0007 |
| TC x TAC | | | 0,0003 |

**Sangue.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,0186 | 0,0674 | 0,0999 |
| NT x TC | | | 0,1139 |
| NT x TAC | | | 0,0572 |
| TA x TC | | | 0,7793 |
| TA x TAC | | | 0,0821 |
| TC x TAC | | | 0,0907 |

**Intestino grosso.**

| Grupos | 13º dpi | 26º dpi | 61º dpi |
|---|---|---|---|
| NT x TA | 0,0079 | 0,0009 | 0,8219 |
| NT x TC | | | 0,1603 |
| NT x TAC | | | 0,0133 |
| TA x TC | | | 0,0119 |
| TA x TAC | | | 0,0017 |
| TC x TAC | | | 0,0001 |

## APENDICE 2 – PROTOCOLOS PARA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS POLICONAIS IGG ANTI-*T. CRUZI*

### PRODUÇÃO DE ANTÍGENOS DE *Trypanosoma cruzi*

Três coelhos, de três meses de idade, da espécie *Oryctolagus cuniculus*, ordem Lagomorpha, família Leporidae, raça New Zealand foram utilizados para a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* [114].

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram recuperadas de meio LIT, em fase exponencial de crescimento ($10^6$ parasitos/ mL de meio). O meio de cultura foi centrifugado a 4.000 x g por 5 minutos, e lavado em PBS com pH 7,2 por cinco vezes. O sedimento foi re-suspenso em 1 a 1,5 mL de PBS e submetido a cinco ciclos de congelamento e descongelamento sucessivos em nitrogênio líquido. Em seguida os parasitos lisados foram sonicados a 20 KHz, 30 Watts, por 2 minutos, e armazenados em freezer a -86ºC [114,115].

### TESTE DOS ANTÍGENOS

Antes da inoculação nos coelhos, a concentração dos antígenos foi determinada por espectofotometria. As amostras obtidas foram diluídas ou concentradas para se obter aproximadamente 1.000 µg/ mL. Além disso, os antígenos também passaram por teste de antigenicidade, no qual, sensibilizou-se uma placa de ELISA com os próprios antígenos extraídos e a reação foi realizada com um soro contendo anticorpos IgG anti-*T. cruzi*[116], proveniente de paciente com doença de Chagas, fornecido pelo Laboratório de Soroepidemiologia do Instituto de Medicina Tropical da USP-SP.

Para sensibilização da placa de ELISA foi utilizado tampão PBS com 5 µg/ mL do antígeno. A placa foi mantida por uma hora a 37º em câmara úmida. A solução foi retirada por inversão e acrescentados 200 µL de solução de bloqueio (2,5% de leite desnatado em PBS tween 0,05%). A placa foi levada a estufa mantida a 37ºC em câmara úmida, por uma hora. A placa foi a seguir lavada quatro vezes com PBS tween 0,05% e seca em estufa a 37ºC.

À cada cavidade da placa foram adicionados 100 µL da amostra de soro contendo anticorpos anti-*T. cruzi*, seguindo um esquema de diluição seriada de 1/20, 1/80, 1/320 e 1/1.280. Cada diluição foi testada em triplicata. Inicialmente foi realizada incubação a 37ºC por 40 minutos em câmara úmida, seguida de quatro lavagens com PBS tween 0,05%. Foi acrescentado conjugado enzimático diluído a 1:20.000 em leite 0,2% PBS tween 0,05%, e incubado a 37ºC por 40 minutos em câmara úmida. Realizou-se novo ciclo de lavagens, e posteriormente foram adicionados 100 µL de solução de tetrametilbenzidina (TMB) por dez minutos ao abrigo da luz. A reação foi interrompida com 50 µL de solução de ácido sulfúrico 2N e lida em comprimentos de onda de 450 nm e 620 nm em espectrofotômetro[116].

## INOCULAÇÃO DOS ANTÍGENOS

Para a inoculação, o animal foi imobilizado em uma mesa por um pesquisador, enquanto outro aplicou o inóculo via subcutânea, em 4 a 5 pontos do dorso do animal. O anestésico ketamina (22 a 50 mg/ Kg) associado à xilazina (5mg/ Kg) foi usado para sedar e produzir efeito anestésico no coelho por 35 minutos.

De acordo com protocolos previamente descritos, os animais receberam o equivalente a $10^6$ parasitos/ Kg de peso, em três doses, sendo realizada uma inoculação a cada 30 dias. A concentração de antígenos utilizada em cada dose foi de aproximadamente 1.000 µg. Hidróxido de alumínio foi adicionado ao extrato antigênico (volume/ volume) e usado nas imunizações[115,117].

## COLHEITAS DE SANGUE

Para a colheita anterior à imunização (pré-imune) e as colheitas para verificação das quantidades de anticorpos, foram obtidos volumes de 3 a 5 mL, e para a colheita final, após o coelho ser eutanasiado, foram colhidos volumes de 30 a 40 mL, sempre da veia auricular. As colheitas de sangue foram realizadas com o animal imobilizado na caixa de contenção, realizando-se a dilatação do vaso com o auxílio de luz infravermelha e assepsia com álcool 70%, introduzindo-se a agulha no vaso central ou vaso marginal (Halow and Lane, 1988).

Para a eutanásia foi administrada uma dose anestésica com ketamina (22 a 50 mg/ Kg) associada à xilazina (5 mg/ Kg), esperando-se que o animal entrasse em anestesia profunda (verificada através das digitais e do globo ocular do coelho), sendo logo a seguir, administrado o dobro da dose anestésica. Ao final, o animal foi colocado na câmara de $CO_2$ para a certificação do óbito[116].

## PURIFICAÇÃO DOS ANTICORPOS POLICLONAIS

Em certas reações seria possível utilizar o soro total do coelho sem realizar a purificação, pois a maior parte dos anticorpos presentes no soro seriam os que foram produzidos contra os antígenos inoculados (*T. cruzi*), no entanto é importante separar a fração das imunoglobulinas, ou preferencialmente os anticorpos específicos, para evitar reações cruzadas nas reações de imunoistoquímica[118,119].

Utilizamos a coluna cromatográfica Protein A-Sepharose CL-4B da Sigma-Aldrich (P3391 Sigma, St. Louis MO, USA) para purificação dos anticorpos, seguindo as instruções do fabricante. Resumidamente, foi feita uma suspensão 1:1 com a resina e o tampão A, presentes no kit de purificação. A mistura foi despejada em uma coluna e lavada com 20 volumes de tampão A. A amostra de soro foi aplicada, e posteriormente lavou-se novamente a coluna com dez volumes do tampão A. Os anticorpos purificados foram eluídos com três volumes do tampão B. Por fim, a coluna foi lavada com mais 20 volumes de tampão A e guardada com tampão A e conservante em temperatura de 2-8º C.

A solução obtida com os anticorpos purificados foi neutralizada com hidróxido de sódio (NaOH) 0,1 M, e posteriormente foi dialisada em sacos de membrana semi-permeável para a concentração da solução e extração dos resíduos de sais presentes no tampão. A força motriz para separação de moléculas grandes de moléculas menores (como aminoácidos, sais e íons) é dada pela diferença de concentração entre as soluções dos lados opostos da membrana[118].

## APÊNDICE 3 – RESULTADOS DA PRODUÇÃO DE ANTICORPOS IgG ANTI-*T. CRUZI*

Dentre os três coelhos utilizados, um veio a óbito no decorrer do experimento, devido a fatores desconhecidos pelos funcionários do Biotério, durante um final de semana. Tal fato ressalva a importância de se trabalhar com três animais. Dos outros dois animais, ao final do experimento, foi possível colher entre 30 e 40 mL de sangue para obtenção do soro.

Os antígenos totais de *T. cruzi* foram extraídos conforme o protocolo descrito, gerando soluções, de 0,5 mg/ mL (ou 500 µg/ mL), quantificadas em espectrofotômetro. Realizamos a concentração dessas amostras (utilizando SpeedVac), até atingirem a concentração usada para inoculação dos coelhos, que foi de 1 mg /mL (ou 1.000 µg/ mL). A partir da solução de antígenos extraídos, foi sensibilizada uma placa de ELISA, usada para o teste de anticorpos IgG anti-*T. cruzi* de soro humano e os soros pré-imunes dos três coelhos, nas diluições de 1/20, 1/80, 1/320 e 1/1280. Após leitura em espectrofotômetro foi observada reatividade até a diluição de 1/320 com o soro humano contendo anticorpos anti-*T. cruzi*, e os resultados foram todos negativos para os soros pré-imunes dos coelhos. Da mesma forma, a cada uma das três inoculações de antígenos nos coelhos, foram colhidos 3 a 4 mL de sangue da veia auricular dos coelhos. Estas amostras foram usadas para a extração de soro e a realização de teste imunoenzimático (ELISA) em placas sensibilizadas com os antígenos extraídos.

Desde a primeiro teste os soros foram reativos com titulação de 1/ 1.280. Além disso, foi possível observar um aumento da intensidade a cada reação. Ao final do experimento, com o soro extraído a partir da sangria final dos coelhos, observamos reatividade na placa até o título de 1/ 1.280. Após a purificação dos anticorpos em coluna cromatográfica com proteína A, conforme descrito na metodologia, e posterior concentração pelo método de diálise, obtivemos um soro com concentração de proteínas de 2,367 mg/ mL, que apresentou reatividade até a diluição 1/640 no ELISA realizado em microplacas sensibilizadas com os antígenos de *T. cruzi*. Este foi o soro utilizado para a padronização e as reações de imunoistoquímica.

# ANEXO 1 - APROVAÇÃO DA COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
INSTITUTO DE MEDICINA TROPICAL DE SÃO PAULO
**COMISSÃO DE PESQUISA E ÉTICA**
**COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS EM PESQUISA**
Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 470
CEP 05403-000 - São Paulo - Brasil
Telefone:(55-11)3061-8650/7025 e 3064-5132 FAX: (55-11) 3064-5132
e 3062-2174
e-mail:**cpq-imt@usp.br**

São Paulo, 30 de maio de 2012.

Ilmo (a)
**Dra. Thelma Suely Okay**
(aos cuidados de Julio Cesar Rente Ferreira Filho)

Em reunião na presente data, a Comissão de Pesquisa e Ética e Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa, do Instituto de Medicina Tropical da Universidade de São Paulo, analisou e **aprovou**, no que diz respeito aos aspectos de natureza da ética em experimentação animal, o projeto de pesquisa classificado sob número **CPE-IMT 2011/131** e intitulado "Monitoramento da carga parasitária por técnica de amplificação quantitativa em sangue e tecidos de camundongos infectados com *Trypanossoma cruzi*, tratados com benznidazol ", sob a sua responsabilidade.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Jorge S.R. Casseb
Professor Doutor do IMT
LIM 56 - FMUSP

Dr. Jorge Casseb
**Presidente**
**Comissão de Pesquisa e Ética do IMT-USP**

Dra. Luciana Regina Meireles Jaguaribe Ekman
**Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa do IMT-USP**