

**Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do derivado
triazólico Ravuconazol utilizando o cão como modelo
experimental**

Autora: Lívia de Figueiredo Diniz

Orientadora: Maria Terezinha Bahia

Co-orientador: Paulo Marcos da Matta Guedes

Ouro Preto, MG

2010

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do derivado
triazólico Ravuconazol utilizando o cão como modelo
experimental**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós- Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas; área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

Ouro Preto, MG

2010

D585a

Diniz, Livia de Figueiredo.

Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* do derivado triazólico ravuconazol utilizando o cão como modelo experimental [manuscrito] /Livia de Figueiredo Diniz. – 2010.

ix, 88 f.: il., color., graf., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Terezinha Bahia.

Co-orientador: Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

1. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 2. Chagas, Doença de - Teses. 3. Quimioterapia - Teses. 4. Resposta imune - Teses. I. Universidade Federal de Ouro Preto. II. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Órgãos financiadores

Drugs for Neglected Diseases *initiative* (DNDi)
FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Ao meu marido Cristiano, pelo companheirismo, doação e incentivo, que são frutos do seu amor; ao meu filho Pedro, que ainda nem nasceu e já me dá estímulo para continuar...

Aos meus queridos pais, Márcio e Sebastiana e à minha família.

Agradeço a Deus pelo maravilhoso presente de viver e por me dar, todos os dias, um novo motivo para viver.

Aos que colaboraram para a realização desse trabalho...

À professora Maria Terezinha Bahia por todos os ensinamentos e pela amizade que construímos ao longo de todos esses anos. Para mim, um exemplo profissional e pessoal; de competência, de equilíbrio, ética e gratidão; obrigada por me ensinar a dar os primeiros passos e enxergar que meu caminho na ciência pode ser muito prazeroso;

Ao professor Paulo Guedes, por ter colaborado imensamente na minha formação; ensinando-me desde os cuidados para com os animais até a realização de todas as técnicas necessárias; a empolgação na interpretação dos resultados e a boa vontade em ensinar;

Ao professor André Talvani, sempre tão solícito, por toda a ajuda oferecida, pela amizade e pelos agradáveis momentos compartilhados;

Ao Ivo, que colaborou grandemente em todas as etapas da realização desse trabalho; sempre tão presente, de bom humor e disposto a ajudar. Ao Rafael, pela ajuda no tratamento dos cães. E a todos os demais amigos do Laboratório de Doença de Chagas, cuja convivência diária sempre tão agradável deixa o trabalho tão suave; Maykon, Jaque, André Gravel, Tassiane, Viviam, Magna, Isabel, Maíra, Álvaro, Carol, Sérgio, Fabiane, Rodrigo, Guilherme, Lílian, Laís, Régia, Auffy, Vítor, Gláucia, Feijoada, Renata, Luiza, Juliane.

Aos professores Marta e Evandro pela boa convivência e pelo aprendizado;

Àqueles que fizeram parte do laboratório e já tomaram outros rumos... Marcela e Lílian, pelos momentos tão agradáveis. Agradeço especialmente ao Geovam Crepalde, companheiro de iniciação científica, pela forte presença em todos os momentos desse

trabalho; desde a criação dos cães até a realização das técnicas. Por todos os agradáveis e engraçados momentos que compartilhamos. À Jú San pela amizade e ajuda recebida nos experimentos com os cães. E à Vanja por todos os ensinamentos;

A todos os companheiros da pós-graduação, especialmente à Roberta;

A todos os professores do curso de pós-graduação;

Ao professor Luís Carlos, professoras Cláudia e Marta; Maria Chaves pela colaboração;

À Cida e Jose pela atenção e disponibilidade;

A todos os colegas dos outros laboratórios, sempre dispostos a ajudar: LIP, LIMP, LBBM e Micro; obrigada pelos vários empréstimos, esclarecimentos de dúvidas...

À Ana Salomé, técnica do nosso laboratório, por ser sempre tão prestativa e agradável; e aos funcionários do Biotério e do canil pelo cuidado com os animais;

À Universidade Federal de Ouro Preto, por toda a minha formação;

À FAPEMIG, pela concessão da bolsa de mestrado;

À DNDi pelo apoio financeiro.

E àqueles que colaboraram para que eu pudesse realizar esse trabalho...

Cristiano, meu esposo e companheiro, que abdicou de muitos dos seus sonhos ou os adaptou às nossas realidades em função de minha carreira acadêmica. Agradeço pela sua presença em minha vida; seu amor, por toda a paciência, carinho e disposição em me ajudar;

Ao meu filho, Pedro, que ainda nem nasceu, mas tanto me estimula a viver e me alegrar, tão grande é o meu amor;

Ao meu pai, que já partiu, mas é presença constante em minha vida, incentivando-me eternamente. Mãe e tia Regina, por todo o amor, conselhos e orações; aos meus irmãos e sobrinhos pelo incentivo e carinho; Célia pelas orações;

À minha segunda família, a República Bicho do Mato, onde vivi tão bons anos de Ouro Preto, a todas as moradoras e ex-alunas; amigas sempre presentes em minha vida. Agradeço especialmente à Jú, que participou de todas as minhas conquistas e desafios e foi quem me incentivou, há muito tempo, a fazer a seleção para estudante de iniciação científica que ocorria no laboratório de doença de Chagas; e à Vanessa, pela amizade, carinho e atenção. À Pauline, por tantos bons momentos e companhia nesse caminho da pós-graduação...

À Priscila e Roberta pela amizade e carinho.

RESUMO

O Ravuconazol é um derivado triazólico de quarta geração que possui potente atividade antifúngica e intensa atividade anti- *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. Neste estudo foi avaliada a atividade do Ravuconazol *in vivo* contra as cepas Y e Berenice-78 do *T. cruzi*, utilizando cães na fase aguda da doença como modelo experimental. A droga foi bem tolerada e não foram observadas reações adversas durante o tratamento utilizando 12,0 mg de Ravuconazol por quilograma de peso corporal durante 90 dias. Em todos os animais a parasitemia foi permanentemente suprimida a partir do primeiro dia de tratamento, independentemente da cepa do parasito. A hemocultura realizada trinta dias após o término do tratamento foi negativa em todos os animais, confirmando a acentuada redução da carga parasitária induzida pela droga. Em acordo com esses resultados, a técnica de PCR realizada um mês após o tratamento revelou resultados negativos em 3/5 e 2/5 dos animais infectados com as cepas Y e Be-78, respectivamente. O tratamento levou à redução significativa nos níveis de anticorpos anti-*T.cruzi* no sangue dos cães, sendo não detectáveis em alguns períodos enquanto a pressão da droga foi mantida; porém, após o término do tratamento, os níveis de IgG total e IgG2 elevaram-se novamente; indicando que a cura parasitológica não foi alcançada. Entretanto, mesmo não sendo capaz de induzir a cura parasitológica, o tratamento com Ravuconazol levou à redução significativa das lesões cardíacas e da expressão de mRNA para IFN- γ no tecido cardíaco nos animais infectados com a cepa Y, enquanto a expressão de IL-10 foi aumentada. Deste modo, conclui-se que o Ravuconazol possui potente atividade supressiva, mas não curativa no modelo agudo da doença de Chagas canina, provavelmente devido às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis nesse modelo (tempo de meia-vida de 8,8 horas). Em humanos, o perfil farmacocinético da droga é mais favorável (tempo de meia-vida de 120 horas), fazendo desse composto um forte candidato à quimioterapia da doença de Chagas humana.

ABSTRACT

Ravuconazole is an experimental triazole derivative with potent and broad-spectrum antifungal activity and also very potent *in vitro* anti-*Trypanosoma cruzi* activity. In this work, we investigated the *in vivo* activity of ravuconazole against Y and Berenice-78 *T. cruzi* strains using acutely infected dogs as hosts. Ravuconazole was well tolerated as no significant side effects were observed during the treatment using 6.0 mg/kg b.i.d (12mg/kg.d.) for up to 90 days. In all treated animals parasitemia was permanently suppressed by the first day of treatment, independently of the parasite strain. Blood culture performed post-treatment was negative in all animals, confirming a marked reduction of the parasite load induced by drug. Consistently, *T. cruzi* blood PCR tests performed one month post-treatment was negative in 3/5 and 2/5 of animals infected with Y strain and Berenice-78 strain, respectively. Treatment led to significant reduction on levels of anti-*T. cruzi* antibodies while the drug pressure was maintained, but after the end of this treatment antibodies levels (IgG and IgG2), though not those of the IgG1 subclass, raising slowly but without reaching the same level of untreated controls, indicating that parasite clearance was not achieved. However, despite being unable to induce parasitological cure, ravuconazole treatment led to a significant reduction of the cardiac lesions and IFN-gamma m-RNA expression in cardiac tissues in animals infected with the Y strain, while IL-10 mRNA expression increased. We conclude that ravuconazole has potent suppressive but not curative activity in canine model of acute Chagas disease, probably due to unfavorable pharmacokinetic properties (half-life 8.8 hours). In man, where the pharmacokinetic profile of the drug is more favorable (half-life 120 hours), it is to be expected that the anti-*T. cruzi* efficacy of ravuconazole should be higher, making it a promising candidate for specific Chagas disease chemotherapy.

RESUMO.....	viii
ABSTRACT	ii
LISTA DE FIGURAS/TABELAS	xii
LISTA DE ABREVIATURAS	xviii
1. Introdução.....	1
1.1. O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	2
1.2. A resposta imune e a imunopatologia da doença de Chagas	4
1.3. A epidemiologia da doença de Chagas.....	7
1.4. Tratamento etiológico da doença de Chagas.....	9
1.5. Outros fármacos com ação anti- <i>T. cruzi</i> e os inibidores da biossíntese do ergosterol	13
1.6. Modelos experimentais utilizados em quimioterapia da doença de Chagas	19
2. Justificativa.....	21
3. Objetivos.....	23
3.1. Objetivo geral.....	24
3.2. Objetivos específicos	24
4- Animais, material e métodos.....	25
4.1. Populações do <i>T. cruzi</i>	26
4.2. Modelo experimental e infecção.....	26
4.3. Drogas.....	27
4.4. Esquema de tratamento	27
4.5. Avaliação do peso dos animais durante e após o tratamento	29
4.6. Definição da cura parasitológica.....	29
4.7. Avaliação do efeito do tratamento na resposta imune	31
4.8. Efeito do tratamento sobre as lesões cardíacas	33
4.9. Análise estatística	34
5. Resultados.....	35
5.1. Avaliação da eficácia do Ravuconazol no tratamento da infecção experimental de cães pelo <i>T. cruzi</i>	36

5.1.1. Definição do esquema terapêutico	36
5.2. Avaliação da atividade tripanocida do RAV sobre as cepas Y e Berenice-78 do <i>T. cruzi</i>	40
5.2.1. Tolerabilidade ao tratamento	40
5.2.2. Curvas de parasitemia	41
5.2.3. Testes parasitológico e molecular	42
5.2.4. Testes sorológicos	44
5.3. Efeito do tratamento nas lesões do tecido cardíaco e na expressão de mRNA para IFN- γ e IL-10.....	47
6. Discussão	52
7. Conclusões.....	67
8. Referências bibliográficas	69

LISTA DE FIGURAS/TABELAS

Figura 1. Via de síntese simplificada das rotas de biossíntese de esteróis.....	15
Figura 2. Estrutura química da molécula de Ravuconazol.....	18
Figura 3. Peso dos cães inoculados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com 1,5; 3,0 e 6,0 mg de Ravuconazol/kg de peso corporal durante 30 dias.....	37
Figura 4. Níveis de IgG detectados no sangue de cães inoculados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com 1,5; 3,0 e 6,0 mg de Ravuconazol/kg de peso corporal durante 30 dias.....	38
Figura 5. Ganho de peso dos cães inoculados com as cepas Y e Be-78 do <i>T. cruzi</i> e não tratados ou tratados com Ravuconazol e Benznidazol.....	41
Figura 6. Curvas de parasitemia dos animais inoculados com 2000 tripomastigotas sanguíneos/kg de peso corporal das cepas Y e Be-78 do <i>T. cruzi</i> e não tratados.....	42
Figura 7. Gel de poliacrilamida mostrando amplificação de fragmentos de DNA do <i>T. cruzi</i> após PCR utilizando os primers S35 e S36, a partir do DNA extraído do sangue de cães inoculados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados ou não.....	43
Figura 8. Gel de poliacrilamida mostrando amplificação de fragmentos de 330 pares de base de minicírculos do <i>T. cruzi</i> após PCR utilizando os primers S35 e S36 , a partir do DNA extraído do sangue de cães inoculados com a cepa Be-78 do <i>T. cruzi</i> e tratados ou não.....	43

Figura 9. Níveis de IgG detectados no sangue de cães inoculados com as cepas Y e Be-78 do <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol, Benznidazol, infectados e não tratados e não infectados.....	47
Figura 10. Níveis de IgG 2 detectados no sangue de cães inoculados com as cepas Y e Be-78 do <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol, Benznidazol, infectados e não tratados e não infectados.....	48
Figura 11. Níveis de IgG 1 detectados no sangue de cães inoculados com as cepas Y e Be-78 do <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol, Benznidazol, infectados e não tratados e não infectados.....	49
Figura 12. Análise semiquantitativa da expressão de mRNA para as citocinas IFN- γ e IL-10; quantificação da inflamação e fibrose no átrio direito de cães inoculados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol, Benznidazol, infectados e não tratados e não infectados e fotomicrografia do infiltrado inflamatório e fibrose do átrio direito desses animais.....	51
Figura 13. Análise semiquantitativa da expressão de mRNA para as citocinas IFN- γ e IL-10; quantificação da inflamação e fibrose no átrio direito de cães inoculados com a cepa Be-78 do <i>T. cruzi</i> e tratados com Ravuconazol, Benznidazol, infectados e não tratados e não infectados e fotomicrografia do infiltrado inflamatório e fibrose do átrio direito desses animais.....	53

Tabela 1. Detalhamento dos grupos experimentais utilizados no estudo.....	28
Tabela 2. Positividade da hemocultura e PCR de cães infectados com a cepa Y do <i>T. cruzi</i> , 30 dias após o tratamento com diferentes doses de Ravuconazol por 30 dias.....	39
Tabela 3. Positividade da hemocultura e PCR de cães infectados com as cepa Y e Be-78 do <i>T. cruzi</i> , 30 dias após o tratamento com Benznidazol e Ravuconazol.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Percentual
°C	Graus Celsius
µg	Micrograma
µl	Microlitros
µm ²	Micrômetros quadrados
µM	Micromolar
ACTH	Hormônio adrenocorticotrófico
Be-78	Cepa Berencice-78
BZ	Benznidazol
DNA	Ácido deoxirribonucléico
c-DNA	DNA complementar
CI	Grupo de animais controle infectado e não tratado
CNI	Grupo de animais controle não infectado
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTP's	Deoxinucleotídeos
EDTA	Ácido etilenodietiletanolamínico
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
HCl	Ácido clorídrico
HE	Hematoxilina - eosina
IBE	Inibidor da biossíntese de ergosterol
IFN-γ	Interferon - gama
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgG 1	Imunoglobulina da subclasse IgG1
IgG 2	Imunoglobulina da subclasse IgG2
IgM	Imunoglobulina M
IL	Interleucina
kDNA	DNA do cinetoplasto

kg	Quilograma
LIT	Liver Infusion Tryptose
M	Concentração molar
ml	Mililitro
mg	Miligrama
mM	Concentração milimolar
Nfx	Nifurtimox
NK	Natural killer
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PP	Período patente
PPP	Período pré- patente
RAV	Ravuconazol
RNA	Ácido ribonucléico
RNA _m	RNA mensageiro
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase após transcrição reversa
SFB	Soro fetal bovino
TAK	Takeda Company
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
TcII	<i>T. cruzi</i> II
TCD4 ⁺	Linfócito T helper
TCD8 ⁺	Linfócito T citolítico
Th1	T helper tipo I
TNF- α	Fator de necrose tumoral α
TGF- β	Fator de transformação crescimento β

1. Introdução

1.1. O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A doença de Chagas, descoberta e denominada tripanossomíase americana em 1909 pelo Dr. Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas (Chagas, 1909), resulta da infecção pelo protozoário *T. cruzi*. Esse parasito digenético, pertencente à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, tem um complexo ciclo de vida, envolvendo várias formas evolutivas nos diversos hospedeiros vertebrados e no inseto vetor, hemípteros da subfamília Triatominae (WHO, 2002). A forma de transmissão epidemiologicamente mais significativa se dá por via vetorial; entretanto, a infecção pode ser adquirida também por transfusão sanguínea, via oral, transmissão congênita e acidentes de laboratório, dentre outras (Dias *et al.*, 1992; Prata, 2001; Remme *et al.*, 2006).

A transmissão vetorial inicia-se na camada dérmica ou mucosa conjuntival, por formas tripomastigotas metacíclicas depositadas junto com as fezes ou urina de triatomíneos durante o seu repasto sanguíneo (Brener, 1987). Uma vez vencida a barreira da pele, as formas tripomastigotas são capazes de invadir uma grande variedade de células do hospedeiro, onde, no citoplasma, diferenciam-se subsequentemente em amastigotas, as formas de multiplicação no hospedeiro vertebrado. As amastigotas dão origem às formas tripomastigotas, as quais rompendo a membrana da célula infectam células adjacentes ou caem na corrente sanguínea, infectando tecidos mais distantes (Ley *et al.*, 1988; Tyler e Engman, 2001). Essas formas podem ser novamente ingeridas pelo triatomíneo, transformando-se em epimastigotas e posteriormente em tripomastigotas metacíclicas, completando o ciclo biológico do parasito (Brener, 1973; De Souza, 1984; Kirshhoff, 1989; Stuart *et al.*, 2008).

Após o contato do *T. cruzi* com o organismo hospedeiro, inicia-se a fase aguda da doença. Passado um período de incubação de uma ou duas semanas, algumas pessoas podem desenvolver sinais e sintomas não específicos, incluindo febre, calafrios, náusea, vômitos e diarreia. Lesão inflamatória no sítio de entrada do parasito (chagoma), edema periorbital unilateral (sinal de Romana), conjuntivite, enfartamento ganglionar, hepatoesplenomegalia, miocardite e meningoencefalite são descritos em pacientes na fase aguda (Hoff *et al.*, 1978; Laranja *et al.*, 1956; Salgado, 1962; Rassi, 1979; Rassi Jr. *et al.*,

2000). O diagnóstico nessa fase da doença é primariamente parasitológico, através do encontro de formas tripomastigotas sanguíneas observadas no sangue e fluido cérebro-espinhal de alguns pacientes. Ocorrem ciclos assíncronicos de multiplicação do parasito, destruição dos tecidos do hospedeiro e infecção de novas células; conseqüentemente há intenso parasitismo tecidual (Tanowitz *et al.*, 2009).

A mortalidade provocada pela doença na fase aguda é de aproximadamente 5%; geralmente resultante de quadros de miocardite ou meningoencefalite em crianças (Barret *et al.*, 2003; Remme *et al.*, 2006). Entretanto, a maioria dos pacientes desenvolve resposta imune celular e humoral efetivas, a parasitemia torna-se subpatente e não há manifestação de sinais e sintomas. Geralmente em 2 a 4 meses, o paciente encontra-se na fase crônica indeterminada da doença, caracterizada pelo baixo parasitismo sanguíneo e tecidual, presença de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* e ausência de manifestações clínicas atribuíveis à infecção; podendo assim permanecer por toda a vida (Dutra *et al.*, 2005; Prata, 2001; Rossi e Bestetti, 1995). Já as formas crônicas sintomáticas – cardíaca, digestiva e mista, manifestam-se de 10 a 30 anos depois, em cerca de 30% dos indivíduos infectados (Andrade, 1958; Prata, 2001). Uma pequena parcela dos pacientes, cerca de 5 a 10%, evolui para as formas crônicas sintomáticas diretamente da fase aguda. (Dias, 1995).

O envolvimento cardíaco é a manifestação mais grave e freqüente, sendo a maior causa de morbidade provocada pela doença de Chagas crônica e tipicamente, leva a arritmias, falência cardíaca, fenômenos tromboembólicos e morte súbita (Chapadeiro, 1999; Rassi Jr. *et al.*, 2000). As manifestações digestivas, denominadas megas – megaesôfago e megacólon, acometem 5 a 10% dos indivíduos infectados (Prata, 2001), sendo atribuídas à destruição de nervos do plexo mioentérico, a qual leva a movimentos peristálticos sem coordenação, hipertrofia muscular e dilatação. Essa condição, na forma mais grave, leva a desnutrição e constipação acentuadas, de difícil tratamento (Tostes Jr. *et al.*, 1994). A forma crônica mista resulta da combinação das formas clínicas cardíaca e digestiva (Prata, 2001).

Diversos estudos buscam elucidar os fatores que podem estar envolvidos na evolução da doença de Chagas. A cepa do parasito e o tropismo tecidual, a carga parasitária, o tempo de infecção e a exposição à reinfeção, bem como as características genéticas do hospedeiro e os fatores relacionados à resposta imune tem sido sugeridos como determinantes da evolução para as diferentes formas clínicas da doença de Chagas crônica (Andrade *et al.*, 1998; Dias, 2000; Sosa-Estani *et al.*, 1998; Dutra e Gollob, 2008).

1.2. A resposta imune e a imunopatologia da doença de Chagas

A primeira etapa que assegura a sobrevivência do *T. cruzi* e o sucesso da infecção é a entrada nas células hospedeiras. Várias moléculas presentes nessas células e na superfície do parasito revelam-se essenciais para o processo ativo de invasão celular e são capazes de estimular a resposta imune inata, a qual está envolvida na resistência à infecção. Essas interações são críticas para o controle imediato da parasitemia, havendo o estabelecimento de um ambiente rico em citocinas e a ativação dos componentes da imunidade inata, como células Natural Killer (NK) e macrófagos (Andrade e Andrews, 2005; Tarleton *et al.*, 2007). Ao mesmo tempo, é observada ativação policlonal de células B e T (Minoprio *et al.*, 1986).

Macrófagos e células dendríticas, ao entrarem em contato com o parasito, sintetizam IL-12 e TNF- α ; essas citocinas ativarão células NK a produzirem IFN- γ e favorecer a diferenciação de linfócitos Th no fenótipo Th1, além de estimular linfócitos B e células T CD8⁺ a produzirem anticorpos e destruir o patógeno, respectivamente. Macrófagos ativados por IFN- γ e TNF- α produzirão óxido nítrico, o qual é primariamente responsável pelo controle da replicação do parasito na fase aguda da infecção (Michailowitsky *et al.*, 2001; Gazzinelli *et al.*, 1992).

Com o progresso da infecção, o número de células secretoras de imunoglobulinas é aumentado e a hipergamoglobulinemia pode ser detectada no sangue. Além da ativação

imune sistêmica, a infecção pelo *T. cruzi* leva à reação inflamatória em alguns órgãos, notavelmente no tecido cardíaco. Essa reação inflamatória local conduz à produção de mediadores inflamatórios, principalmente citocinas e quimiocinas, as quais dirigem a migração de leucócitos para a área afetada, visando à eliminação do parasito. Porém, a ativação exacerbada da resposta imune pode contribuir para causar danos ao tecido hospedeiro, com posterior desenvolvimento de cardiomiopatia, uma característica bem estabelecida em estudos experimentais e utilizando pacientes na fase aguda da doença (Teixeira *et al.*, 2002).

Assim que a parasitemia e o parasitismo tecidual são controlados, na fase crônica, a miocardite, bem como a ativação policlonal de linfócitos é atenuada. Sabe-se que a resposta celular é crítica durante a evolução da doença de Chagas. No estágio inicial, células T CD4⁺ constituem a subpopulação predominante no processo inflamatório do tecido cardíaco de animais infectados (dos Santos *et al.*, 2001) e pacientes chagásicos (d'Ávila Reis, *et al.*, 1993); entretanto, linfócitos T CD8⁺ tornam-se a população celular mais numerosa. Foi observado que linfócitos T CD8⁺ estavam em contato direto com miocardiócitos em destruição, sugerindo fortemente uma ação patogênica destas células na cardiopatia chagásica. Já os linfócitos T CD4⁺ Th1 específicos podem ter múltiplas funções na resistência ao *T. cruzi* e ainda contribuírem como a maior fonte de INF- γ para a ativação de macrófagos. Estes atuam, também, na diferenciação e ativação de linfócitos T CD8⁺, sendo importantes componentes na resistência ao parasito (Brener e Gazzinelli, 1997).

Juntamente à resposta imune celular, a resposta humoral exerce papel importante no controle da parasitemia e na resistência à infecção pelo *T. cruzi* (Krettli e Brener, 1976). A infecção pelo *T. cruzi* leva à ativação policlonal de células B, responsável pela hipergamaglobulinemia observada no sangue (Minoprio *et al.*, 1986). Em humanos ocorre a produção de quatro subclasses de imunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), sendo o controle na produção destas subclasses mediado por diferentes citocinas (Kawano *et al.*, 1994). Anticorpos da classe IgG são produzidos logo no início da fase aguda da doença e reagem principalmente com moléculas de superfície das formas

tripomastigotas. Krettli e Brener (1982) demonstraram a existência de anticorpos protetores contra formas sanguíneas vivas de *T. cruzi*, denominados anticorpos líticos. Esses anticorpos participam da resistência a infecções, sendo importantes no controle do parasitismo.

Embora o papel do parasito na patogênese da fase aguda da doença de Chagas seja bem aceito, sua função na fase crônica da doença foi alvo de controvérsias. Sabe-se que o componente chave associado às manifestações patológicas da doença de Chagas é a inflamação difusa e sustentada dos órgãos afetados, com citólise e fibrose associadas. Esse fato levou diversos pesquisadores a tentarem elucidar a origem e a manutenção dessa resposta inflamatória. Vários estudos relataram que fenômenos auto-ímmunes seriam a causa primária da inflamação persistente associada com as manifestações da doença, incluindo a cardiopatia chagásica crônica. Essa hipótese foi baseada na ausência aparente do parasito nas lesões inflamatórias presentes no coração e trato gastrintestinal, bem como à presença de auto-anticorpos, que seriam resultado de um mimetismo molecular entre antígenos do parasito e moléculas pertencentes ao hospedeiro. De acordo com essa hipótese, o papel do parasito na lesão seria disparar o fenômeno auto-ímmune; não sendo sua presença essencial para o desenvolvimento da patologia associada à doença (Cunha-Neto *et al.*, 1995; Kalil e Cunha-Neto, 1996). Entretanto, esta teoria foi desafiada por novos resultados que, utilizando técnicas mais sensíveis para detecção do parasito, como a reação em cadeia da polimerase (PCR) e imunohistoquímica, conseguiram demonstrar associação da presença do *T. cruzi* com o desenvolvimento das lesões cardíacas e digestivas, bem como com a intensidade do processo inflamatório (Benvenuti *et al.*, 2008; Perez-Fuentes *et al.*, 2003; Schijman *et al.*, 2004; Tarleton *et al.*, 1997, 1999; Vago *et al.*, 2000; Zhang and Tarleton, 1999). Deste modo, atualmente sabe-se que as duas hipóteses não são excludentes. A persistência do parasito é condição necessária e suficiente para gerar e sustentar a resposta inflamatória no tecido infectado, podendo também incluir fenômenos auto-ímmunes (Dutra e Gollob, 2008).

Na tentativa de elucidar o papel do sistema imune na evolução clínica diferencial da doença de Chagas, diversos estudos têm trazido maiores conhecimentos acerca desse

tema. Sabe-se que a resposta anti-*T. cruzi*, mediada por citocinas inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , quando exacerbada, enquanto eficiente na eliminação do parasito, pode levar à patologia do tecido. Para limitar o dano potencial produzido pela resposta inflamatória ou produção excessiva de citocinas, o sistema imune desenvolve uma série de mecanismos imunorreguladores, como a produção de citocinas com função modulatória. Dentre essas, as citocinas IL-10 e TGF- β inibem a produção de IFN- γ dependente de célula T, bem como a síntese de NO e TNF- α por macrófagos (Moore *et al.*, 1993). Hunter *et al.* (1997) demonstraram que apesar de camundongos deficientes na produção de IL-10 desenvolverem menor parasitemia, apresentam índices de mortalidade maiores, mostrando como é essencial o equilíbrio na produção de mediadores pró e antiinflamatórios.

1.3. A epidemiologia da doença de Chagas

A doença de Chagas é endêmica em 21 países das Américas do Sul e Central (Workshop on Chagas Disease, 2007). As tentativas para controlar sua transmissão foram iniciadas pelo próprio Carlos Chagas tão logo a enfermidade foi descoberta. Porém, progressos significativos foram alcançados em décadas recentes. A partir de programas de controle iniciados na década de 70, os quais culminaram com a criação da Iniciativa do Cone Sul, em 1991, foram elaborados planos de ação com dois objetivos principais; sendo o primeiro controlar a infestação domiciliar do então principal triatomíneo transmissor, o *Triatoma infestans*, através de borrifações de inseticidas de ação residual no domicílio e peri-domicílio, além de controlar populações de triatomíneos de outras espécies que pudessem ter importância local. O segundo objetivo foi interromper a transmissão do *T. cruzi* por transfusão sanguínea, através do rigoroso controle sorológico dos bancos de sangue (Dias *et al.*, 2002). A iniciativa obteve grande sucesso. No Brasil, o número de municípios onde havia notificação de infestação pelo *T. infestans* caiu de 711, em 1980, para 3 em 2006. A proporção de bancos de sangue controlados foi de 13% para 99% nesse mesmo período (Workshop on Chagas disease, 2007; Hotez *et al.*, 2004).

Estimuladas pelo sucesso desse programa de controle, outras iniciativas foram lançadas, como a Iniciativa da América Central e do Pacto Andino, em 1997, cujos principais alvos foram o *Rodnius prolixus* e o *T. dimidiata* (Dias *et al.*, 2008; Moncayo, 2003).

Estima-se que, globalmente, o número de mortes por ano causadas por essa doença, tenha caído de 45000 em 1990 para 12500 em 2006, enquanto a incidência anual durante esse período de 16 anos caiu de 70000 para 41000, reduzindo o impacto sócio-econômico provocado pela doença (Dias *et al.*, 2008b). Porém, mesmo com a significativa redução da transmissão, estima-se que 15 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o mundo (WHO, 2007). Devido às migrações, o número de casos tem aumentado na Europa e EUA, e este aumento apresenta riscos adicionais de transmissão através de transfusões de sangue e transplante de órgãos (Schmuñis e Yadon, 2009; WHO, 2008). Além disso, outro desafio que motiva a vigilância epidemiológica continuada diz respeito à domiciliação de triatomíneos antes encontrados apenas no ecótopo silvestre, somada à ocorrência de invasão do domicílio por vetores adultos, na ausência de domiciliação (Dias, 2009; Salvatella, 2007; Workshop on Chagas disease, 2007). Adicionalmente, no Brasil, a persistência de focos silvestres tem sido relacionada com a transmissão oral; via de infecção responsável por aproximadamente 100 novos casos por ano, com ocorrência de óbitos na fase aguda (Dias *et al.*, 2008 a; Dias, 2009). Com a intensa exploração de regiões de floresta, aumenta o número de casos, que se dão, principalmente, através da ingestão de açaí ou caldo de cana contaminados, dependendo da região. No Pará, Nobrega *et al.* (2009) relataram a ocorrência de 176 casos de doença de Chagas aguda durante o ano de 2006.

Deste modo, a doença permanece como um problema de saúde prioritário, pela necessidade de vigilância e controle, pelos custos médicos e sociais necessários ao atendimento das pessoas infectadas, especialmente considerando a ausência de tratamento eficiente e bem tolerado, sobretudo na fase crônica da doença (Morel e Lazdins, 2003).

1.4. Tratamento etiológico da doença de Chagas

Os primeiros compostos ensaiados visando ao tratamento da doença de Chagas foram experimentados por Mayer e Rocha Lima (1912-1914) logo após o descobrimento da doença; porém, nenhum deles foi eficaz. A partir daí, substâncias de diversas classes foram testadas. Incluíam-se nessa lista vários antimaláricos, sais de ouro, bismuto e cobre, violeta genciana, sulfonamidas, ACTH, cortisona, anfotericina B, mais de 30 antibióticos e alguns nitrofuranos (revisado por Coura & Silva 1961; Brener, 1968; Cançado, 1968). Alguns desses compostos exibiam efeito supressivo sobre a parasitemia, mas nenhum levou à cura da infecção.

A partir de 1962, após a reunião do "Grupo de Estudos para o Tratamento da Doença de Chagas", o tratamento da enfermidade passou a ser investigado mediante ensaios clínicos controlados. Dois compostos foram apontados como particularmente eficazes: o nifurtimox (Nfx) foi o derivado 5-nitrofurfuridileno mais ativo ensaiado experimentalmente (Bock *et al.*, 1969) e o benznidazol (BZ), que apresentou alta atividade *in vitro* e *in vivo* contra o *T. cruzi* (Richle, 1973). Empiricamente descobertos no fim da década de 60 e início dos anos 70, estes medicamentos são a única estratégia disponível até a presente data para o tratamento da doença de Chagas (Coura e Castro, 2002; Dias, 2006).

O BZ, como todos os derivados 2-nitromidazóis, inibe a síntese de RNA e proteínas do *T. cruzi* (Polak & Richle, 1978). Seu mecanismo de ação ainda não foi completamente elucidado. Parece atuar por meio de radicais nitrogenados produzidos pelas nitroredutases humanas. Na presença de oxigênio, esses radicais são convertidos em radicais livres. A falta de atividade detoxificante do *T. cruzi* contra esses radicais o faz muito mais sensível que as células humanas. Stoppani (1999) descreveu que o BZ inibe a síntese de DNA, RNA e proteínas, e também acelera a degradação dessas macromoléculas; pode ainda inibir as enzimas encarregadas em manter a integridade do DNA, como as topoisomerases. Geralmente, as crianças toleram melhor o medicamento que adultos, manifestando menos reações adversas. Entretanto, cerca de 30% dos pacientes tratados com BZ apresentam reações adversas dermatológicas e outros 30%

manifestam neuropatia periférica dose-dependente. Já a supressão da medula óssea é raramente observada, levando à interrupção imediata do tratamento. Outras reações incluem anorexia e perda de peso, náuseas, vômito e insônia (Kirchhoff, 2000).

O Nfx atua através da redução do grupo nitro por nitroreduases, ocorrendo a produção de radicais nitroaniônicos os quais reagem produzindo metabólitos de oxigênio reduzidos altamente tóxicos (Docampo & Moreno, 1986; Docampo, 1990). Essa droga induz o aparecimento de reações adversas freqüentes. Queixas em relação ao aparecimento de sintomas no trato gastro-intestinal ocorrem em 30 a 70% dos indivíduos tratados e incluem anorexia, levando à perda de peso, náusea, vômito e desconforto abdominal. Sintomas de toxicidade do sistema nervoso central incluem irritabilidade, insônia, desorientação e, frequentemente, tremores. Sintomas mais sérios, porém menos comuns, incluem parestesias, polineuropatia e neurite periférica. Há também reações adicionais, como vertigem, excitação nervosa, alterações de humor e mialgia. O Nfx teve sua comercialização descontinuada na década de 80 em alguns países; primeiro no Brasil e em seguida na Argentina, Chile e Uruguai.

Estudos recentes confirmaram o efeito tóxico dos radicais livres envolvidos no mecanismo de ação desses medicamentos sobre as células hospedeiras. Os autores demonstraram que o BZ e o Nfx são ativados por enzimas nitroreduases microssomais do pâncreas e coração de ratos de forma dependente do citocromo P450 (Castro *et al.*, 2006; de Mecca *et al.*, 2008).

Diversas triagens clínicas foram realizadas utilizando o BZ e o Nfx. Estes estudos têm demonstrado que a eficácia terapêutica varia de acordo com a fase da doença, a dose e o tempo de tratamento, idade e origem geográfica do paciente, bem como a metodologia utilizada para verificação da cura (revisado por Guedes *et al.*, 2006). Porém, os resultados demonstram claramente que quanto mais cedo é realizado o diagnóstico e iniciado o tratamento, maiores as chances de cura parasitológica. Deste modo, numerosos estudos clínicos demonstram que ambas as drogas têm significativa atividade na infecção congênita, fase aguda e mesmo na fase crônica recente da doença de Chagas (Guedes *et al.*, 2006).

Na terapêutica da doença de Chagas transmitida por via congênita, o tratamento precoce de recém-nascidos com BZ ou Nfx foi efetivo em 66% a 100% dos casos. De forma interessante, notou-se que quando o tratamento foi iniciado em crianças com idade inferior a 3 meses, 100% de cura foi alcançada (Blanco *et al.*, 2000; Russomando *et al.*; 1998; Schijman *et al.*; 2003). Já em crianças de 7 meses a 2 anos de idade e com 3 a 15 anos de idade, os índices de cura foram de 66% e 12,5%, respectivamente, reforçando a necessidade do tratamento precoce (Schijman *et al.*, 2003; Streiger *et al.*, 2004).

Em triagens clínicas realizadas durante a fase aguda da infecção, sendo o tempo de tratamento variado entre os estudos, os autores observaram de 40% a 85% de cura parasitológica, definida como negatificação de todos os testes parasitológicos sorológicos convencionais (Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Caçado, 1999; 2002). Resultados semelhantes foram obtidos no tratamento da fase crônica recente da doença. Esses estudos revelaram índices de cura de 60% a 87% em crianças de até 14 anos, tratadas com BZ, no Brasil e na Argentina (Andrade *et al.*, 1996; Andrade *et al.*, 2004; Andrade e Zicker, 1997; Sosa-Estani *et al.*, 1998; Sosa Estani e Segura, 1999). Entretanto, outros estudos relataram índices de cura menores após o tratamento de crianças e jovens de até 18 anos, com BZ ou Nfx. No Brasil, Silveira *et al.* (2000) observaram apenas 8,3% de cura em pacientes de 7 a 12 anos, residentes em Goiás, onde a transmissão foi interrompida há mais de 10 anos. Solari *et al.* (2001), avaliando crianças de 0 a 10 anos, residentes em diferentes regiões endêmicas no Chile, constataram negatificação dos testes parasitológicos e sorológicos em apenas 2 das 66 crianças tratadas com Nfx. Mais recentemente, num estudo envolvendo 2976 pacientes de 0 a 18 anos, Yun *et al.* (2009) demonstraram níveis de cura variáveis em diferentes regiões geográficas. Observou-se maior sucesso terapêutico no tratamento de crianças e jovens residentes em Honduras e Guatemala (87,1% e 58,1% de cura, respectivamente) enquanto em duas regiões da Bolívia, 5,4 % e 0% de cura foram alcançados. Esses dados basearam-se na soroconversão negativa em 18 a 60 meses após o tratamento.

A variabilidade na eficácia do tratamento pode ser reflexo das diferenças genéticas tanto na população do parasito quanto na dos hospedeiros presentes nas diferentes regiões geográficas onde a doença é endêmica (Yun *et al.*, 2009).

Aliada à incerteza do benefício do tratamento na fase crônica recente, outra grande limitação desses compostos é a baixa eficácia na fase crônica da doença, somada à alta incidência de reações adversas. Menos de 20% dos pacientes tratados nessa fase alcançam a cura parasitológica (Braga *et al.* 2000; Cançado, 2002; Ferreira, 1990; Fernandes *et al.*, 2009; Lauria-Pires *et al.*, 2000; Fabbro de Suasnábar *et al.*, 2000; Viotti *et al.* 1994;). Esses resultados têm sido confirmados pela PCR em modelos experimentais e pacientes (Anez *et al.*, 1999; Britto *et al.*, 2001; Garcia *et al.*, 2005; Martins *et al.*, 2008).

As razões para a diferenças marcantes no efeito antiparasitário desses compostos nas fases aguda e crônica da doença ainda não estão claras, mas podem estar relacionadas com as propriedades farmacocinéticas, como tempo de meia-vida terminal relativamente curto e penetração limitada nos tecidos (Raaflaub, 1980; Raaflaub e Ziegler, 1979; Workman *et al.*, 1984), a qual limitaria sua ação na fase crônica da doença, quando os parasitos estão, em sua maioria, confinados em tecidos profundos e em lenta replicação (Urbina, 1999; Urbina e Docampo 2003). Outro grande obstáculo para obtenção da cura parasitológica é a grande variabilidade genética das populações de parasitos (Brenner e Chiari, 1967) e a existência de cepas naturalmente resistentes às drogas (Filardi e Brenner, 1987), o que pode estar relacionado à origem geográfica das mesmas (Murta *et al.*, 1998).

O tratamento específico anti-*T. cruzi* visa à eliminação do parasito e à cura da infecção. Porém, se mesmo na ausência de cura, o tratamento puder melhorar a condição clínica do paciente, a terapêutica é justificada (Silveira *et al.*, 2000).

A avaliação do efeito do tratamento com BZ e Nfx na evolução da doença resulta em conclusões ainda contraditórias. Segura *et al.* (1994), ao avaliarem camundongos inoculados com o isolado COB do *T. cruzi* e tratados com BZ e Nfx, não observaram diminuição significativa na miocardite encontrada nos animais tratados na fase crônica da infecção em relação aos animais não tratados. Entretanto, outros estudos demonstraram redução do infiltrado inflamatório em animais infectados com diferentes cepas e tratados

com BZ, apesar da intensidade da fibrose ser similar entre os grupos tratados e não tratados (Andrade *et al.*, 1989; Garcia *et al.*, 2005). Avaliando pacientes, alguns autores afirmaram que o tratamento foi associado com negatificação dos testes sorológicos, além de prevenção da evolução clínica e das alterações eletrocardiográficas (Fabbro de Suasnabar *et al.*, 2000; Fragata Filho *et al.*, 1994; Viotti *et al.*, 1994; Viotti *et al.*, 2006). Porém, em outros estudos não foi observada melhora significativa na condição clínica dos indivíduos tratados e, além disso, foi evidenciada a progressão da doença de forma similar entre indivíduos tratados e não tratados. (Lauria-Pires *et al.*, 2000; Macedo e Silveira, 1987; Silveira *et al.*, 2000). Essas diferenças intrigantes são provavelmente relacionadas às diferentes populações do parasito presentes nos vários estudos, em diferentes regiões, bem como esquemas terapêuticos, fase da infecção e tempo de acompanhamento após o tratamento. De forma interessante, os resultados obtidos por Caldas *et al.* (2008), utilizando camundongos infectados com diferentes cepas, corroboram com essa hipótese, permitindo que os autores sugerissem que a eficácia do tratamento em prevenir as lesões da fase crônica é cepa-específica.

Dadas as limitações significativas das drogas disponíveis atualmente, particularmente para o tratamento da doença crônica, a avaliação de novos compostos ou de novas estratégias para o tratamento específico da doença de Chagas (Urbina, 2009a), bem como avaliação do impacto do tratamento na progressão das lesões são necessárias.

1.5. Outros fármacos com ação anti- *T. cruzi* e os inibidores da biossíntese do ergosterol

As exigências mais importantes para uma droga ideal para o tratamento etiológico da Doença de Chagas seriam:

- (i) alta atividade contra as formas de *T. cruzi* presentes nos hospedeiros mamíferos e contra as populações incluídas nas diferentes linhagens genéticas do parasito;
- (ii) eficácia em ambas as fases aguda e crônica da infecção;
- (iii) administração oral em uma ou poucas doses;

- (iv) segurança para uso em crianças e mulheres grávidas;
- (v) baixo custo e alta estabilidade para uma longa vida de prateleira em condições tropicais;
- (vi) acumulação de tecidos e de longa duração meia vida.

Entretanto, ambas as drogas atualmente disponíveis para o tratamento da doença de Chagas não preenchem esses critérios. Ao longo dos anos, diversos compostos têm sido ensaiados. As estratégias para o desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes envolvem a identificação de princípios ativos de plantas, investigação de drogas já utilizadas para o tratamento de outras patologias, ou validação de alvos específicos, identificados dentro de vias metabólicas chave. A escolha de alvos metabólicos é baseada em diferenças moleculares, bioquímicas e/ou fisiológicas entre patógenos e hospedeiros. Dentre os alvos mais promissores, estão os inibidores ou substratos da biossíntese da via de salvação de purinas, inibidores de cisteína proteases, inibidores do metabolismo de pirofosfatases e inibidores da biossíntese de ergosterol, entre outros (Urbina, 2009b).

Os inibidores da biossíntese de ergosterol são os candidatos mais avançados para novos tratamentos da doença de Chagas (Urbina, 2009b). Essas substâncias, desenvolvidas originalmente como drogas antifúngicas, são largamente utilizadas para o tratamento de infecções micóticas. A composição de esteróis em *T. cruzi* é similar àquela encontrada em fungos, sendo o ergosterol e os esteróis tipo-ergosterol os principais componentes da membrana desse parasito (Furlong, 1989). Pesquisas durante as duas últimas décadas demonstram consistentemente que o *T. cruzi*, como a maioria dos fungos, requer esses esteróis específicos para viabilidade e proliferação celular em todos os estágios do seu ciclo de vida. A via de biossíntese de ergosterol em *T. cruzi* tem sido quimicamente validada *in vitro* em diferentes etapas e os inibidores da biossíntese de ergosterol têm efeito reconhecidamente potente sobre a proliferação do *T. cruzi in vitro* e em modelos animais (Urbina, 2009a). Além disso, na maioria dos casos, estes compostos são ativos por via oral, têm amplo espectro de atividade e muito baixa toxicidade (Urbina, 2002; Urbina e Docampo, 2003).

A atividade anti – *T. cruzi* de quatro classes de inibidores da biossíntese de ergosterol foi testada em experimentos realizados *in vitro* ou *in vivo*: inibidores da esqualeno sintase, inibidores da esqualeno epoxidase, inibidores da oxidoesqualeno sintase e os inibidores da C14- α dimetilase. O que diferencia essas classes de compostos é o ponto de inibição na via de síntese do ergosterol, a qual pode ser vista na figura 1.

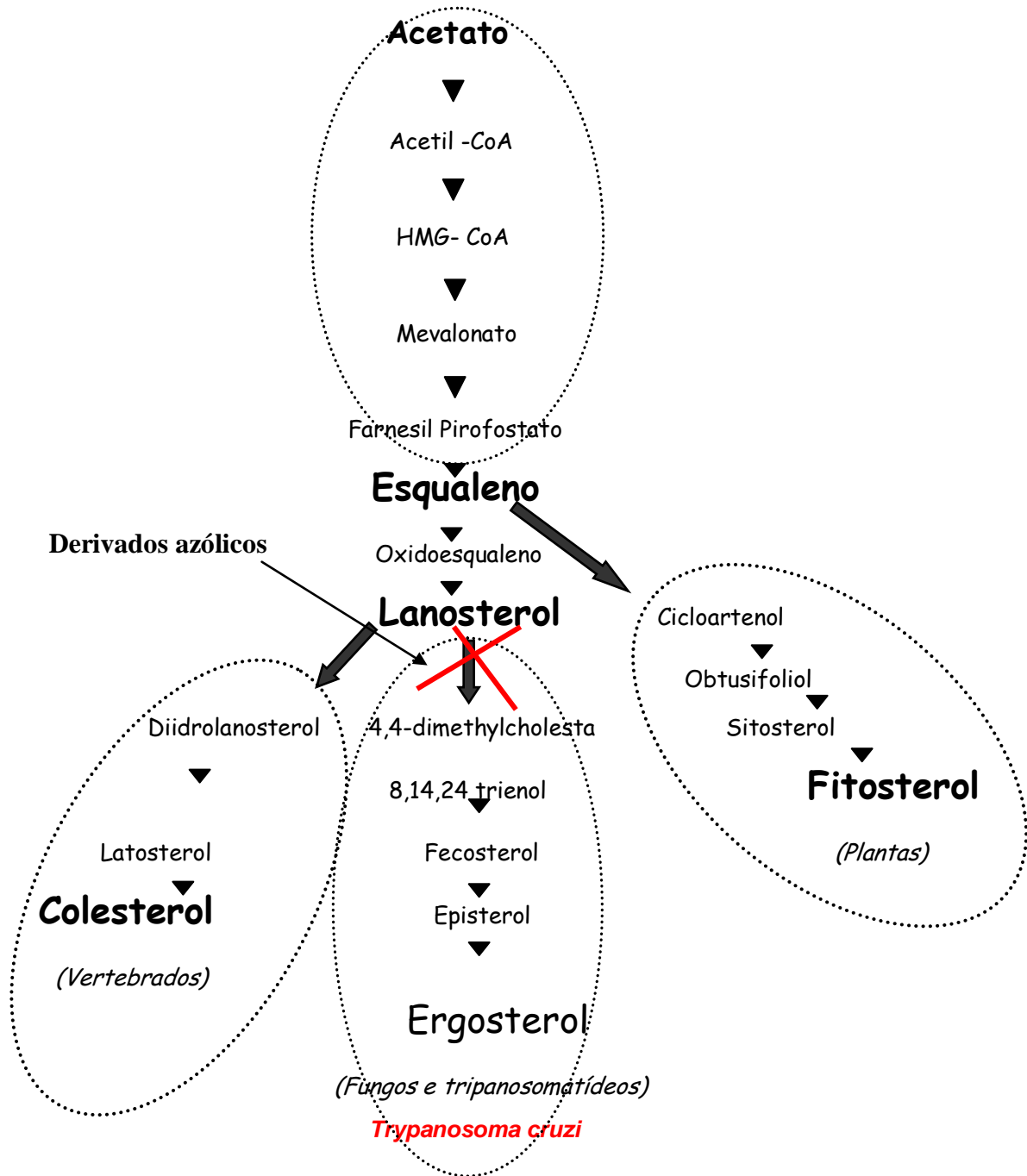


Figura 1. Via de síntese simplificada das rotas de biossíntese de esteróis. Adaptado de Guedes *et al.*, 2006.

Aparentemente, os compostos azólicos são as drogas mais promissoras e os estudos sobre sua atividade anti-*T. cruzi* estão avançados (para revisão, ver Guedes *et al.*, 2006). Em fungos, esses compostos inibem uma enzima da família do citocromo P-450, denominada lanosterol 14 α -dimetilase, causando acúmulo de 14 α -metil-esteróis e a conseqüente diminuição da produção de ergosterol (Joseph-Horne e Hollomon, 1997). Em culturas de epimastigotas de *T. cruzi*, a adição de substâncias da classe dos derivados azólicos leva à completa depleção dos esteróis endógenos do parasito e sua reposição por 4-14 dimetil e tri-metil esteróis, como lanosterol e obtusifoliol (Urbina *et al.*, 2003a; Hankins *et al.*, 2005). Essa correlação confirma que no *T. cruzi*, assim como na via metabólica dos fungos, o alvo primário dessa classe de compostos é a enzima C14 α -dimetilase. Como pode ser observado na figura 1, essa enzima age exclusivamente na via de síntese do ergosterol, não afetando a síntese de outros esteróis, como o colesterol, em mamíferos. Deste modo, sugere-se que as moléculas que agem especificamente sobre essa via, induzam a menos danos nas células hospedeiras e, conseqüentemente, são esperadas menores reações adversas provocadas pelo tratamento.

A marcante atividade antiparasitária dessas substâncias resulta da potente e seletiva atividade intrínseca anti-*T. cruzi* aliada ainda às propriedades farmacocinéticas favoráveis. As concentrações inibitórias contra formas amastigotas intracelulares são da escala nanomolar a subnanomolar; somado a isso, o tempo de meia-vida é longo e o volume de distribuição é largo (Urbina 1999, 2002; Urbina e Docampo, 2003).

Dentre os primeiros compostos dessa classe testados contra o *T. cruzi* e que apresentaram atividade *in vitro*, destacam-se o cetoconazol e o itraconazol. Em camundongos infectados com várias cepas e tratados na fase aguda, os níveis de cura variaram de 0% a 100%. Porém, esses compostos não foram eficazes em curar a infecção crônica em camundongos e pacientes, nem em interromper a progressão da doença (Brener *et al.*, 1993; McCabe, 1988; Moreira *et al.*, 1992; Urbina, 2002).

Os derivados azólicos mais promissores incluem D0870, albaconazol, TAK-187, posaconazol e ravuconazol, os quais mostraram atividade *in vitro* contra epimastigotas e amastigotas com uma concentração inibitória mínima trinta a cem vezes menor que a requerida para o cetoconazol ou itraconazol (para revisão, ver Bahia *et al.*, 2005)

Os compostos D0870 (Zeneca Pharmaceuticals) e o Posaconazol foram capazes de induzir à cura parasitológica em modelo murino, nas fases aguda e crônica, sendo os primeiros compostos a terem atividade em ambas as fases da doença, além de exibir atividade curativa contra cepas resistentes ao BZ e o Nfx, mesmo na presença de imunossupressão (Liendo *et al.*, 1998; Molina *et al.*, 2000b; Urbina *et al.*, 1996; Urbina *et al.*, 1998). Os estudos com o Posaconazol continuam, sendo este fármaco um candidato a triagens clínicas (Urbina, 2009). Entretanto, o desenvolvimento do D0870 foi descontinuado, uma vez que as concentrações plasmáticas após administração variavam muito de camundongo para camundongo, além de induzir reações adversas significativas (Urbina *et al.*, 1996).

O Albaconazol (UR-9825) é outro potente inibidor do citocromo P-450, que exibe grande atividade tripanocida *in vitro* e *in vivo*. Apesar do tempo de meia-vida desse fármaco em camundongos ser muito baixo, induziu a 100% de cura em cães infectados com a cepa Y do *T. cruzi*, enquanto a cepa Berenice-78 foi resistente à droga. Entretanto, o Albaconazol pode ser usado em esquemas terapêuticos longos, com mínima toxicidade (Guedes *et al.*, 2004; Urbina *et al.*, 2000)

O fármaco TAK-187 exibiu alta atividade anti-*T. cruzi* *in vitro*. A atividade *in vivo* foi similar ao posaconazol, induzindo a 60-100% de cura na fase aguda e 56% na fase crônica, em camundongos infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*, incluindo cepas resistentes ao BZ e Nfx (Molina *et al.*, 2000a). Além disso, esse fármaco teve ação superior ao BZ em diminuir a progressão das lesões cardíacas em modelo murino (Corrales *et al.*, 2005).

Recentemente, uma nova classe de inibidores da C14 α -dimetilase, baseado no motivo N-[4-pyridyl]-formamide e derivado de uma triagem de *Mycobacterium*

tuberculosis tem sido descrito; um dos novos compostos foi capaz de erradicar amastigotas intracelulares cultivadas em cultura de macrófagos murinos (Urbina, 2009b).

A molécula **Ravuconazol** (RAV), derivado triazólico de quarta geração, possui alta atividade contra diversas espécies de fungos e leveduras. Esse composto, desenvolvido para o tratamento de infecções fúngicas sistêmicas, exibe alta atividade *in vitro* contra os estágios proliferativos do *T. cruzi*, particularmente contra as amastigotas intracelulares, sendo comparável aos mais potentes derivados azólicos já testados, como o Posaconazol e TAK-187 (Urbina *et al.*, 2003a).

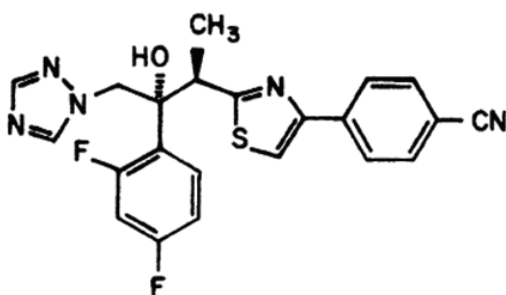


Figura 2. Estrutura química da molécula de Ravuconazol.

Urbina *et al.*, 2003, utilizando modelo murino, demonstraram 70% de cura parasitológica e 100% de sobrevivência quando o RAV foi utilizado em duas doses diárias de 10mg/kg de peso em camundongos infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. Adicionalmente, não foram observadas reações adversas. Porém, o composto não foi capaz de induzir cura quando utilizado para o tratamento da fase crônica da infecção.

Provavelmente o perfil farmacocinético desfavorável em camundongos; com tempo de meia-vida curto, de apenas 4,5 horas, foi responsável pelos baixos índices de cura na fase crônica da infecção observados nesse modelo. Deve ser levado em conta que essas propriedades são particularmente relevantes nessa fase da doença, uma vez que os parasitos estão confinados em tecidos mais profundos, de mais difícil acesso. Porém, a concentração inibitória mínima sobre amastigotas intracelulares, 1 nM, é da ordem de 1000 a 5000 vezes menor que os níveis atingidos no plasma humano com múltiplas doses

orais bem toleradas (Andes *et al.*, 2003; Mikamo *et al.*, 2002). Adicionalmente, a meia-vida do composto no homem é de 120 horas (Grazela *et al.*, 2000). Esses dados enfatizam a necessidade de se testar esse fármaco em um modelo experimental mais adequado, no qual a droga exiba propriedades farmacocinéticas mais favoráveis.

1.6. Modelos experimentais utilizados em quimioterapia da doença de Chagas

O *T. cruzi* pode infectar uma grande quantidade de mamíferos. Em experimentos *in vivo*, o modelo mais amplamente utilizado é o camundongo. De fácil manejo e baixo custo de manutenção, este mamífero mimetiza com fidelidade as características da fase aguda da infecção, com formas tripomastigotas abundantes e facilmente detectáveis no sangue periférico e tecidos (Brener *et al.*, 2000). Em quimioterapia experimental da doença de Chagas, diversos trabalhos demonstram a utilização do camundongo para determinação dos níveis de susceptibilidade de diferentes cepas aos agentes quimioterápicos, revelando resistência natural de determinadas cepas ao BZ e Nfx (Andrade *et al.*, 1985; Andrade *et al.*, 1992; Filardi e Brener, 1987; Toledo *et al.*, 1995; 1997).

Porém, a avaliação da eficácia terapêutica a longo prazo, em experimentos de fase crônica de longa duração, é impossibilitada devido ao tempo de vida relativamente curto desse modelo. Desse modo, camundongos não reproduzem bem as formas clínicas da fase crônica da doença, sendo os padrões eletrocardiográficos incompatíveis com os exibidos na doença humana.

O cão tem sido descrito como modelo para os estudos em doença de Chagas. Esses animais têm um tempo de vida média longo, aproximadamente 20 anos e reproduzem bem a fase aguda da doença, com parasitemia patente e alterações cardíacas; bem como a fase crônica indeterminada (Machado *et al.*, 2001) e cardíaca da doença (Andrade, 1984; Andrade e Andrade, 1980; Barr *et al.*, 1991). Lana *et al.* (1992), utilizaram cães sem raça definida para avaliação do desenvolvimento da doença. Os autores demonstraram que parâmetros como parasitemia, produção de anticorpos (IgM e IgG), achados

eletrocardiográficos, bem como o desenvolvimento da cardiopatia chagásica crônica fibrosante difusa similares à doença humana, foram reprodutíveis nesse modelo. Cruz-Chan, 2009, estudando infecção natural de cães do estado de Yucatán, México, também encontraram alterações eletrocardiográficas típicas da doença.

Guedes *et al.* (2002), avaliaram a utilização do cão como modelo nos estudos de terapêutica específica da doença de Chagas. Ao utilizarem cães sem raça definida infectados com cepas do *T. cruzi* sensíveis, parcialmente resistentes e resistentes ao BZ, mostraram que a resposta terapêutica a essa droga foi similar àquela encontrada em triagens clínicas de pacientes tratados, em ambas as fases da doença. Já em 2008, Guedes *et al.*, avaliaram cães da raça Beagle infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*, demonstrando que esses animais são um bom modelo para o estudo dos mecanismos imunopatogênicos da doença de Chagas, uma vez que reproduzem os achados clínicos e imunopatológicos descritos em pacientes chagásicos.

Deste modo, o cão é considerado um bom modelo para os estudos de quimioterapia anti-*T. cruzi*, uma vez que além de reproduzir bem as diferentes fases da doença e suas implicações, fornece resultados de cura similares aos que são vistos quando o tratamento é realizado em pacientes. Adicionalmente, esses animais podem ser avaliados por um longo período de tempo após o tratamento, contribuindo para responder às questões relacionadas ao impacto do tratamento na evolução das lesões provocadas pelo parasito.

2. Justificativa

A doença de Chagas é uma das mais prevalentes parasitoses encontradas no continente americano. As duas drogas disponíveis para o tratamento dessa enfermidade, o BZ e o Nfx não induzem níveis satisfatórios de cura durante a fase crônica da doença, a qual afeta a maioria dos indivíduos chagásicos. Em adição, reações adversas freqüentes e significativas são decorrentes do tratamento com ambas as drogas. Desse modo, o encontro de compostos que tenham maior eficácia na eliminação da infecção e sejam menos tóxicas para o hospedeiro é urgente.

Nesse sentido, dentre as mais promissoras classes de moléculas com atividade anti-*T. cruzi* encontram-se os derivados azólicos. Esses compostos, desenvolvidos originalmente como anti-fúngicos, inibem uma enzima essencial para a via de síntese do ergosterol também em tripanosomatídeos, a C14 α - dimetilase. O ergosterol é um componente de membrana essencial para proliferação do *T. cruzi* e uma vez que essa enzima catalisa uma reação específica do parasito, sua inibição não afeta o metabolismo de esteróis do hospedeiro, reduzindo a toxicidade do tratamento. O RAV é um derivado azólico de quarta geração que possui potente atividade *in vitro* anti-*T. cruzi*; sendo comparável aos mais potentes compostos já testados contra esse parasito. Entretanto, o RAV foi incapaz de induzir a cura parasitológica em camundongos cronicamente infectados com o *T. cruzi*, provavelmente devido às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis da droga nesse modelo, destacando-se o curto tempo de meia-vida.

Os cães têm sido sugeridos como excelente modelo para quimioterapia experimental da doença de Chagas, uma vez que reproduzem bem as fases aguda e crônica da doença humana, além de apresentarem índices de cura similares aos de pacientes tratados com BZ. O tempo de meia-vida do RAV no plasma de cães é superior ao observado no modelo murino, sugerindo que a atividade tripanocida dessa droga no modelo canino pode ser muito maior. Desse modo, esse estudo aborda a avaliação da atividade tripanocida do RAV na fase aguda da infecção utilizando o cão como modelo experimental,

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral

Avaliar a atividade anti- *T. cruzi* do derivado trizólico RAV utilizando o cão como modelo experimental, bem como o impacto do tratamento na resposta imune e na evolução das lesões cardíacas.

3.2. Objetivos específicos

- 1- Avaliar a tolerabilidade de cães ao tratamento com RAV;
- 2- Avaliar a eficácia do tratamento com RAV, comparativamente à do BZ, em cães infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*, as quais apresentam perfis distintos de sensibilidade às drogas inibidoras da biossíntese de ergosterol; através da avaliação da parasitemia, hemocultura e PCR;
- 3- Avaliar o efeito do tratamento com RAV na evolução das lesões cardíacas de cães infectados com as cepas Y e Be-78 do *T. cruzi* através da quantificação do infiltrado inflamatório e a área preenchida por colágeno no átrio direito dos cães, comparativamente aos animais tratados com BZ;
- 4- Avaliar a cinética de anticorpos IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 no soro de cães infectados e tratados com RAV, comparativamente aos tratados com BZ;
- 5- Avaliar o efeito do tratamento com RAV na resposta imune celular através da análise semi-quantitativa do mRNA para as citocinas IFN- γ e IL-10 no átrio direito dos animais infectados e tratados com RAV, comparativamente aos tratados com BZ;

4- Animais, material e métodos

4.1. Populações do *T. cruzi*

Cepa Y (Silva & Nussenzweig, 1953) – **TcII** (Zingales et al., 2009)

Isolada de um paciente na fase aguda da doença por Pereira de Freitas, em 1950, em Marília, São Paulo e posteriormente estudada e descrita por Silva & Nussenzweig, 1953; esta cepa é considerada parcialmente resistente à quimioterapia com BZ (Filardi e Brener, 1987).

Cepa Berenice-78 (Lana & Chiari, 1986) – **TcII**

A cepa Berenice-78 (Be-78) foi isolada por xenodiagnóstico (Lana e Chiari, 1986), em 1978, de um caso humano, apresentando forma clínica indeterminada, no Brasil; sendo considerada sensível à quimioterapia com BZ. (Filardi & Brener, 1987).

Previamente, nosso grupo demonstrou que as cepas acima citadas possuem graus distintos de susceptibilidade a drogas inibidoras da biossíntese de ergosterol, sendo a cepa Y sensível e a cepa Be-78 resistente aos derivados azólicos no modelo cão (Guedes *et al.*, 2004).

4.2. Modelo experimental e infecção

Foram utilizados quarenta e um cães sem raça definida, com 4 meses de idade, de ambos os sexos, provenientes do canil da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram tratados com ração comercial e água *ad libitum*. Antes do início dos experimentos, foi realizado tratamento com anti-helmínticos e vacinação contra doenças infecciosas (Cinomose, Adenovírus tipo 2, Coronavírus, Parainfluenza, Parvovirose e Leptospirose canina).

Os animais foram inoculados pela via intraperitoneal com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas por quilograma de peso corporal das cepas Y ou Be-78 do *T. cruzi*. Cinco cães constituíram o grupo controle não infectado.

Todos os procedimentos e protocolos foram realizados de acordo com a conduta preconizada pelo COBEA (Colégio Brasileiro em Experimentação Animal) sobre pesquisa em animais. Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Ouro Preto (Processo 2005/47).

4.3. Drogas

As drogas utilizadas foram o derivado triazólico Ravuconazol ([R-(R*,R*)]-4-[2-[2-(2,4-difluorophenyl)-2-hydroxy-1-methyl-3-(1H-1,2,4-triazol-1-yl)propyl]-4-thiazolyl]benzotrile), sintetizado pela Eisai Co. Ltd., Osaka, Japão e Benznidazol [2-nitroimidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazolacetamida)] (LAFEPE).

4.4. Esquema de tratamento

Inicialmente foi realizado um experimento preliminar para definir o esquema terapêutico adequado para a administração de RAV. Para esta avaliação oito cães foram inoculados com a cepa Y do *T. cruzi*. Após confirmação da infecção, dois cães foram tratados com cada uma das seguintes doses diárias: 1,5 mg; 3,0 mg; 6,0 mg de Ravuconazol por quilograma de peso corporal durante 30 dias. Dois animais permaneceram como controle infectado e não tratado. A avaliação da parasitemia foi realizada diariamente até dez dias após a negativização. Durante todo o período de tratamento e até 30 dias após o tratamento, os animais foram examinados diariamente para observação de possíveis reações adversas. Trinta dias após o tratamento, foram realizadas técnicas para avaliação do controle de cura e definição da dose de RAV a ser utilizada.

Posteriormente, 28 animais, após inoculação com as formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y ou Be-78 do *T. cruzi* (14 com cada cepa), foram divididos de acordo com os seguintes esquemas terapêuticos: (i) 5 cães foram tratados com 12,0 mg de RAV por quilograma de peso corporal, divididos em duas doses diárias, durante 90 dias; (ii) 5 cães foram tratados com 7,0 mg de BZ por quilograma de peso corporal, também

divididos em duas doses diárias, por 60 dias; (iii) 4 cães constituíram o grupo controle infectado e não tratado. O tratamento foi iniciado entre o 12^o e o 15^o dias após a infecção para os cães infectados com a cepa Y e entre o 15^o e o 22^o dias após a infecção para os animais infectados com a cepa Be-78, período correspondente ao primeiro dia em que a parasitemia foi detectada pelo exame de sangue a fresco. Cinco cães constituíram o grupo não infectado e não tratado. A tabela 1 sumariza os grupos experimentais acima citados:

Tabela 1: Grupos experimentais avaliados nos experimentos de quimioterapia.

Grupo	Cepa	Droga	Tempo de tratamento	n	Dose(mg/kg)
		Ravuconazol		2	1,5
Teste	Y	Ravuconazol	30 dias	2	3,0
		Ravuconazol		2	6,0
Teste	Y	-	-	2	-
RAV	Y	Ravuconazol	90 dias	5	12,0
RAV	Be-78	Ravuconazol	90 dias	5	12,0
BZ	Y	Benznidazol	60 dias	5	7,0
BZ	Be-78	Benznidazol	60 dias	5	7,0
CI	Y	-	-	4	-
CI	Be-78	-	-	4	-
CNI	-	-	-	5	-

4.5. Avaliação do peso dos animais durante e após o tratamento

Para avaliar a ocorrência de variações no peso dos cães durante o tratamento, os animais foram pesados semanalmente durante todo o período de tratamento e mensalmente após o período de tratamento. O ganho de peso dos animais logo após o tratamento foi calculado subtraindo-se o peso de cada cão um dia após o término do tratamento pelo peso imediatamente antes do tratamento. Já o ganho de peso seis meses após o tratamento foi calculado com base no peso seis meses após o término do tratamento menos o peso imediatamente antes do tratamento.

4.6. Definição da cura parasitológica

Para verificar a ocorrência de cura parasitológica foi utilizada uma bateria de quatro testes independentes:

a) Exame de sangue a fresco. A parasitemia de todos animais foi avaliada diariamente a partir do 10^o dia de inoculação. O sangue foi coletado da veia marginal da orelha dos animais e a quantificação da parasitemia realizou-se de acordo com a técnica descrita por Brener (1962). Após o início do tratamento, a avaliação da parasitemia foi realizada até 10 dias após a sua negatificação; os mesmos períodos foram observados para os animais infectados e não tratados.

b) Hemocultura. A hemocultura foi realizada no 1^o e no 6^o mês após o término do tratamento e nos mesmos períodos nos animais controle. Para a realização da hemocultura foi utilizada a técnica descrita por Chiari *et al.* (1989) modificada. Foram utilizados 10 mililitros de sangue heparinizado, coletado por punção da veia femural. Esse sangue foi transferido para tubo cônico e imediatamente centrifugado a 300g por 10 minutos à temperatura ambiente. O plasma foi cuidadosamente removido para um tubo de 15 ml e adicionados 5mililitros de meio de cultura “Liver Infusion Tryptose” (LIT) (Camargo,

1964), sendo posteriormente centrifugado a 900g por 30 minutos a 4°C. Ao tubo cônico contendo o “pellet” acrescentaram-se 5 mililitros de LIT para o cultivo. Em seguida, o tubo contendo as hemácias foi lavado com meio LIT e centrifugado a 300g por 10 minutos a 4°C. Após a centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e a camada leucocitária removida para um tubo cônico e suspensa em 5 mililitros de meio LIT. Posteriormente, as hemácias foram distribuídas em porções iguais em dois tubos cônicos contendo 5 mililitros de meio LIT cada. Estes tubos foram incubados em estufa a 28°C e gentilmente homogeneizados uma vez por semana. As hemoculturas foram examinadas ao microscópio aos 30, 60, 90 e 120 dias após sua realização para a detecção de parasitos.

c) Reação em cadeia da polimerase (PCR). Dez mililitros de sangue foram coletados no 1º e no 6º mês após o término do tratamento, e nos mesmos períodos nos animais controle. As amostras foram imediatamente misturadas a igual volume de uma solução a 6M de guanidina HCL/0.2M EDTA, mantidas a temperatura ambiente por duas semanas e fervidas por 15 minutos para a separação dos minicírculos do k-DNA (Ávila *et al.*, 1991; Brito *et al.*, 1993).

Foram realizadas três extrações de DNA utilizando a mesma técnica descrita por Wincker *et al.* (1994), mas utilizando 40µg de glicogênio (Boehringer Mannheim) na etapa de precipitação o DNA. As condições de PCR foram as mesmas descritas por Gomes *et al.* (1998), utilizando 20 pmol dos *primers* S35 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') e S36 (5'-GGGTTTCGATTGGGGTTGGTGT-3') (Ávila *et al.*, 1990), os quais são iniciadores específicos para a região conservada do kDNA do minicírculo do *T. cruzi*. A PCR foi processada utilizando 2 µl da solução de DNA de cada amostra, 10mM Tris-HCL (pH 9,0), 75mM KCL, 3,5mM MgCl₂, 0,1% Triton X-100, 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo - dATP, dCTP, dGTP and dTTP (Sigma Chemical Co.), 1.0 unidade de Taq DNA polimerase (Promega), e água para completar o volume final da reação para 20 µl.

Foram realizados 35 ciclos de amplificação em um termociclador automático (*MinCycler TM*), de acordo com as seguintes condições de reação: desnaturação do

DNA a 95° C por 1 minuto (com etapa inicial mais longa de 5 minutos), anelamento a 65° C por 1 minuto seguida por extensão 72° C por 1 minuto. A extensão final foi realizada a 72° C durante 10 minutos.

Os produtos amplificados pela PCR foram analisados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelados pela prata (Santos *et al.*, 1993).

d) Teste sorológico ELISA. O sangue para a obtenção do soro foi coletado de todos os animais antes da inoculação; a seguir foram realizadas coletas mensais até seis meses após o término do tratamento. Nos animais do grupo controle não tratado a coleta de sangue foi feita nas mesmas datas dos grupos tratados. As amostras de soro foram estocadas a -20 °C e os testes de ELISA realizados de acordo com a técnica descrita por Voller *et al.* (1976). O soro foi testado utilizando antígeno de epimastigota da cepa Y do *T. cruzi* obtido de acordo com a metodologia descrita por Vitor e Chiari (1987). Foram utilizados conjugados anti-imunoglobulinas de cão marcadas com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA) para dosagem IgG total e de suas subclasses (IgG1 e IgG2). As placas foram lidas em espectrofotômetro utilizando um filtro de 490 nm (BIO-RAD, 3550). Considerou-se a ELISA positiva quando a leitura em densidade ótica foi maior do que a média, somada a duas vezes o desvio padrão do valor obtido de 10 soros de animais não infectados, testados em paralelo aos soros avaliados (Gusmão *et al.*, 1982) e acrescidos de 10%.

Foi considerado curado o animal que apresentou negatificação dos testes parasitológicos (exame a fresco, hemocultura e PCR) e da sorologia (ELISA).

4.7. Avaliação do efeito do tratamento na resposta imune

a) Reação da Polimerase em Cadeia após transcrição reversa (RT-PCR).

Fragmentos de aproximadamente 50 mg de tecido (átrio direito) foram adicionados a 600 µl de solução desnaturante. A maceração do tecido foi processada com o auxílio de um homogeneizador de teflon, manual. Para a extração do RNA, foram adicionados 30 µl de acetato de sódio e 600 µl de fenol: clorofórmio: álcool isoamílico. Após centrifugação, a fase aquosa superior que contém o RNA foi removida e transferida para outro tubo. Após medir o volume da fase aquosa retirada, o RNA foi ressuspendido com o mesmo volume de isopropanol e então incubado a -20°C por 30 minutos, para precipitação do RNA. Após a centrifugação, removeu-se o sobrenadante e adicionou-se 0,5 ml de etanol 75% ao precipitado. A amostra foi homogeneizada e novamente centrifugada. Após remoção do sobrenadante, o pellet de RNA foi submetido a breve secagem. O RNA foi então dissolvido em 20µl de água RNase-free e quantificado em espectrofotômetro. Para a síntese do cDNA, utilizou-se 1 µg de RNA total, o qual foi tratado com RQ1 RNase-Free DNase (Promega, US), antes da transcrição reversa pela adição de 100 U da enzima SuperScript™ II RNaseH (Invitrogen, US), 10 mM de deoxinucleotídeos (dNTPS) (Invitrogen, US), 0.1 M dithiothreitol-DTT (Invitrogen, US), 1x RNAase H⁻ reverse transcriptase buffer (Invitrogen, US), 1 mg oligo (dT)12–18 primer (Invitrogen, US) e 100 U RNaseOUT™ Ribonuclease inhibitor (Invitrogen, US), totalizando um volume de 20 µl. A reação se processou a 42°C, por 60 minutos. Posteriormente inativou-se a enzima com aquecimento a 70°C por 15 minutos. Após a transcrição reversa, seguiu-se a reação de PCR, utilizando 2µl da solução de cDNA de cada amostra; 0,036µl de MgCl₂ 50mM; 1,2µl de tampão 10X; 1µl de dNTPs 2,5 mM (Promega); 0,1µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl; 0,3µl de cada iniciador (sense e anti-sense) na concentração de 20µM e 7,064µl de água *RNase-free*, perfazendo um volume final de 12µl de reação. Os iniciadores utilizados foram: HPRT (sense: AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA, anti-sense: CAATGGGACTCCAGATGCTT) gerando um produto de 219pb; IL-10 (sense: AGCACCCTACTTGAGGACGA, anti-sense: GATGTCTGGGTCGTGGTTCT) gerando um produto de 249pb (DIALAB, Brasil). Estes iniciadores anelam-se a regiões específicas do gene da HPRT (proteína constitutiva) e das citocinas estudadas (INF-γ e IL-10).

As condições da reação foram: desnaturação do DNA a 94° C por 1 minuto (com etapa inicial mais longa por 2 minutos), anelamento dos iniciadores a 57° C por 1 minuto, extensão a 72°C por 1 minuto e 30 segundos (com etapa final de 6 minutos). Realizaram-se 28, 38 e 40 ciclos de amplificação em um termociclador automático (Eppendorf), para as reações utilizando os iniciadores de HPRT, INF- γ e IL-10, respectivamente.

Na etapa de mistura da reação da PCR foi utilizado controle negativo, substituindo a amostra por água *RNAse-free*.

Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelados pela prata (Santos e cols., 1993). O fragmento amplificado foi monitorado pela utilização de marcadores de peso molecular. Para o cálculo do índice de produção de citocinas, foi utilizado o software Quantity One (Bio-Rad Laboratories, 2006). Dividiu-se o valor da intensidade de cada banda referente ao gen alvo pelo valor da intensidade do gen constitutivo: mRNA citocina/mRNA HPRT.

4.8. Efeito do tratamento sobre as lesões cardíacas

A fim de avaliar o efeito do tratamento na evolução das lesões cardíacas, foi realizada a quantificação dos núcleos celulares e da área ocupada pela fibrose no átrio direito dos animais.

Todos os cães foram eutanasiados por injeção de tiopental sódico (Abbott, São Paulo, Brasil), na dose de 0,5 mg/kg de peso corporal, seis meses após o término do tratamento.

Durante as necrópsias, coletou-se um fragmento de aproximadamente 1.0 x 1.0 x 0.2 cm da parede atrial de cada animal. Os cães dos grupos controle foram sacrificados com a mesma idade daqueles tratados com RAV e com BZ. Os fragmentos do átrio coletados foram fixados em uma solução tamponada de formol, desidratados e embebidos em parafina. Os blocos foram cortados em seções de 4 μ m de diâmetro, corados pela Hematoxilina-Eosina e pelo Tricrômio de Masson para o exame histopatológico rotineiro e para o estudo quantitativo. Foram analisadas 20 imagens, escolhidas aleatoriamente, de

cada corte corado tratado com ambos os corantes (análise de uma área total de $1,25 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ do miocárdio). As imagens foram obtidas por uma microcâmera Leica DM 5000 B (Leica Application Suite, version 2.4.0 R1) e analisadas com o auxílio do software Leica Qwin V3 Image Analyzer. Usando a função de segmentação da imagem, foram escolhidos pixels de referência (cor roxa para núcleos celulares corados pelo HE e azul para o colágeno, corado pelo tricrômio de Masson). Os valores de número de núcleos celulares e a área ocupada pelo colágeno foram comparados entre todos os grupos.

4.9. Análise estatística

Os resultados dos ensaios sorológicos, da expressão de mRNA para citocinas no átrio direito, os dados da análise histológica e de alteração no peso dos animais foram analisados pelo teste não paramétrico de comparação mista de Newman-Kleus. A diferença foi considerada significativa quando o valor de p foi igual ou menor a 0,05.

5. Resultados

5.1. Avaliação da eficácia do Ravuconazol no tratamento da infecção experimental de cães pelo *T. cruzi*

5.1.1. Definição do esquema terapêutico

Em um experimento preliminar, com o objetivo de avaliar a dose ótima de Ravuconazol, bem como a capacidade da droga em suprimir a parasitemia, seis cães foram inoculados com a cepa Y do *T. cruzi*. Dois cães foram tratados com cada uma das seguintes doses: 1,5; 3,0 e 6,0 mg de RAV por quilograma de peso corporal durante 30 dias. A fim de avaliar se o tratamento induziria alguma reação adversa aparente, os animais foram pesados semanalmente, desde antes até logo após o tratamento. Além disso, era realizada a observação diária dos cães, para notificação de alguma alteração no comportamento, queda de pêlos e/ou ocorrência de diarreia. Os resultados indicam que a droga foi bem tolerada e não foram observadas reações adversas, mesmo na mais alta dose testada. A figura 3 mostra a alteração de peso dos cães tratados com RAV comparativamente aos cães infectados e não tratados. Não houve queda de peso significativa nos animais tratados com a dose mais alta testada. Em relação aos outros parâmetros avaliados para esses cães, não se observou queda de pêlo, diarreia ou alteração no comportamento.

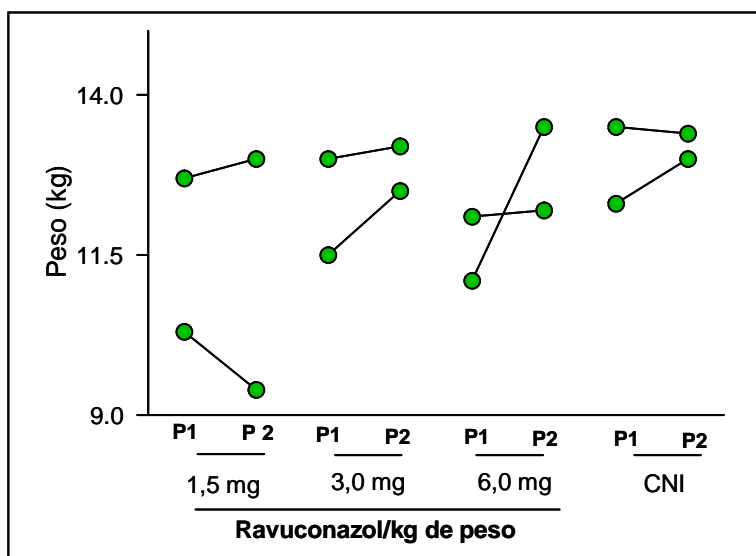


Figura 3. Peso dos cães inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 1,5, 3,0 e 6,0 mg de RAV/ kg de peso corporal durante 30 dias. CI – Cães infectados e não tratados. P1- Peso dos cães antes do tratamento. P2- Peso dos cães imediatamente após o tratamento.

A parasitemia foi suprimida imediatamente após o início do tratamento com RAV. Os resultados do teste sorológico ELISA revelaram intensa queda nos níveis de imunoglobulina G durante o tratamento. Na figura 4 pode-se observar que, apesar dos títulos sorológicos estarem acima da absorbância discriminante, a detecção de IgG no soro dos animais tratados com a dose de 6,0 mg de RAV revelou títulos significativamente menores em relação aos não tratados, durante o período de tratamento e mesmo após o término do mesmo, sugerindo o efeito da droga na redução da carga parasitária. As doses de 1,5 mg e 3,0 mg, apesar de também induzirem a redução dos títulos sorológicos a níveis inferiores aos dos cães não tratados, não tiveram efeito tão pronunciado como o que foi visto quando utilizou-se a dose 6,0 mg.

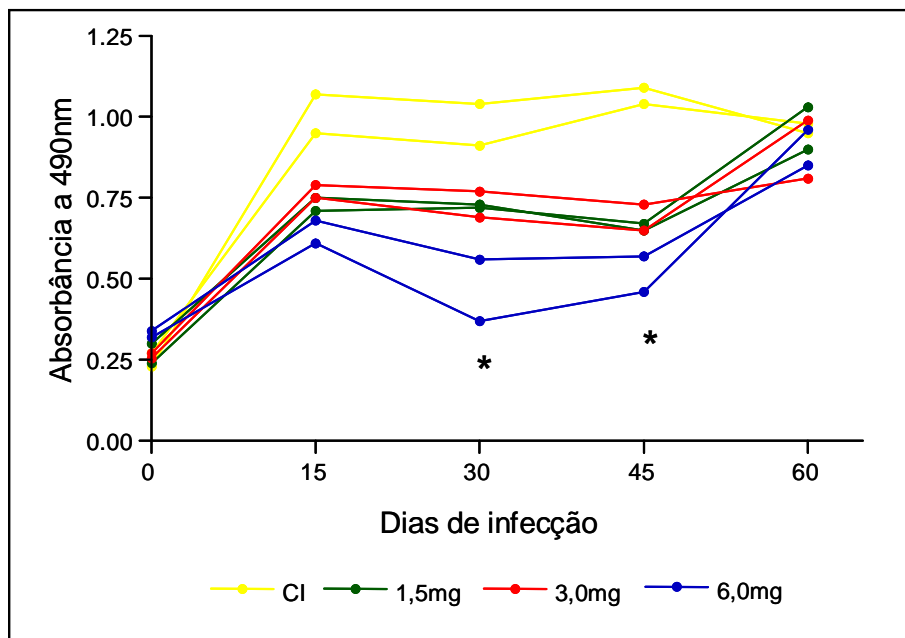


Figura 4. Redução dos níveis de imunoglobulina G no sangue de cães infectados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 1,5, 3,0 e 6,0 mg de RAV/ kg de peso corporal durante 30 dias. CI – Cães infectados e não tratados. Cut-off = 0,310.

* Diferença significativa entre os níveis de IgG detectados para os cães infectados e tratados com 6,0 mg de RAV e os cães infectados e não tratados ($p < 0,001$).

A redução da carga parasitária induzida pelo tratamento com RAV e sugerida pelo exame sorológico foi confirmada pelas técnicas de hemocultura e PCR. O tratamento com 1,5 mg e 3,0 mg não levou à negatização dos testes parasitológicos realizados nos animais tratados com essas doses. Porém, com o uso de 6,0 mg observou-se negatização das técnicas dessas técnicas 30 dias após o término do tratamento (Tabela 2). Em vista desses resultados, considerando o efeito supressor da parasitemia e a ausência de reações adversas, a dose de 6,0 mg de RAV por quilo de peso corporal foi eleita para a realização dos experimentos subsequentes. Porém, de posse dos dados farmacocinéticos da droga (EISAI, Japão), os quais informaram que o tempo de meia-vida da mesma era de 8,8 horas no plasma de cães, houve a necessidade de administração de duas doses diárias de 6,0 mg para os tratamentos realizados posteriormente. Guedes *et al.* (2004), discutiram a necessidade de realização de tratamentos prolongados quando são utilizados compostos da classe dos inibidores da biossíntese de ergosterol, como o RAV. Deste modo, os

próximos resultados referem-se aos tratamentos realizados com 12mg da droga por quilo de peso corporal, sendo 6,0 mg a cada 12 horas, durante 90 dias. Para o tratamento controle com a droga referência, o BZ, utilizou-se o esquema padronizado por Guedes *et al.* (2004); o qual emprega a mesma dose recomendada para o tratamento de pacientes; 7,0 mg de BZ por quilograma de peso corporal, porém divididos em 2 doses diárias, durante 60 dias.

Tabela 2. Positividade das técnicas de hemocultura e PCR realizadas 30 dias após o tratamento de cães infectados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y do *T. cruzi*/Kg de peso corporal e tratados com diferentes doses de RAV.

Cão	<u>Dose de RAV (mg)</u> kg de peso corporal	Hemocultura	PCR
1	1,5	+	+
2	1,5	-	-
3	3,0	-	+
4	3,0	-	-
5	6,0	-	-
6	6,0	-	-
7	CI	+	+
8	CI	+	+

CI – Cães infectados e não tratados.

+/- - Resultado positivo/negativo na técnica.

5.2. Avaliação da atividade tripanocida do RAV sobre as cepas Y e Berenice-78 do *T. cruzi*

5.2.1. Tolerabilidade ao tratamento

Para avaliar a eficácia tripanocida do RAV, foram utilizados cães infectados com as cepas Y e Be-78 do *T. cruzi*, as quais, no modelo canino, apresentam diferentes graus de susceptibilidade aos derivados azólicos, como demonstrado por Guedes *et al.*, 2004, ao estudarem o composto UR-9825 (Albaconazol). A dose de RAV, definida a partir do experimento preliminar já descrito, consistiu em 12 mg/kg de peso corporal, divididos em duas doses diárias de 6,0 mg. O tratamento foi realizado pelo período de 90 dias, sendo iniciado imediatamente após o aparecimento de parasitos no sangue periférico, detectado através da realização do exame de sangue a fresco. Uma vez que o período pré-patente (PPP) foi diferente para as duas cepas, o início do tratamento ocorreu em dias distintos. O PPP observado nos animais inoculados com a cepa Y foi de 12 a 16 dias, enquanto nos cães infectados com a cepa Be-78 esse período foi mais longo, variando de 18 a 22 dias. Em paralelo, foi realizado em outros grupos de cães infectados com as mesmas cepas, o tratamento com a droga referência, o BZ, na dose de 7,0 mg/kg de peso, também divididos em duas doses diárias, por 60 dias. Não havendo mortalidade. Não foram observadas reações adversas, como pode ser demonstrado pelo ganho de peso dos cães, medido imediatamente após o término do tratamento. Em contrapartida, o tratamento com BZ, especialmente quando foi utilizada a cepa Y para a infecção, induziu a uma redução significativa ($p < 0,05$) no peso dos animais nesse mesmo período. Em um cão do grupo infectado com a cepa Be-78 e não tratado foi verificada perda de peso. Quando o ganho de peso foi calculado 6 meses após o tratamento, não observou-se diferença significativa em nenhum grupo, independente da droga utilizada (Figura 5). Adicionalmente, mesmo nesse esquema longo de tratamento, reações como queda de pêlos, diarreia e alterações de comportamento não foram observadas. Esses dados enfatizam a baixa toxicidade do RAV comparativamente ao BZ.

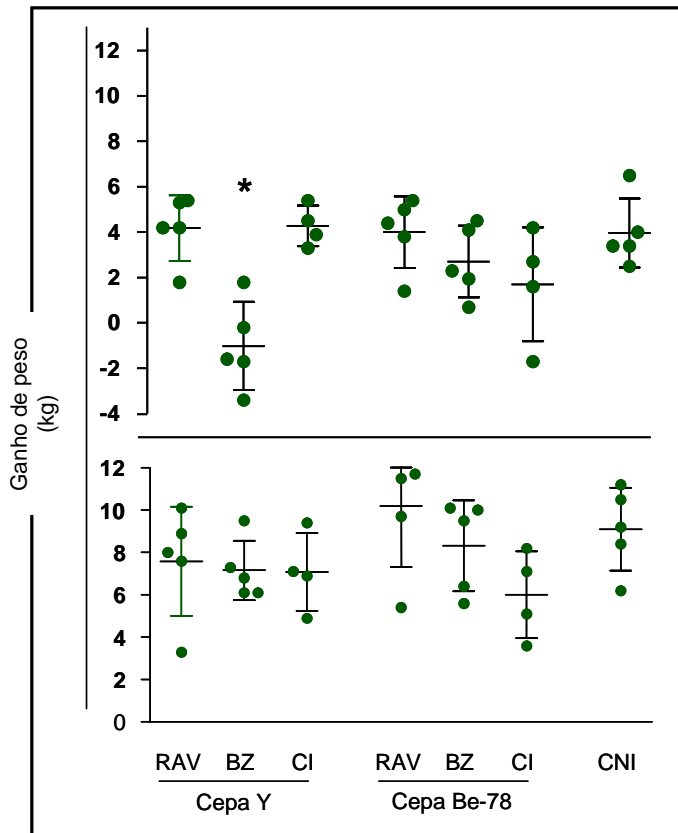


Figura 5. Ganho de peso dos animais inoculados com 2000 tripomastigotas sanguíneos/kg de peso corporal das cepas Y e Be-78 do *T. cruzi* e tratados com 12 mg de RAV por 90 dias; 7,0 mg de BZ por 60 dias ou não tratados (CI). CNI - Cães não infectados e não tratados.

Painel superior – Ganho de peso medido imediatamente após o tratamento. Painel inferior – Ganho de peso medido 6 meses após o tratamento.

* Diferença significativa entre o ganho de peso comparado ao grupo CI, RAV e CNI. $p < 0,05$.

5.2.2. Curvas de parasitemia

A contagem da parasitemia dos animais infectados e tratados ou não foi realizada diariamente, a partir do primeiro dia de parasitemia patente e até 10 dias após a não detecção de parasitos no sangue periférico dos animais. Nos cães tratados com RAV e BZ, a parasitemia foi permanentemente suprimida a partir do primeiro dia após o tratamento, para ambas as cepas. O período pré-patente observado nos cães infectados com ambas as cepas e não tratados foi de 15 a 22 dias, com pico de parasitemia de 25000 formas tripomastigotas sanguíneas por 0,1 ml de sangue e período patente de 12 a 13 dias nos animais inoculados com a cepa Y. Já nos animais inoculados com a cepa Berenice-78, foi observado pico de parasitemia menor, 15000 tripomastigotas em 0,1 ml de sangue e período patente de 10 a 19 dias (Figura 6).

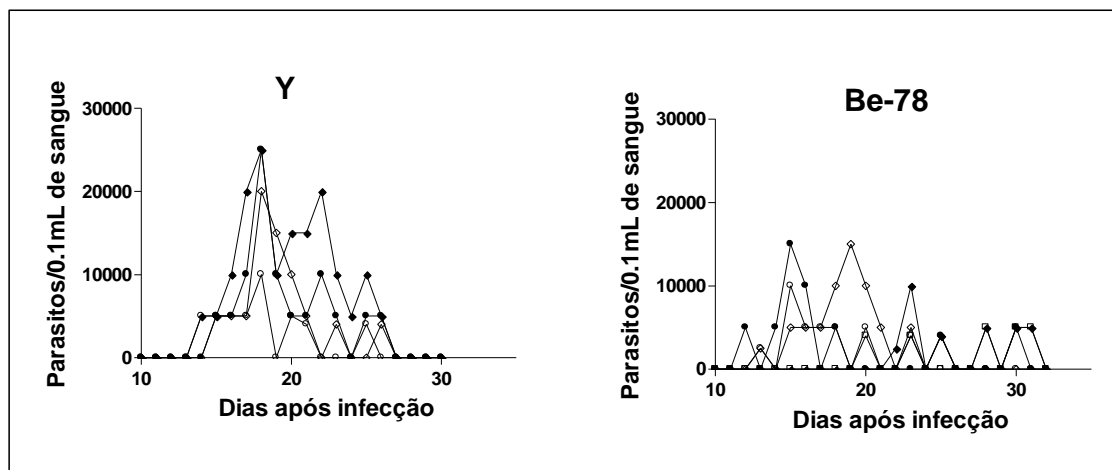


Figura 6. Curvas de parasitemia dos animais inoculados com 2000 tripomastigotas sanguíneos/kg de peso corporal das cepas Y e Be-78 do *T. cruzi* e não tratados.

5.2.3 – Testes parasitológico e molecular

A redução da carga parasitária, demonstrada pela ausência de parasitos no sangue periférico dos animais tratados com RAV e BZ foi confirmada pela diminuição na positividade dos testes parasitológico e molecular realizados 30 dias após o tratamento; uma vez que todos os animais tratados com RAV e BZ tiveram resultados de hemocultura negativos nessa avaliação. A técnica de PCR apresentou, como esperado, maior sensibilidade em detectar a presença do parasito ou seu kDNA. Com relação à cepa Y, dois dos cinco cães tratados foram positivos; já no grupo de animais infectados com a cepa Be-78, três de cinco foram positivos. É importante salientar que houve 100% de positividade nos testes realizados com as amostras dos cães inoculados com ambas as cepas e não tratados, evidenciando a ação supressora do RAV sobre o *T. cruzi*.

Já a coleta realizada seis meses após o tratamento com RAV revelou maior positividade tanto na técnica de hemocultura quanto na PCR; e essa positividade foi maior no grupo de cães inoculados com a cepa Be-78, sabidamente mais resistente à classe de drogas na qual está incluída o RAV. Um cão do grupo inoculado com a cepa Y e quatro cães do grupo inoculado com a cepa Be-78 foram positivos na hemocultura.

Com relação ao resultado da PCR, três dos cinco cães foram positivos, nos grupos infectados com as duas cepas (figura 7 e 8). Esses resultados estão sumarizados na tabela

3, a qual também mostra o número de resultados positivos em relação ao número total de cães de cada grupo. Apesar de ter havido redução da positividade após o tratamento, reafirmando o efeito supressor da droga sobre a parasitemia, os resultados indicaram que a cura parasitológica após o tratamento com a droga teste não foi alcançada. Nos grupos inoculados com ambas as cepas e tratados com BZ, todos os resultados foram negativos, corroborando resultados encontrados anteriormente pelo nosso grupo.

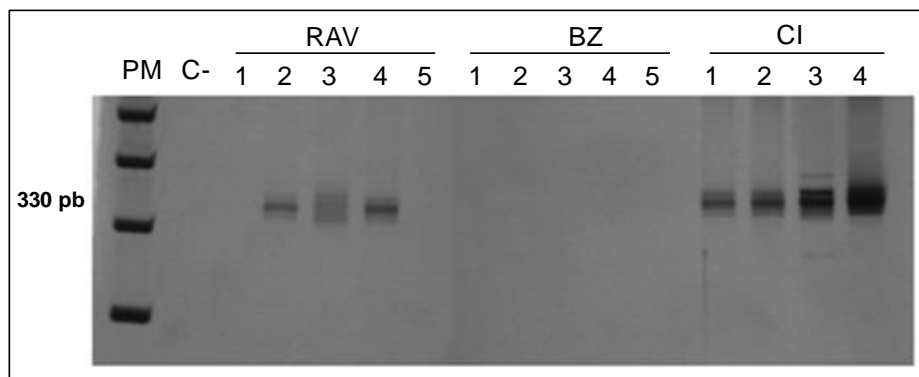


Figura 7. Gel de poliacrilamida mostrando amplificação de fragmentos de 330 pares de base de minicírculos de k-DNA de *T. cruzi* após PCR utilizando os primers S35 e S36, em sangue de cães infectados com 2000 tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 12 mg de RAV por 90 dias (RAV); 7,0 mg de BZ por 60 dias (BZ) ou não tratados (CI). PM: Padrão de peso molecular.

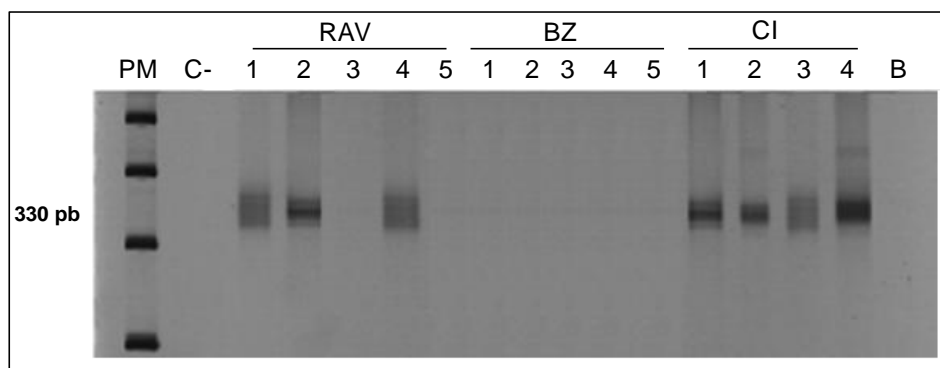


Figura 8. Gel de poliacrilamida mostrando amplificação de fragmentos de 330 pares de base de minicírculos de k-DNA de *T. cruzi* após PCR utilizando os primers S35 e S36, em sangue de cães infectados com 2000 tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal da cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados com 12 mg de RAV por 90 dias (RAV); 7,0 mg de BZ por 60 dias (BZ) ou não tratados (CI). PM: Padrão de peso molecular, B: branco.

Tabela 3. Positividade das técnicas de hemocultura (HC) e PCR realizadas no sangue de cães infectados com 2000 formas tripomastigotas/kg de peso corporal das cepas Y e Berenice-78 do *T. cruzi*, 30 e 180 dias após o tratamento com 12 mg de RAV e 7,0 mg de BZ, divididos em duas doses diárias, durante 90 e 60 dias, respectivamente.

Cepa do <i>T. cruzi</i>	Droga	Hemoculturas +/- n ^o cães		PCR+/ n ^o cães		n ^o total de cães com testes+/n ^o cães – HC e PCR
		30 DAT	180 DAT	30 DAT	180 DAT	
Y	RAV	0/5	1/5	2/5	3/5	4/5
Y	BZ	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Y	CI	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4
Berenice-78	RAV	0/5	4/5	3/5	3/5	5/5
Berenice-78	BZ	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5
Berenice-78	CI	4/4	4/4	4/4	4/4	4/4

+ - indica resultado positivo;

n^o – número;

DAT – dias após o término do tratamento;

5.2.4. Testes sorológicos

Com o objetivo de avaliar as alterações na resposta imune humoral induzidas pelo tratamento, foi avaliada a cinética de produção de anticorpos da classe IgG e das subclasses IgG 1 e IgG2, desde antes da inoculação até seis meses após o tratamento dos animais. Para todos os animais não tratados, as coletas para realização da sorologia foram realizadas nos mesmos períodos. De acordo com a figura 9, pode-se observar que nos cães inoculados com a cepa Y, a soroconversão positiva para IgG total ocorreu anteriormente à detectada nos animais infectados com a cepa Be-78. Durante todo o período de tratamento, a absorbância referente aos anticorpos IgG anti-*T. cruzi* no soro dos cães inoculados com ambas as cepas e tratados com RAV foram significativamente reduzidos ($p < 0,05$) em relação aos cães não tratados. Adicionalmente, os valores foram semelhantes ($p > 0,05$) aos encontrados para os animais tratados com BZ (cães curados).

Nos cães inoculados com a cepa Y e tratados com RAV, os níveis de IgG permaneceram abaixo da absorção discriminante durante e até o término do tratamento. Porém, passados 30 dias após o tratamento, os níveis elevaram-se novamente, indicando falha terapêutica. Quando a infecção foi realizada utilizando-se a cepa Be-78, o tratamento com RAV foi capaz de reduzir significativamente a produção de anticorpos em relação aos cães não tratados, até o último ponto de avaliação, ou seja, 6 meses após o tratamento. Porém, os níveis de IgG permaneceram abaixo da absorbância discriminante a partir do 12º dia de tratamento até o 90º dia, elevando-se ao final desse período.

É importante ressaltar que apesar dos níveis de anticorpos nos cães tratados com RAV elevarem-se novamente, foram significativamente menores em relação aos valores observados para o grupo não tratado no mesmo período. Com relação ao tratamento com BZ, observa-se que a produção de imunoglobulinas foi significativamente menor quando comparada ao grupo não tratado, mesmo após o fim do tratamento, indicando cura parasitológica (Figura 9 A e B).

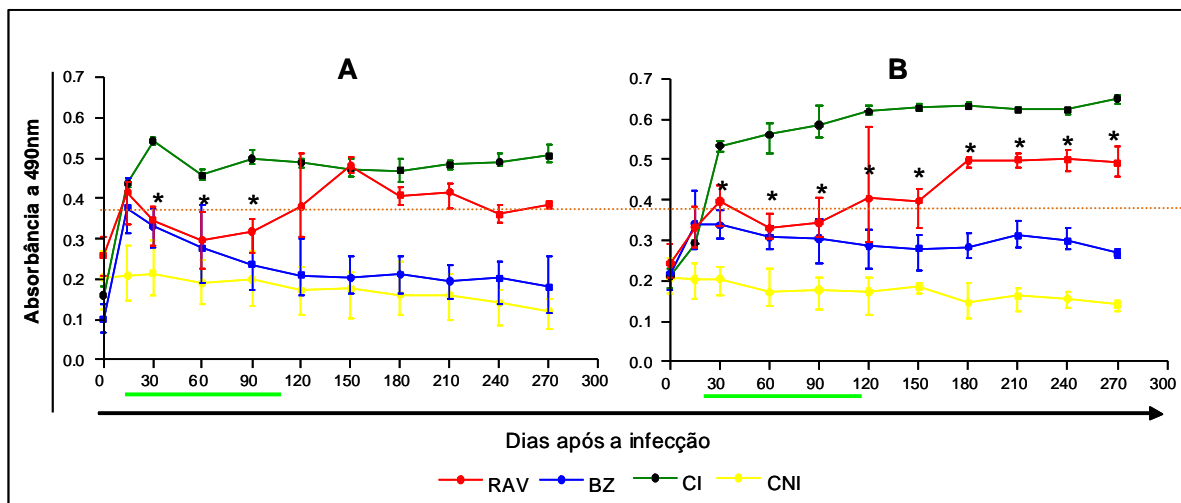


Figura 9. Níveis séricos de anticorpos da classe IgG detectados desde antes da infecção até 6 meses após o tratamento (270 dias de infecção) em cães inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y (A) e Be-78 (B) do *T. cruzi*/kg de peso corporal e tratados com 12 mg de RAV, 7,0 mg de BZ divididos em duas doses diárias e não tratados (CI). CNI – Cães não infectados. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo teste (RAV) e o grupo controle (CI). A linha verde indica o período de tratamento. Cut-off – 0,368.

A curva obtida com a dosagem de imunoglobulinas IgG 2 foi similar à curva de anticorpos IgG total, para os cães infectados com ambas as cepas do *T. cruzi* e submetidos aos diferentes esquemas terapêuticos (Figura 10).

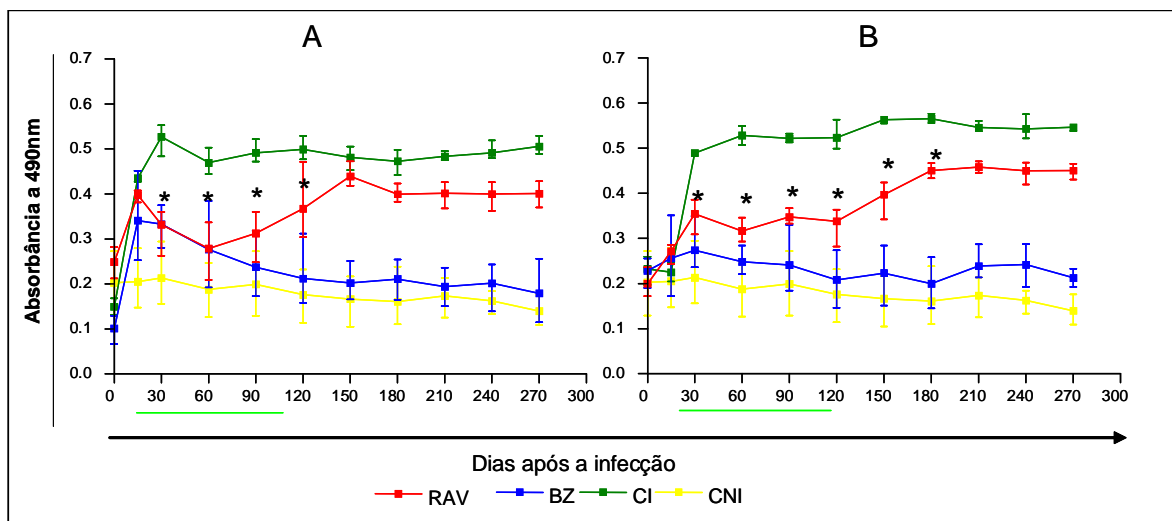


Figura 10. Níveis séricos de anticorpos da subclasse IgG2 detectados desde antes da infecção até 6 meses após o tratamento (270 dias de infecção) em cães inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y (A) e Be-78 (B) do *T. cruzi*/kg de peso corporal e tratados com 12 mg de RAV, 7,0 mg de BZ divididos em duas doses diárias e não tratados (CI). CNI – Cães não infectados. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo teste (RAV) e o grupo controle (CI). A linha verde indica o período de tratamento. Cut-off – 0,346.

A cinética do subtipo IgG1 revelou comportamento diferenciado no que diz respeito à sua produção em animais inoculados com as diferentes cepas e submetidos ou não ao tratamento com RAV e BZ. Não houve diferença significativa na produção deste anticorpo nos grupos inoculados com a cepa Y, independente da infecção ou presença do tratamento. Interessantemente, nos cães inoculados com a cepa Be-78, observou-se um comportamento distinto. Houve diferença significativa na produção de IgG1 entre os diferentes grupos, sendo os títulos significativamente maiores nos animais infectados e não tratados. Curiosamente, os níveis mais baixos desses anticorpos foram observados quando foi realizado o tratamento com RAV (Figura 11).

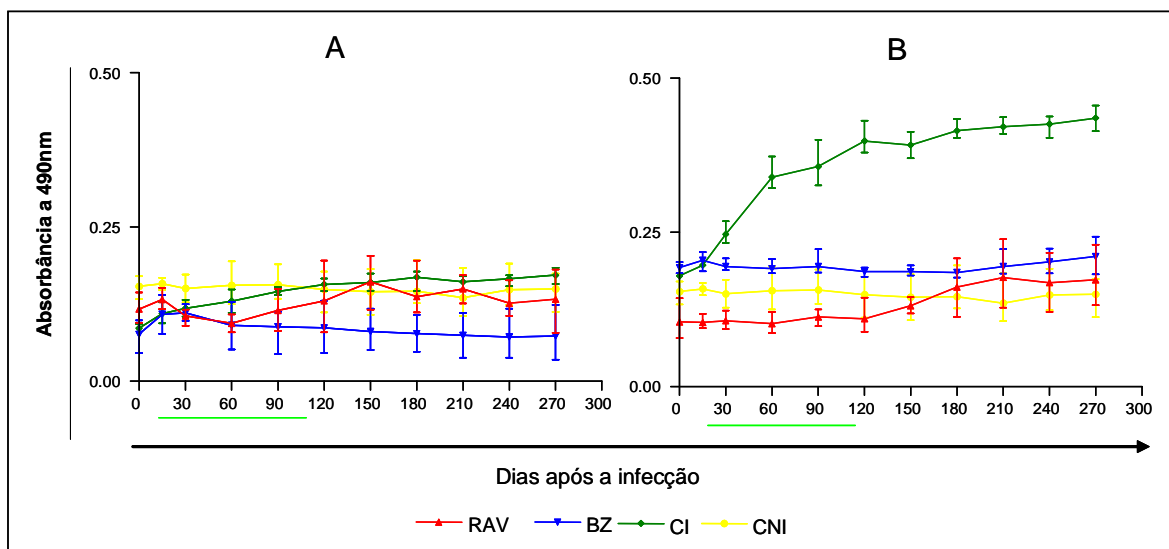


Figura 11. Níveis séricos de anticorpos da subclasse IgG1 detectados desde antes da infecção até 6 meses após o tratamento (270 dias de infecção) em cães inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y (A) e Be-78 (B) do *T. cruzi*/kg de peso corporal e tratados com 12 mg de RAV, 7,0 mg de BZ divididos em duas doses diárias e não tratados (CI). CNI – Cães não infectados. Os asteriscos indicam diferença significativa entre o grupo teste (RAV) e o grupo controle (CI). A linha verde indica o período de tratamento. Cut-off = 0,170.

5.3. Efeito do tratamento nas lesões do tecido cardíaco e na expressão de mRNA para IFN- γ e IL-10

A fim de verificar o efeito do tratamento no desenvolvimento das lesões cardíacas ocasionadas pela infecção pelo *T. cruzi*, realizou-se quantificação da inflamação e fibrose do átrio direito dos cães tratados, comparativamente aos não tratados e aos não infectados. Essa avaliação foi realizada 6 meses após o tratamento, sendo utilizado um analisador de imagens digital para contagem do número de núcleos celulares e área do tecido preenchida por colágeno. Para avaliar o efeito do tratamento na expressão de mRNA para IFN- γ e IL-10 no coração, bem como correlacionar essa expressão com a intensidade das lesões cardíacas, realizou-se também no átrio direito, a análise semi-quantitativa da expressão de mRNA para essas citocinas.

Os resultados indicaram que o tratamento com RAV foi capaz de induzir alterações na intensidade das lesões cardíacas, bem como na expressão do mRNA para as citocinas avaliadas nos diferentes grupos experimentais, especialmente quando foi

utilizada a cepa Y. Nos animais inoculados com a cepa Y, a análise quantitativa do número de células inflamatórias revelou uma redução de cerca de 20% no infiltrado inflamatório presente nos grupos tratados quando comparados ao grupo controle infectado e não tratado. As médias do número de núcleos celulares nos grupos tratados com RAV, BZ e CI foram, respectivamente, $94,23 \pm 28,51$; $90,47 \pm 17,39$; $120,75 \pm 23,46$; revelando uma tendência que é claramente vista no gráfico C da figura 9; as médias dos grupos tratados estão mais próximas à do grupo não infectado, cujo valor foi $100,025 \pm 13,14$ núcleos. Adicionalmente, o tratamento com RAV, bem como com BZ, foi capaz de induzir redução da fibrose, sendo a extensão da área preenchida por colágeno semelhante nesses dois grupos tratados ($p > 0,05$) e significativamente menor em relação ao grupo infectado e não tratado. O grupo não infectado apresentou valores significativamente menores que os demais, como já esperado (Figuras 12C e D).

Quanto à expressão de mRNA para as citocinas IFN- γ e IL-10 no tecido cardíaco, houve comportamento diferenciado entre os cães incluídos nos diferentes grupos experimentais. No grupo infectado com a cepa Y, os cães infectados e não tratados apresentaram valores para expressão de IFN- γ significativamente maiores que os demais. O tratamento com RAV induziu uma redução da expressão de mRNA para IFN- γ de maneira análoga ao tratamento com BZ, sendo os níveis de expressão detectados nos grupos tratados similares ao grupo não infectado ($p > 0,05$). Em contrapartida, os níveis de expressão de mRNA para IL-10 foram semelhantes entre os grupos infectado e não infectado, os quais foram inferiores à média dos grupos tratados tanto com RAV como com BZ. É interessante notar que o tratamento com RAV realizado nos cães infectados com a cepa Y, induziu a alterações na resposta imune, bem como uma diminuição da fibrose, similar ao que foi observado quando efetuou-se o tratamento com BZ (Figuras 12 A e B).

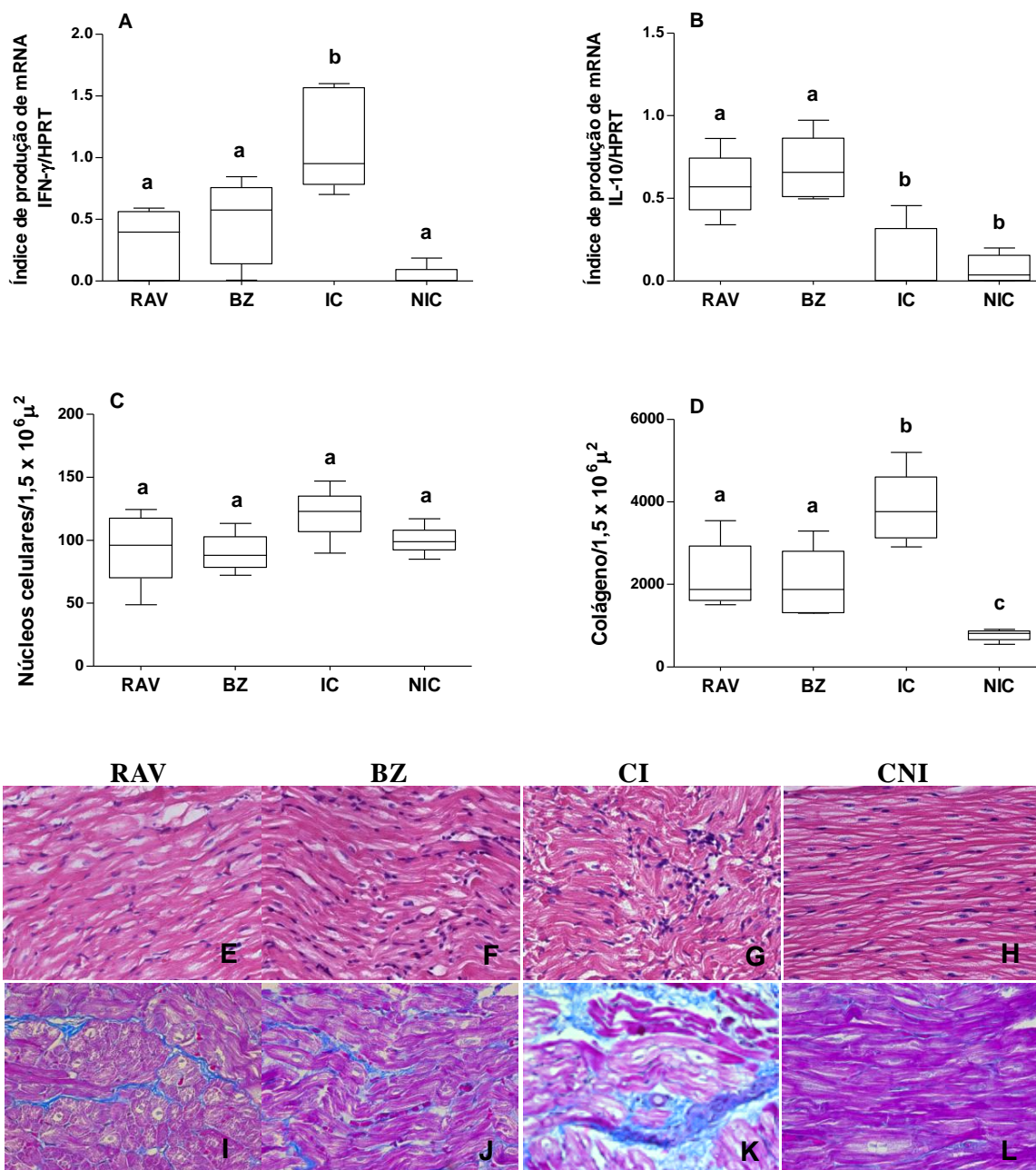


Figura 12. Análise semiquantitativa da expressão de mRNA para as citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B); quantificação da inflamação (C) e fibrose (D) no átrio direito de cães inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal da cepa Y do *T. cruzi* e tratados com 12 mg de RAV por 90 dias (RAV) e 7,0 mg de BZ por 60 dias (BZ) comparativamente aos animais infectados e não tratados (CI) e não infectados (CNI) e fotomicrografias representativas da histologia do átrio direito. E-H: coloração pela hematoxilina-eosina; I-L: coloração pelo tricrômio de Masson. Letras diferentes indicam diferença estatística. Aumento de 400x.

Ao analisar-se o átrio direito dos animais infectados com a cepa Be-78, foi verificado comportamento distinto em relação aos inoculados com a cepa Y. A intensidade do infiltrado inflamatório nos cães infectados e não tratados foi significativamente maior quando comparada ao grupo tratado com BZ e com o grupo não infectado. O tratamento com RAV ao contrário do que pôde ser observado com o tratamento com BZ, não foi capaz de induzir à diminuição da inflamação. Deste modo, a média do número de núcleos celulares no grupo RAV foi semelhante ao grupo infectado e não tratado ($p>0,05$), enquanto os cães tratados com BZ exibiram média semelhante aos não infectados (Figura 13 C). A intensidade fibrose seguiu o mesmo padrão da inflamação; o tratamento com RAV não foi capaz de induzir à diminuição da deposição de colágeno inter-fascicular, sendo o grupo RAV similar ao CI e o grupo BZ similar ao CNI (Figura 13 D). Com relação à expressão de mRNA para IFN- γ , foi observada maior produção desse transcrito no grupo infectado e não tratado, quando comparado aos animais tratados com BZ e RAV, bem como aos CNI. Os valores apresentados pelo grupo tratado com RAV não foram significativamente diferentes de nenhum dos outros grupos experimentais – tratado com BZ, não tratado e não infectado, porém, houve uma clara tendência de maior proximidade do grupo infectado e não tratado. Já a produção de mRNA para IL-10 foi semelhante em todos os grupos inoculados com a cepa Be-78 do *T. cruzi*, independente da infecção ou realização do tratamento (Figura 13 A e B).

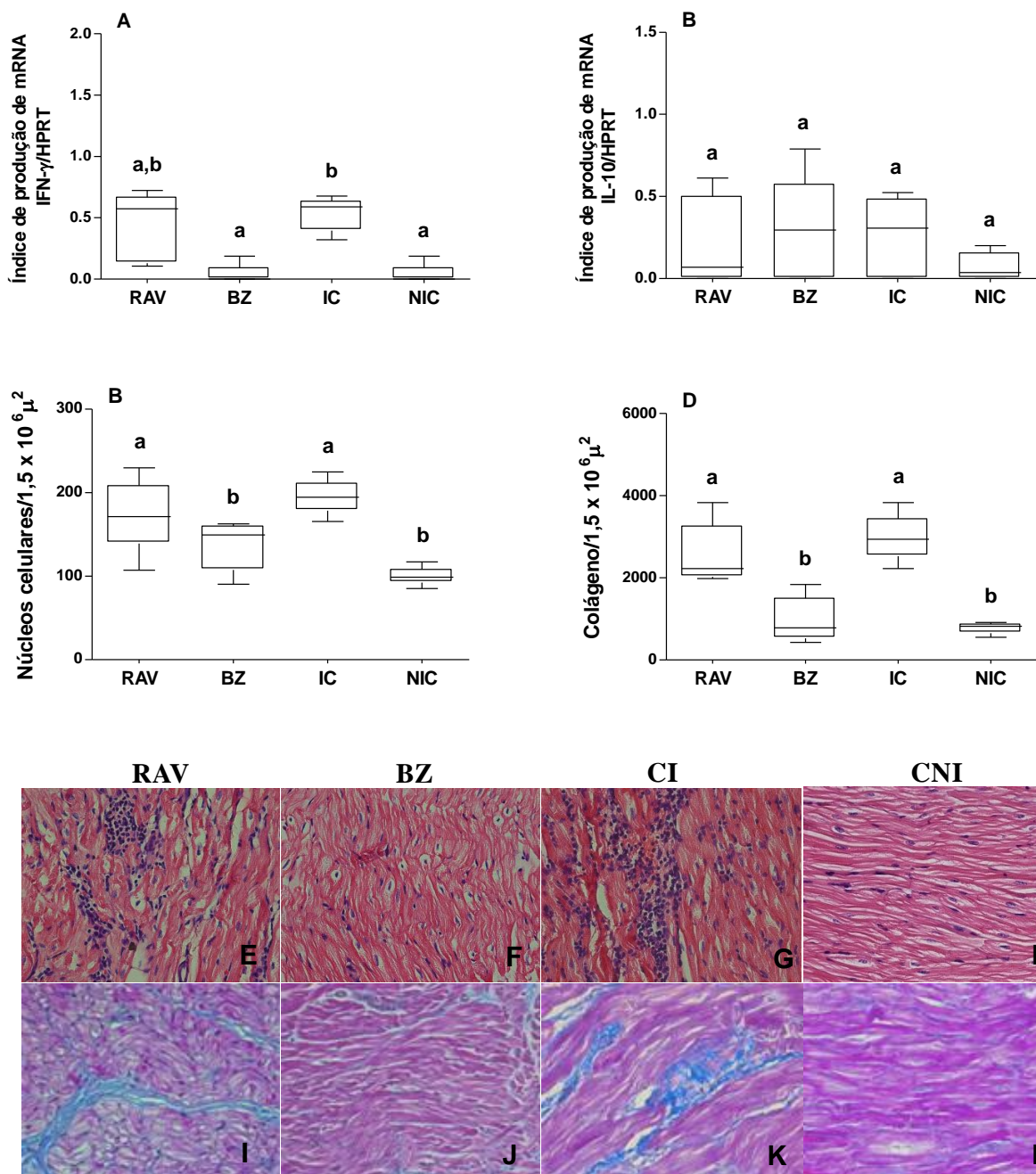


Figura 13. Análise semiquantitativa da expressão de mRNA para as citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B); quantificação da inflamação (C) e fibrose (D) no átrio direito de cães inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal da cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados com 12 mg de RAV por 90 dias (RAV) e 7,0 mg de BZ por 60 dias (BZ) comparativamente aos animais infectados e não tratados (CI) e não infectados (CNI) e fotomicrografias representativas da histologia do átrio direito. E-H: coloração pela hematoxilina-eosina; I-L: coloração pelo tricrômio de Masson. Letras diferentes indicam diferença estatística. Aumento de 400x.

6. Discussão

Os inibidores da biossíntese do ergosterol (IBE) são os candidatos mais promissores para o tratamento específico da doença de Chagas e alguns deles devem ser avaliados em triagens clínicas dentro de um curto período (Urbina, 2009). Dentre as principais vantagens destes compostos, em relação à terapia atualmente usada, incluem-se: (i) a alta eficácia no tratamento da doença de Chagas experimental em ambas as fases, aguda e crônica; (ii) a larga distribuição tecidual, característica extremamente importante, especialmente durante a fase crônica da doença; (iii) a baixa toxicidade para mamíferos, devido ao seu seletivo mecanismo de ação. As limitações estão relacionadas à complexidade e ao custo de fabricação destes compostos, o que torna o tratamento extremamente oneroso (Urbina, 2009).

Entre os IBE avaliados *in vitro*, o RAV foi um dos mais promissores, exibindo potente ação tripanocida (Urbina *et al.*, 2003). A concentração inibitória mínima sobre as formas amastigotas intracelulares, 1 nM, é da ordem de 1000 a 5000 vezes menor que os níveis atingidos no plasma humano com a administração de doses bem toleradas (Andes *et al.*, 2003; Mikamo *et al.*, 2002) e comparável aos mais potentes compostos com atividade anti-*T. cruzi* já testados (Urbina *et al.*, 2003). Devido à sua elevada eficácia *in vitro*, a droga foi testada *in vivo*, utilizando o modelo murino. Entretanto, não foi observada cura parasitológica em camundongos tratados na fase crônica, provavelmente devido às propriedades farmacocinéticas desfavoráveis da droga nesse modelo, especialmente o curto tempo de meia-vida; 4,5 horas. Estudos em modelos experimentais demonstram que um perfil farmacocinético caracterizado por volume de distribuição largo e tempo de meia-vida longo é necessário para manter níveis satisfatórios e sustentados das drogas nos tecidos, a fim de garantir a atividade anti-*T. cruzi* (Urbina *et al.*, 2000; 2003). Desse modo, houve a necessidade de testar o RAV em um modelo experimental no qual essa droga exibisse propriedades farmacocinéticas mais favoráveis.

O cão tem se mostrado um excelente modelo experimental para os estudos de patogênese e quimioterapia da doença de Chagas. Esse animal reproduz bem as fases aguda e crônica da doença humana; apresenta parasitemia patente, fase aguda sintomática e desenvolve tanto a forma clínica indeterminada quanto a cardiopatia chagásica crônica

fibrosante (Andrade e Andrade, 1980; Andrade, 1984; Bahia *et al.* 2002; Barr *et al.*, 1991; Cruz-Chan *et al.*, 2009; Lana *et al.* 1992; Machado *et al.*, 2001). Somado a isso, Guedes *et al.* (2002, 2004), ao tratarem cães sem raça definida com o BZ, demonstraram que a resposta terapêutica a esse fármaco foi similar àquela encontrada em triagens clínicas de pacientes tratados, em ambas as fases da doença. Esses dados sugerem o cão como modelo adequado aos estudos de quimioterapia da doença de Chagas.

Deste modo, este estudo aborda a avaliação da atividade tripanocida do derivado triazólico RAV utilizando o cão como modelo experimental. Inicialmente foi realizado um experimento a fim de definir a dose do fármaco a ser utilizada, bem como observar a tolerabilidade ao tratamento, em animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi*. A dose de 12,0 mg de RAV/kg de peso foi eleita com base na negatificação dos testes de hemocultura e PCR 30 dias após o tratamento; redução significativa dos níveis de IgG anti-*T. cruzi* no soro dos cães durante o tratamento e ausência de reações adversas.

Desta forma, usamos como esquema terapêutico o tratamento com 12mg/kg de peso dividido em duas doses diárias, durante 90 dias. O tempo de tratamento foi determinado tomando como referência os resultados de Guedes *et al.* (2004). Os autores observaram 20% de cura ao tratar cães infectados com a cepa Y com Albonazol, um outro inibidor da biossíntese de ergosterol, durante 60 dias. Porém, quando o tratamento foi realizado por 90 dias, 100% de cura foi alcançada. Concordantes com esses resultados foram as constatações de Urbina *et al.* (2003b), que observaram maiores níveis de cura parasitológica ao aumentarem o tempo de tratamento de camundongos com outro derivado triazólico, o TAK 187. Este fato pode ser explicado considerando-se o mecanismo de ação dessa classe de fármacos, o qual envolve desestabilização da membrana do parasito devido à diminuição da concentração de ergosterol; as células ficam então menos viáveis e a multiplicação é prejudicada. Deste modo, a terapêutica baseada na utilização de fármacos antifúngicos em geral, como o RAV, requer longo tempo de administração da droga a fim de obter eficácia terapêutica.

Para a realização desse estudo, foram utilizadas as cepas Y e Be-78 do *T. cruzi*, devido ao fato de apresentarem diferentes perfis de susceptibilidade aos derivados

azólicos (Guedes *et al.*, 2004). Utilizando o modelo canino da doença de Chagas, esses autores demonstraram que todos os animais infectados com a cepa Y e tratados com Albaconazol alcançaram a cura parasitológica. Em contrapartida, a cepa Be-78 apresentou maior resistência a esse fármaco; todos os animais tratados com Albaconazol apresentaram resultados positivos nos testes parasitológicos realizados até 6 meses após o tratamento, além da soroconversão positiva. Mesmo o esquema terapêutico mais longo, no qual o medicamento foi administrado por 150 dias, não foi capaz de induzir a cura em cães infectados com essa cepa.

O tratamento dos animais foi iniciado no primeiro dia de parasitemia patente, detectada pelo exame de sangue a fresco. Neste caso, a administração de RAV para os animais infectados com a cepa Y foi iniciada entre o 12^o e o 16^o dia e para os cães inoculados com a cepa Berenice-78, entre o 18^o e 22^o dias de infecção. A parasitemia foi suprimida permanentemente após o início do tratamento com RAV, indicando a potente atividade anti-*T. cruzi* deste composto, uma vez que a partir do primeiro dia e até 10 dias após o término do tratamento não foram detectados parasitos no sangue periférico dos animais. Por outro lado, a curva de parasitemia dos cães infectados com ambas as cepas e não tratados revelou período patente de 12 a 13 dias para a cepa Y e 10 a 19 dias para a cepa Be-78. Estes dados estão de acordo com o que há relatado na literatura (Caldas, 2008; Guedes *et al.*; 2007), sendo justificados pelas características biológicas das diferentes cepas do parasito. A cepa Y constitui-se de populações de *T. cruzi* que apresentam formas tripomastigotas predominantemente delgadas, as quais são mais infectivas para as células hospedeiras (Guedes *et al.*, 2007). Conseqüentemente, sua multiplicação e detecção na corrente sanguínea é anterior à observada para cepas com formas predominantemente largas, como a Be-78. Essa apresenta menor taxa de infecção, exibindo período pré-patente maior. Em contrapartida, as cepas delgadas são mais susceptíveis à lise por anticorpos líticos (Krettli & Brener, 1982) desaparecendo mais rapidamente da circulação, o que explica seu período patente mais curto. Foram observados também níveis parasitêmicos mais elevados nos animais inoculados com a cepa Y. Esses resultados são concordantes com diversos experimentos que demonstraram

que as cepas que apresentam predomínio de formas delgadas produzem parasitemias mais elevadas em camundongos e cães infectados quando comparadas àquelas que constituem-se de formas predominantemente largas (Lana e Chiari, 1986; Guedes *et al.*, 2007). O tratamento com RAV, além de efetivo em suprimir a proliferação do *T. cruzi*, não induziu o aparecimento de reações adversas, como perda de peso, alteração de comportamento, diarreia ou alopecia, mesmo no esquema terapêutico de longa duração – 90 dias, utilizando doses altas do composto. Guedes *et al.* (2004), ao tratarem cães infectados com diferentes cepas do *T. cruzi* utilizando outro derivado azólico, o Albaconazol, observaram reações adversas quando utilizaram altas doses do fármaco; as doses de 6,0 e 3,0 mg resultaram no aparecimento de diarreia sanguinolenta, perda de apetite e emagrecimento, além de edema e ulcerações ao longo de todo o trato gastro intestinal. Porém a dose de 1,5 mg de Albaconazol foi bem tolerada pelos animais em esquemas terapêuticos de longa duração. Outro medicamento pertencente à mesma classe das drogas acima citadas, o D0870, testado em camundongos, exibiu intensa atividade tripanocida, porém seu uso foi desencorajado, devido à grande incidência de reações adversas provocadas (Urbina, 1999). Enquanto nos animais tratados com RAV não houve queda de peso, os animais infectados com a cepa Y e tratados com BZ apresentaram, imediatamente após o tratamento, perda de peso significativa. É importante salientar que após o término do tratamento, os animais voltaram a adquirir massa corporal, demonstrando a influência da droga na queda de peso. Esses resultados enfatizam a baixa toxicidade do RAV quando comparado ao BZ e mesmo a outros derivados azólicos, principalmente quando leva-se em consideração que a dose de RAV, 12 mg/kg/dia, foi superior à de BZ, a qual correspondeu a 7 mg/kg/dia. Deve-se levar em conta também o maior tempo de tratamento com Rav, 90 dias, em relação ao tratamento com Bz – 60 dias, ratificando a menor toxicidade do primeiro composto. Quando o ganho de peso foi avaliado 6 meses após o término do tratamento, não foi observada diferença significativa entre nenhum dos grupos, resultado esse justificado pelo longo tempo sem administração da droga.

A avaliação da cura após o tratamento específico da doença de Chagas ainda gera controvérsias. No entanto, a eliminação efetiva da infecção requer negatização dos testes

parasitológicos e sorológicos. Nesse estudo, foram realizados os testes parasitológicos de exame de sangue a fresco hemocultura e PCR, bem como a abordagem sorológica, através da análise cinética da curva de anticorpos IgG anti *T. cruzi*. Foram considerados curados os animais que apresentaram negatificação de todos os testes.

O marcante efeito supressor na parasitemia dos cães tratados foi acompanhado de redução na positividade dos testes parasitológico e molecular, 30 dias após o tratamento. Todos os cães infectados e não tratados apresentaram ambos os testes positivos. Já nos grupos tratados, a hemocultura não foi capaz de detectar parasitos circulantes nesse período. Em humanos, essa técnica é capaz de detectar o parasito em cerca de 20 a 50% dos casos (Castro *et al.*, 1983; Cerisola *et al.*, 1972; Chiari e Brener, 1966; Chiari *et al.*, 1989; Galvão *et al.*, 1993), porém é demonstrado que sua sensibilidade diminui após o tratamento específico com BZ (Silveira *et al.*, 2000; Sosa Estani *et al.*, 1998). Esse fato pode ser explicado pela redução na carga parasitária provocada pelo tratamento, diminuindo assim a probabilidade do parasito estar presente na amostra de sangue analisada. A reação de PCR apresenta maior sensibilidade na detecção do parasito em relação à hemocultura e ao xenodiagnóstico. Gomes *et al.* (1999) e Braga *et al.* (2000) sugeriram que a PCR pode ser efetiva no controle da cura parasitológica em pacientes submetidos à quimioterapia específica. Deste modo, a técnica é uma ferramenta rápida e relativamente mais segura para avaliação da falha terapêutica, permitindo modificação precoce na quimioterapia em casos de resistência ou reativação da infecção (Schijman *et al.*, 2000). Concordantes com essa hipótese, nossos resultados demonstraram que a reação de PCR foi mais sensível que a hemocultura em detectar o parasito, sendo positiva em 2/5 cães infectados com a cepa Y e em 3/5 cães infectados com a cepa Be-78, 30 dias após o tratamento com RAV. Já os animais tratados com BZ apresentaram ambos os testes negativos. De acordo com Castro *et al.* (2002), diferenças na sensibilidade da PCR podem ser explicadas pela presença e quantidade intermitentes do parasito no sangue na data da coleta. Seguindo o mesmo raciocínio, Galvão *et al.* (2003) sugeriram que um único resultado de PCR não pode ser indicativo seguro de cura parasitológica, uma vez que um resultado negativo pode significar ausência do parasito

naquele dado momento. Desse modo, uma nova coleta de sangue de todos os cães foi realizada seis meses após o tratamento. Os resultados indicaram aumento da positividade em relação aos primeiros testes, principalmente em relação à cepa Be-78. Deste modo, todos os cães infectados com essa cepa e tratados com RAV apresentaram resultados positivos. Já no grupo de animais infectados com a cepa Y, apenas um cão apresentou resultados persistentemente negativos.

Por sua baixa sensibilidade na fase crônica da infecção, os testes parasitológicos e mesmo a PCR podem ser persistentemente negativos em indivíduos tratados e não curados. Nesse sentido, juntamente à negatificação desses testes, a queda dos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi* é indicativa de sucesso terapêutico (Cançado, 1963, 1997). Por outro lado, outros autores consideram um longo período de testes sorológicos negativos ou mesmo a queda sustentada destes como critério de cura (Andrade *et al.*, 1996; Rassi e Luqueti, 1992; Sosa Estani *et al.*, 1998). A avaliação da cinética de anticorpos da classe IgG no soro dos animais tratados com RAV revelou que, durante o período de tratamento, os níveis sorológicos observados nos animais infectados com a cepa Y estiveram abaixo da absorbância discriminante e foram significativamente menores quando comparados ao grupo não tratado e semelhantes ao grupo tratado com BZ (cães curados). Os animais infectados com a cepa Be-78 e tratados com RAV também apresentaram valores significativamente menores que os vistos no grupo CI e semelhantes aos tratados com BZ.

Considerando que o parasito desencadeia uma série de alterações no sistema imune e ainda que os anticorpos da classe IgG reagem principalmente contra as formas sanguíneas do parasito, esses resultados indicam a marcante redução da carga parasitária já sugerida pelos testes parasitológicos. Entretanto, após o término do tratamento com RAV, os níveis de IgG elevaram-se novamente, mesmo no cão que apresentou testes parasitológicos negativos, confirmando que os animais não foram curados. Porém, é importante ressaltar que independente do perfil de resistência da cepa, os níveis sorológicos foram, mesmo após o tratamento, significativamente menores que os observados no grupo controle infectado e não tratado. Já os animais tratados com BZ

apresentaram níveis de anticorpos persistentemente abaixo da absorvência discriminante, corroborando dados anteriores (Guedes *et al.*, 2004; Caldas, 2008), bem como os resultados das técnicas de hemocultura e PCR.

A queda dos níveis de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*, mesmo na ausência de cura parasitológica, estão de acordo com os resultados obtidos por outros pesquisadores ao avaliarem o tratamento de modelos experimentais e de pacientes. Guedes *et al.* (2002), ao tratarem com BZ cães na fase aguda e crônica da infecção, observaram decréscimo nos níveis de IgG anti-*T. cruzi* mesmo nos animais considerados não curados pelos testes parasitológicos. Os níveis de anticorpos desses cães foram significativamente menores que os encontrados no soro dos animais não tratados, apesar de serem maiores quando comparados aos animais tratados e curados. Andrade *et al.* (1996), realizando o tratamento de crianças com BZ, observaram diferença na concentração de anticorpos entre os grupos de pacientes que receberam a droga ou placebo. Segundo os autores, observou-se uma redução na concentração de anticorpos, em comparação aos valores obtidos antes do início do tratamento, mesmo nos pacientes que não chegaram a apresentar soroconversão negativa, ou seja, não foram curados. Resultados semelhantes foram observados por Sosa Estani *et al.* (1998) quando trataram crianças na Argentina e por Silveira *et al.* (2000), que ao tratarem crianças residentes em Mambaí, Goiás, observaram uma redução dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* mesmo nos indivíduos não curados.

As principais subclasses de imunoglobulinas envolvidas na eliminação das formas sanguíneas e diminuição dos níveis de mortalidade são IgG 1 e IgG 2 (Brodszyn *et al.*, 1989; Cordeiro *et al.*, 2001). Com o objetivo de avaliar a influência do tratamento com RAV e BZ na produção das diferentes subclasses de imunoglobulinas, foi realizada a avaliação da cinética dos anticorpos IgG1 e IgG2 desde antes da infecção até 6 meses após o tratamento específico. Os níveis de anticorpos IgG2 foram semelhantes aos apresentados para IgG total e significativamente maiores que IgG1. Esses resultados corroboram aqueles obtidos anteriormente pelo nosso grupo (Guedes *et al.*, 2007; Guedes *et al.*, 2008; Caldas, 2008), bem como por outros pesquisadores ao estudarem a influência

da quimioterapia específica na resposta imune humoral (Cruz-Chan *et al.*, 2009). De forma interessante, o perfil cinético traçado para as dosagens do subtipo IgG1 foi cepa-dependente. Nos cães infectados com a cepa Be-78, o grupo CI exibiu valores ascendentes de absorvância até os 120 dias de infecção, estabilizando-se em seguida. Entretanto, os cães tratados com BZ, os quais foram considerados curados, apresentaram, durante todo o período de avaliação, valores próximos, porém superiores à absorvância discriminante. Já os animais tratados com RAV e não curados, exibiram valores de absorvância abaixo da discriminante e semelhantes aos animais não infectados. Quando a infecção foi realizada com a cepa Y, os níveis de IgG1 foram similares entre os diferentes grupos, independente do tratamento e mesmo da presença do parasito, permanecendo, por todo o período de avaliação, abaixo da absorvância discriminante. Esses resultados são concordantes com aqueles encontrados por Caldas (2008) ao estudarem a cinética dos mesmos anticorpos em cães infectados com a cepa Be-78 e tratados com BZ. Os autores encontraram níveis similares de IgG 1 no soro dos animais tratados curados, tratados não curados e não tratados, sugerindo então que o esse anticorpo não é um bom marcador de cura após o tratamento específico.

Guedes *et al.* (2009) sugeriram que os níveis de IgG 1 podem funcionar como marcador de proteção cardíaca. Estudando cães da raça Beagle infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*, os autores observaram que nos animais que foram infectados as cepas que induziram menor lesão cardíaca, no caso, a cepa Be-78, houve maior produção desse subtipo de imunoglobulina. Em contrapartida Cruz-Chan *et al.* (2009), avaliando cães sem raça definida e naturalmente infectados com o *T. cruzi*, correlacionaram a produção de IgG 1 com dano cardíaco, avaliado pela intensidade do processo inflamatório e fibrose em diferentes regiões do coração. Corroborando esses resultados, bem como com os que foram encontrados em nosso estudo, Caldas (2008) encontraram níveis de IgG1 significativamente aumentados ao estudarem cães sem raça definida infectados com a cepa Be-78, os quais apresentaram intensa lesão tecidual. A discrepância entre os resultados pode ser devida à genética do hospedeiro, uma vez que foi utilizada a mesma

cepa nesse estudo e no de Guedes (2009), sugerindo maior resistência dos cães da raça Beagle frente à infecção pela cepa Be-78.

Atualmente sabe-se que o parasito é condição suficiente e necessária para gerar uma resposta inflamatória Th1 no tecido parasitado, podendo incluir também fenômenos auto-ímmunes (Cunha-Neto *et al.*, 2007; Tarleton, 2003; Tarleton *et al.*, 1997), sugerindo que a diminuição da carga parasitária é, associada ou não a outros fatores, condição fundamental para diminuição das lesões. Neste contexto, é de extrema importância o encontro de drogas que exibam atividade anti-*T. cruzi*, sendo capazes de interferir na progressão das lesões cardíacas, mesmo quando não induzem à cura parasitológica (Urbina, 2009).

Com o objetivo de avaliar o impacto do tratamento e conseqüente redução da parasitemia na evolução das lesões cardíacas, realizou-se a análise quantitativa do número de células inflamatórias e da área preenchida por colágeno no átrio direito dos cães tratados, paralelamente aos não tratados e aos não infectados. Essa região do coração foi escolhida com base no fato que o átrio direito é uma das áreas mais afetadas pela miocardite chagásica (Rossi, MA, 1998; Cruz-Chan *et al.*, 2009).

Nossos resultados indicam que a presença e intensidade das lesões cardíacas estão associadas com a cepa do parasito e à sua sensibilidade às drogas utilizadas no tratamento. Apesar de não haver induzido a cura parasitológica, o RAV mostrou-se efetivo em reduzir as lesões cardíacas nos animais infectados com a cepa Y, a qual é sensível ao tratamento com IBE. Foi detectada correlação entre a supressão da parasitemia provocada pelas drogas e a intensidade da fibrose observada no átrio direito dos animais. A área ocupada por colágeno foi significativamente menor nos grupos tratados com RAV e BZ quando comparada ao grupo CI; e ainda similar à observada nos animais não infectados, demonstrando o efeito benéfico do tratamento com RAV, mesmo na ausência de cura. Esses resultados estão em acordo com os encontrados por Caldas (2008) ao tratar com BZ cães sem raça definida infectados com a cepa Y e podem ser explicados com base na diminuição da carga parasitária provocada pelo tratamento, reduzindo assim a intensidade da fibrose.

Com relação aos animais infectados com cepa Be-78, efeito distinto foi observado nos cães tratados com RAV, o qual pode ser justificado com base na maior resistência dessa cepa aos IBE, como demonstrado no trabalho de Guedes *et al.* (2004). Apesar do tratamento com RAV induzir à supressão da parasitemia durante o tratamento dos cães infectados com essa cepa, esse efeito não foi suficiente para reduzir a intensidade das lesões teciduais detectadas na fase crônica da infecção, sendo o número de células inflamatórias e a área preenchida por colágeno observadas nos cães tratados similares aos infectados não tratados. Já o tratamento realizado com BZ, foi eficaz em induzir a redução significativa do número de células inflamatórias, bem como da área preenchida por colágeno dos cães tratados quando comparados aos não tratados. Dessa forma, nos animais infectados com essa cepa, com a cepa Y, mais sensível aos derivados azólicos, o RAV foi capaz, além de suprimir a parasitemia, influenciar na evolução das lesões cardíacas na fase crônica da infecção, havendo assim significativa redução da fibrose.

Estudos sobre o papel do tratamento específico na prevenção das lesões cardíacas são contraditórios. Alguns autores demonstraram que o tratamento específico, mesmo quando não induz a cura parasitológica, é capaz de interferir no curso natural da doença, reduzindo o desenvolvimento e a progressão das lesões cardíacas. Bustamante *et al.* (2007) observaram diminuição da fibrose em camundongos tratados com BZ. Gobbi *et al.* (2007), ao utilizarem o Alopurinol, análogo da hipoxantina que bloqueia a síntese de purinas em *T. cruzi*, verificaram redução no infiltrado inflamatório dos animais quando comparados aos não tratados. Estudando pacientes, Fragatta Filho *et al.* (1994) e Viotti *et al.* (2006) demonstraram melhora clínica e eletrocardiográfica em pacientes tratados quando comparados aos pacientes não tratados após diferentes períodos de avaliação.

Por outro lado, diversos autores acreditam que mesmo o tratamento na fase aguda da infecção não é capaz de evitar ou amenizar o dano tecidual em pacientes caso a cura parasitológica não seja alcançada (Anez *et al.*, 1999; Lauria- Pires *et al.*, 2000). Parada *et al.* (1997) e Inglessis *et al.* (1998) descreveram que pacientes tratados na fase aguda mostraram, através de biópsia no miocárdio, intensa miocardite depois de meses ou

anos após a administração de BZ, sugerindo que o tratamento específico não foi capaz de prevenir as lesões. Segura *et al.* (1994) não observaram diferença significativa na miocardite em camundongos tratados com diferentes cepas. Já Andrade *et al.* (1989) e Garcia *et al.* (2005) demonstraram redução da inflamação nos animais tratados com BZ, porém sem diferença significativa na fibrose apresentada pelos grupos tratados ou não.

Caldas (2008), utilizando como modelo experimental camundongos e cães infectados com diferentes cepas do *T. cruzi* observaram que a eficácia do tratamento com BZ na fase aguda da doença em diminuir as lesões na fase crônica foi dependente da cepa e do modelo utilizados, evidenciando o papel da interação parasito-hospedeiro no desenvolvimento das lesões. O tratamento de cães infectados com cepas sensíveis ao BZ foi capaz de induzir a cura parasitológica e prevenir o desenvolvimento das lesões cardíacas. Já os cães infectados com cepas resistentes mostraram diferentes padrões de resposta. Mesmo quando não foram curados, os animais infectados com a cepa AAS apresentaram área cardíaca preenchida por colágeno numa extensão intermediária à observada entre os cães não infectados e os infectados. Já o curso da infecção com a cepa VL-10, também resistente ao BZ, não foi alterado com o tratamento específico; os cães tratados apresentaram lesões similares aos não tratados. Ao analisar o efeito da quimioterapia específica em camundongos, comportamento distinto foi verificado; por vezes, foi o inverso do observado em cães, como no caso do tratamento dos camundongos infectados com a cepa VL-10 que, apesar de não curados, apresentaram redução significativa da fibrose no miocárdio.

Na tentativa de correlacionar a influência do tratamento específico e o padrão de lesões cardíacas observado para as diferentes cepas com possíveis alterações na resposta imune celular, a próxima etapa do trabalho foi avaliar se o tratamento com BZ e RAV influenciaria o padrão de expressão de citocinas no tecido cardíaco. Para isso, foi realizada análise semi-quantitativa dos níveis de mRNA para IFN- γ e IL-10 no átrio direito dos cães. Os resultados indicaram que os níveis de mRNA para essas citocinas no tecido foram relacionados com o dano cardíaco. Nos animais infectados com a cepa Y e tratados com RAV e BZ, a redução da intensidade das lesões foi acompanhada de redução

dos níveis de IFN- γ e aumento dos níveis de IL-10 em relação ao grupo não tratado. Ao analisar-se a cepa Be-78, observou-se que o tratamento com RAV não foi capaz de alterar a expressão de IFN- γ no tecido, concordante com a similaridade das lesões, vista entre os grupos infectados e tratados com essa droga em relação aos cães não tratados. De forma interessante, o grupo tratado com BZ apresentou níveis de IFN- γ significativamente menores que os grupos CI e tratado com RAV e similares ao grupo não infectado. Já a quantificação de IL-10 não foi significativamente diferente entre nenhum grupo.

Esses resultados estão de acordo com a maior resistência da cepa Be-78 frente a compostos da classe dos derivados azólicos, sugerida por Guedes *et al.*, (2004) e já relatada anteriormente; fato demonstrado tanto pelos perfis da resposta imune humoral e celular quanto pela intensidade das lesões cardíacas detectadas no coração dos animais tratados com RAV.

Murta *et al.* (1999), ao avaliar o impacto do tratamento específico no comportamento da resposta imune, utilizando linhagens de *T. cruzi* sensíveis e resistentes ao fármaco, demonstrou que horas após o tratamento com BZ houve aumento da fagocitose por macrófagos e conseqüente destruição de parasitos sensíveis às drogas, com níveis aumentados das citocinas IL-12, IFN- γ , bem como intermediários reativos de nitrogênio. Os autores demonstraram a importância da interação parasito-sistema imune hospedeiro na eficácia do tratamento da doença de Chagas experimental, mostrando que apenas as células dos animais infectados com o parasito sensível à droga produziram altos níveis de citocinas e radicais de nitrogênio, favorecendo assim a destruição dos parasitos intracelulares pela resposta imune celular. O tratamento de parasitos resistentes, de forma análoga ao que foi acima exposto, não induziu a alterações significativas no padrão de resposta imune celular.

Sathler-Avelar *et al.* (2006) observaram que o tratamento com BZ durante a fase crônica recente da doença de Chagas humana direciona a expressão de citocinas por células sanguíneas para o perfil Th1. Adicionalmente, Sathler-Avelar (2008) demonstraram uma elevada ativação da imunidade inata e adaptativa no sangue periférico de crianças um ano após o tratamento com BZ. Os autores sugerem que o tratamento

específico pode levar a alterações na resposta imune que são dependentes da resistência da cepa do parasito, podendo haver diferenças se a intervenção terapêutica é realizada na fase aguda ou crônica da doença. No presente trabalho, a análise da síntese de IFN- γ foi realizada especificamente no músculo cardíaco, seis meses após o tratamento específico, ou seja, quando a pressão da droga não estava mais presente, mas sim as conseqüências de sua maior ou menor eficácia no tratamento da fase aguda. Pode-se sugerir que a redução da carga parasitária ainda na fase aguda da doença teria contribuído para diminuição das lesões teciduais quando comparadas aos animais não tratados, justificando as diferenças observadas com relação aos níveis diminuídos dessa citocina quando realizou-se o tratamento. Para uma avaliação segura do perfil da resposta imune, a dosagem de outros marcadores e citocinas, bem como a avaliação de diferentes tecidos devem ser realizadas.

Os diferentes resultados são provavelmente relacionados à resposta imune do hospedeiro frente à infecção, uma vez que esta está diretamente envolvida na resistência ou patogênese da doença de Chagas (Morgan *et al.*, 1996; Cordeiro *et al.*, 2001). Nesse sentido, o perfil de citocinas tem se mostrado essencial para definição dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na cardiopatia chagásica e no controle da resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi* (Zhang e Tarleton, 1996; Teixeira *et al.*, 2002).

Gomes *et al.* (2003) investigaram o papel das citocinas IL-10 e IFN- γ e sua relação com o desenvolvimento da patologia da doença de Chagas, através da avaliação da resposta de PBMC de indivíduos chagásicos crônicos. Os autores demonstraram que a alta produção de IFN- γ e baixa produção de IL-10 pode estar correlacionada com o desenvolvimento da doença cardíaca. A atividade modulatória da citocina IL-10 manteria o equilíbrio entre parasitismo e integridade tecidual em pacientes indeterminados. Deste modo, a inflamação seria moderada, gerando fibrose local e uma resposta Th1 branda, que manteria o parasitismo sob controle. Ribeiro *et al.* (2008) observaram maior produção de IFN- γ e TNF- α em pacientes com a forma clínica digestiva em relação aos indeterminados. Utilizando o modelo canino, Guedes *et al.* 2009, demonstraram níveis de mRNA para INF-gama significativamente aumentados em cães experimentalmente

infectados e que desenvolveram doença cardíaca. Já nos animais infectados que não desenvolveram cardiopatia, altos níveis de IL-10 foram detectados.

Deste modo, pode-se especular que o padrão de resposta imune, bem como a presença de lesão no tecido cardíaco detectada na fase crônica da infecção, quando o tratamento com RAV ou BZ foi realizado na fase aguda, é dependente de fatores inerentes ao hospedeiro e ao parasito. O comportamento do sistema imune é influenciado pelo tratamento; porém, as características genéticas do parasito, incluindo o seu perfil de susceptibilidade às drogas, são também importantes e por vezes essenciais para a ocorrência de maior ou menor dano tecidual observado na fase crônica da infecção.

Nossos resultados demonstraram que apesar de não induzir à cura parasitológica, o tratamento com RAV foi eficaz em reduzir as lesões cardíacas dos animais infectados com a cepa Y do *T. cruzi* e esta redução foi correlacionada com alteração nos perfis da resposta imune humoral e celular. Além disso, a droga não induziu ao aparecimento de reações adversas detectáveis. A falha terapêutica provavelmente deve-se ao tempo de meia vida relativamente curto da droga nesse modelo (8,8 horas). Entretanto, as propriedades farmacocinéticas do RAV em humanos são muito mais favoráveis do que as exibidas em camundongos e cães. A concentração atingida no plasma humano após múltiplas doses orais bem toleradas, cerca de 1nM, é cerca de 1000 a 5000 vezes maior que a concentração inibitória mínima sobre amastigotas intracelulares (Andes *et al.*, 2003; Mikamo *et al.*, 2002). Adicionalmente, o tempo de meia-vida do RAV no homem é de 120 horas (Grasela *et al.*, 2000). Deste modo, esse composto apresenta-se como uma alternativa segura e promissora para o tratamento da doença de Chagas humana, sendo justificada a sua avaliação em triagens clínicas.

7. Conclusões

Os resultados obtidos nesse estudo permitem concluir que:

- O tratamento com RAV foi bem tolerado por cães sem raça definida em esquema terapêutico longo;
- O RAV apresenta efeito supressor, porém não induz a cura parasitológica em cães infectados com as cepas Y e Berenice-78 do *T. cruzi*;
- O tratamento com RAV e BZ influencia o padrão de resposta imune humoral, alterando os níveis das imunoglobulinas IgG e IgG2 de forma similar;
- Os níveis de IgG1 produzidos no soro dos cães correlacionam-se com a presença de inflamação no miocárdio na fase crônica da infecção, porém parece independente do tratamento específico;
- O tratamento com RAV durante a fase aguda da infecção foi eficaz em prevenir as lesões cardíacas características da fase crônica da infecção dos cães infectados com a cepa Y;
- O tratamento com RAV durante a fase aguda da infecção induziu a uma redução significativa da expressão de mRNA para a citocina IFN- γ e aumento da expressão de mRNA para IL-10 no átrio direito de cães inoculados com a cepa Y;
- O tratamento na fase aguda com RAV não induziu alterações nos perfis de resposta imune e lesões cardíacas presentes na fase crônica da infecção de cães inoculados com a cepa Be-78, confirmando a resistência dessa cepa aos derivados azólicos.

8. Referências bibliográficas

- Andes, D.; Marchillo, K.; Stamstad, T. e Conklin, R. (2003). *In vivo* pharmacodynamics of a new triazole, ravuconazole, in a murine candidiasis model. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 47, p. 1193-1199.
- Andrade, Z.A. (1958). Anatomia patológica da doença de Chagas. *Rev. Goian. Med.*, v. 4, p. 103-119.
- Andrade, Z.A. (1984). The canine model of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 79, p. 77-83.
- Andrade, Z.A. e Andrade, S.G. (1980). A patologia da doença de Chagas experimental no cão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 75, p. 77-95.
- Andrade, L.O. e Andrews, N.W. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention. *Nature Reviews*, v.3(10), p. 819-823.
- Andrade, S.G.; Magalhães, J.B. e Pontes, A.L. (1985). Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* of different types. *Bulletin of the World Health Organization*, v. 63, p. 721-726.
- Andrade, S.G.; Magalhães, J.B. e Pontes, A.L. (1989). Terapêutica da fase crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* com o Benznidazol e o Nifurtimox. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 22, p. 113-118.
- Andrade, A.L.; Martelli, C.M.; Oliveira, R.M.; Silva, S.A.; Aires, A.I.; Soussumi, L.M.; Covas, D.T.; Silva, L.S.; Andrade, J.G.; Travassos, L.R. e Almeida, I.C. (2004). Short report: benznidazole efficacy among *Trypanosoma cruzi* infected adolescents after a six-year follow-up. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 71(5), p. 594-597.
- Andrade, S.G.; Rassi, A.; Magalhães, J.B.; Filho, F.F. e Luquetti, A.O. (1992). Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strain. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v. 86, p. 624-626.
- Andrade, A.L.S. e Zicker, F. (1997). Should benznidazole be used in chronic Chagas' disease? *Lancet*, v. 349, p. 650-653.
- Andrade, A.L.; Zicker, F.; de Oliveira, R.M.; Almeida Silva, S.; Luquetti, A.; Travassos, L.R.; Almeida, I.C.; De Andrade, S.S.; de Andrade, J.G. e Martelli, C.M. (1996). Randomized trial of efficacy of benznidazole in treatment of early *Trypanosoma cruzi* infection. *Lancet*, v. 348, p. 1407-1413.

- Anez, N.; Carrasco, H.; Parada, H.; Crisante, G.; Rojas, A.; Fuenmayor, C.; Gonzáles, N.; Percoco, G.; Borges, R.; Guevara, P. e Ramirez, J.L. (1999). Myocardial parasite persistence in chronic Chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 60 (5), p. 726–732.
- Ávila, H.A.; Sigman, D.S.; Cohen, L.M.; Millikan, R.C. e Simpson, L. (1991). Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolation from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 40, p. 211-222.
- Bahia, M.T.; Guedes, P.M.M.; Fietto, J.L.R.; Lana, M. e Toledo, M.J.O. (2005). Current advances in human and experimental Chagas disease chemotherapy. *Antimicrob. Agents and Chemother.* v. 5, p. 99-123.
- Bahia, M. T.; Tafuri, W.L.; Caliari, M.V.; Veloso, V.M.; Carneiro, C.M.; Coelho, G.L. e Lana, M. (2002). Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 35, p. 339-345.
- Bahia-Oliveira, L.M.G.; Gomes, J.A.S.; Cançado, J.R.; Ferrari, T.C.; Lemos, E.M.; Luz, Z.M.P.; Moreira, M.C.; Gazzinelli, G. e Correa-Oliveira, R. (2000). Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *The journal of Infectious Diseases*, v. 182, p. 634-638.
- Barr, S.C.; Dennis, V.A.; Klei, T.R. e Norcross, N.L. (1991). Antibody and lymphoblastogenic responses of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* isolates from North American mammals. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, v. 29, p. 267-283.
- Barrett, M.P.; Burchmore, R.J.; Stich, A.; Lazzari, J.O.; Frasch, A.C.; Cazzulo, J.J. e Krishna, S. (2003). The trypanosomiasis. *Lancet*, v. 362, p. 1469-1480.
- Benvenuti, L.A.; Rogério, A.; Freitas, H.F.G.; Mansur, A.J.; Fiorelli, A. e Higuchi, M.L. (2008). Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 102 (6), p. 481-487.
- Blanco, S. B.; Segura, E.L.; Cura, E.N.; Chuit, R.; Tulián, L.; Flores, I.; Garbarino, G.; Villalonga, J.F. e Gürtler, R.E. (2000). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in north-western Argentina. *Trop. Med. Int. Health*, v. 5, p. 293-301.

- Bock, M.; Gönnert, R. e Haberkorn, A. (1969). Studies with Bay 2502 on animals. Bol. Chil. Parasitol., v. 24(1), p.13-19.
- Braga, M.; Lauria-Pires, L.; Argañaraz, E.R.; Nascimento, R.J. e Teixeira, A.R.L. (2000). Persistent infections in chronic Chagas' disease patients treated with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. Rev. Inst. Med. Trop. de São Paulo, v. 42(3), p. 157-161.
- Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. Annu. Rev. Microbiol., v. 27, p. 347-382
- Brener, Z. (1987). Laboratory-acquired Chagas disease: comment. Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg., v. 81, p. 527.
- Brener, Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 4, p. 389-396.
- Brener, Z. (1968). Terapêutica experimental da doença de Chagas. Em Cançado, J.R. Doença de Chagas. Imprensa Oficial de Minas Gerais, p. 510-516, Belo Horizonte, Minas Gerais.
- Brener, Z.; Andrade, Z.A. e Barral-Neto, M. (2000). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Guanabara Koogan, 2ed, p. 431.
- Brener, Z.; Cançado, J.R.; Galvão, L.M.; da Luz, M.P.; Filardi, L. e Pereira, E.S. (1993). An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 88, p. 149-153.
- Brener, Z. e Chiari, E. (1967). Suscetibilidade de diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi* a vários agentes quimioterápicos. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo. v.9, p. 197-207.
- Brener, Z. e Gazzinelli, R.T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. Int. Arch. Allergy Immunol., v. 114, p. 103-110.
- Britto, C.; Cardoso, M.A.; Wincker, P. e Morel, C.M.A. (1993). A simple protocol for cleavage of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR) based diagnosis of chronic Chagas' disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 88, p. 171-172.

- Britto, C.; Silveira, C.; Cardoso, M. A.; Marques, P.; Luquetti, A.; Macedo, V. e Fernandes, O. (2001). Parasite persistence in treated chagasic patients revealed by xenodiagnosis and polymerase chain reaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 96, p. 823-826.
- Brodskyn, C.I.; Silva, A.M.M.; Takehara, H.A. e Mota, I. (1989). IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol. Cell Biol.*, v. 67, p.343-348.
- Bustamante, J.N.; Lo Presti, M.S.; Rivarola, H. W.; Fernandez, A.R.; Enders, J.E.; Fretes, R.E. e Paglini-Oliva, P. (2007). *International Journal of Antimicrobial Agents*, v. 29, p. 733-737.
- Caldas, I.S. (2008). Avaliação da eficácia do tratamento específico com Benznidazol na progressão da doença de Chagas Experimental e a correlação entre a eficácia do tratamento nos modelos canino e murino. Dissertação de mestrado (Imunobiologia de protozoários). Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Universidade Federal de Ouro Preto. Ouro Preto.
- Caldas, I. S.; Talvani, A.; Caldas, S.; Carneiro, C.M.; Lana, M.; Guedes, P.M. e Bahia, M.T. (2008). Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. *Parasitol. Res.*, v. 103, p. 413-421.
- Camargo, E.P. (1964). Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I- Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 6, p. 93-100.
- Cançado, J.R. (1963). Aspectos clínicos na padronização dos métodos de avaliação terapêutica na doença de Chagas. *Rev. Goiana Med.*, v. 9, p. 212-232.
- Cançado, J.R. (1999). Evolution of knowledge on the etiological diagnosis of chagasic infection. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 283-284.
- Cançado, J. R. (2002). Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 44(1), p. 29-37. São Paulo.
- Cançado, J.R. (1997). Terapêutica específica. Em Dias, J.C.P. e Coura, J.R. *Clínica e Terapêutica da Doença de Chagas. Uma Abordagem Prática para o Clínico Geral*. Fiocruz, p. 323-351, Rio de Janeiro.
- Cançado, J.R. (1968). Tratamento da doença de Chagas. Em Cançado, J.R. *Doença de Chagas*. Imprensa Oficial de Minas Gerais, p. 517-540, Minas Gerais.
- Castro, C.N.; Alves, M.T. e Macedo, V.O. (1983). Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 16, p. 98-103.

- Castro, J.A.; de Mecca, M.M.e Bartel, L.C. (2006). Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). *Hum.Exp. Toxicol.*, v. 25(8), p. 471–479.
- Castro, A.M.; Luquetti, A.O.; Rassi, A.; Rassi, E.G.G.; Chiari, E. e Galvão, L.M.C. (2002). Blood culture and polymerase chain reaction for the diagnosis of the chronic phase of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol. Res.*, v. 88, p. 894-900.
- Cerisola, J.A.; Lugones, H. e Rabinovich, L.B. (1972). Tratamiento de la enfermedad de Chagas. Talleres Gráficos Elías Porter, p. 75, Buenos Aires.
- Chagas, C. (1909). Nova tripanosomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.1, p. 159-218.
- Chapadeiro, E. (1999). Clinical evolution and morbi-mortality in Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94(1), p. 309-310.
- Chiari, E. e Brener, Z. (1966). Contribuição ao diagnóstico parasitológico da doença de Chagas na sua fase crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v. 8, p. 134-138.
- Chiari, E.; Dias, J.C.P.; Lana, M. e Chiari, C.A. (1989). Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop. S. Paulo*, v. 22 (1), p. 19-23.
- Cordeiro, F.D.; Martins-Filho, O.A.; da Costa Rocha, M.O.; Adad, S.J.; Correa-Oliveira, R. e Romanha, A.J. (2001). Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology*, v. 8, p. 112–118.
- Corrales, M.; Cardozo, R.; Ségura, M.A.; Urbina, J.A. e Basombrío, M.A. (2005). Comparative efficacies of TAK-187, a long lasting ergosterol biosynthesis inhibitor, and benznidazole in preventing cardiac damage in a murine model of Chagas' disease. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49 (4), p. 1556–1560.
- Coura, J.R. e de Castro, S.L. (2002). A critical review on Chagas disease chemotherapy. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 3–24.
- Coura, J.R. e Silva, J.R. (1961). Aspectos atuais do tratamento da doença de Chagas. *Rev. Bras. Med.*, v. 51, p. 283-290.

- Cruz-Chan, J. V.; Bolio-Gonzalez, M.; Colín-Flores, R.; Ramirez-Sierra, M.J.; Quijano-Hernandez, I. e Dumonteil, E. (2009). Immunopathology of natural infection with *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Veterinary Parasitology*, v. 162, p. 151–155.
- Cunha Neto, E.; Duranti, M.; Gruber, A.; Zingales, B.; De Messias, I.; Stolfo, N.; Bellotti, G.; Patarroyoi, M.E.; Pilleggi, F. e Kalil, J. (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v. 92, p. 3541-3545.
- Cunha-Neto, E.; Teixeira, P.C.; Nogueira, L.G.; Mady, C.; Lanni, B.; Stolf, N.; Fiorelli, A.; Honorato, R. e Kali, J. (2007). New concepts on the pathogenesis of chronic Chagas cardiomyopathy: myocardial gene and protein expression profiles. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 39, p. 59-62.
- D'ávila Reis, R.; Jones, E.M.; Tostes Jr., S.; Lopes, E.R.; Gazzinelli, G.; Colley, G. e Mc Curley, T.M. (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α^+ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 48, p. 637-644.
- de Mecca, M.M.; Bartel, L.C.; Castro, C.R. e Castro, J.A. (2008). Benznidazole biotransformation in rat heart microsomal fraction without observable ultrastructural alterations: comparison to Nifurtimox-induced cardiac effects. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.103(6), p. 549–553.
- De Souza, W. (1984). Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Int. Rev. Cytol.*, v. 86, p. 197-283.
- Dias, J.C.P. (2006). Editorial - The Treatment of Chagas Disease (South American Trypanosomiasis). *Ann. Intern. Med.*, v.144, p. 772-774.
- Dias, J.P. (2009). Elimination of Chagas disease transmission: perspectives. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104, p. 41-45, Rio de Janeiro.
- Dias, J. C. (1992). Epidemiology of Chagas disease. Em: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, M.S., Rassi, A. Chagas disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine. Editora ISBT Brasil. Sociedade Brasileira de Hematologia e Hemoterapia, cap. 5, p. 49-80, São Paulo.
- DIAS, J.C.P. (2000). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública*, v.16(2), p.43-59.

- Dias, J.C.P. (1995). Natural history of Chagas' disease. *Arq. Bras. Cardiol.*, v. 65, p. 359-366.
- Dias, J. C.; Bastos, C.; Araujo, E.; Mascarenhas, A.V.; Martins, N E.; Grassi, F.; Silva, M.; Tatto, E.; Mendonca, J.; Araujo, R.F.; Shikanai-Yasuda, M.A. e Aras, R. (2008a). Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, p. 296-300.
- Dias, J. C.; Prata, A. e Correia, D. (2008b). Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 41, p.193-196.
- Dias, J. C.; Silveira, A. C. e Schofield, C.J. (2002). The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 97, p. 603-612.
- Docampo, R. (1990). Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chem. Biol. Interactions*, v. 73, p. 11-27.
- Docampo, R. e Moreno, S.N.J. (1986). Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Federation Proc.*, v. 45, p. 2471-2476.
- dos Santos, V.P.; Roffe, E.; Santiago, H.C.; Torres, R.A.; Marino, A.P.; Paiva, C.N.; Silva, A.A.; Gazzinelli, R.T. e Lannes-Vieira, J. (2001). Prevalence of CD8 α T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L^{Low}LFA-1^{High}VLA-4^{High} activation phenotype and expression of IFN-g-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect.*, v.3, p. 971-984.
- Dutra, W.O. e Gollob, K.J. (2008). Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease. *Curr. Opinion in Infect. Dis.*, v. 21, p. 287-292.
- Dutra, W.O.; Rocha, M.O.C. e Teixeira, M.M. (2005). The clinical immunology of human Chagas disease. *Trends in Parasitology*, v. 21, p. 581-587.
- Fabbro de Suasnabar, D.; Arias, E.; Streiger, M.; Piacenza, M.; Ingaramo, M.; Del Barco, M. e Amicone, N. (2000). Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. *Rev. Inst. Med. Trop.*, v. 42 (2), p. 99-109, São Paulo.
- Fernandes, C.D.; Tiecher, F.M.; Tiecher, F.M.; Balbinot, M.M.; Liarte, D.B.; Scholl, D.; Steindel, M. e Romanha, A. (2009). Efficacy of benznidazol treatment for asymptomatic Chagasic patients from state of Rio Grande do Sul evaluated during a three years follow-up. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 104 (1), p. 27-32.
- Ferreira, H.O. (1990). Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 23(4), p. 209-211.

- Filardi, L.S. e Brener, Z. (1987). Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. *Trans. Royal Soc. Med. Hyg.*, v. 81, p. 755-759.
- Fragata Filho, A.A.; Silva, M.A.D. e Boainain, E. (1994). Tratamento etiológico da doença de Chagas nas fases aguda e crônica. *Rev. Soc. Cardiol. Estado de São Paulo*, v. 4, p. 192-197.
- Furlong, S.T. (1989). Sterols of parasitic protozoa and helminths. *Exp. Parasitol.*, v. 68, p. 482-485.
- Galvão, L.M.C.; Nunes, R.M.B.; Cançado, J.R.; Brener, Z. e Krettli, A.U. (1993). Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas' disease. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.*, v. 87, p. 220-223.
- Galvão, L.M.; Chiari, E; Macedo, A.M.; Luquetti, A.O.; Silva, S.A. e Andrade, A.L.. (2003). PCR assay for monitoring *Trypanosoma cruzi* parasitemia in childhood after specific chemotherapy. *J. Clin. Microbiol.*, v. 41, p. 5066-5070.
- Garcia, S.; Ramos, C.O.; Senra, J.F.V.; Vilas-Boas, F.; Rodrigues, M.M.; Campos de Carvalho, A.C.; Ribeiro dos Santos, R. e Soares, M.B.P. (2005). Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 49 (4), p. 1521-1528.
- Gazzinelli, R.T.; Oswald, I.P.; Hieny, S.; James, S.L. e Sher, A. (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent nitrogen oxide mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *European Journal of Immunology*, v. 22, p. 2501-2506.
- Gobbi, P.; Lo Presti, M.S.; Fernández, A.R.; Enders, J.E.; Fretes, R.; Gea, S.; Paflini-Oliva, P.A.; Rivarola, H.W. (2007). Allopurinol is effective to modify the evolution of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Parasitol. Res.*, v.51, p. 1459-1462.
- Gomes, J.A.; Bahia-Oliveira, L.M.; Rocha, M.O.; Martins-Filho, O.A.; Gazzinelli, G. e Correa-Oliveira, R. (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect. Immun.*, v. 71, p. 1185-1193.
- Gomes, M.L.; Galvão, L.M.C.; Macedo, A.M.; Pena, S.D.J. e Chiari, E. (1999). Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of parasitologic, molecular and serologic methods. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 60, p. 205-210.

- Gomes, M.L.; Macedo, A.M.; Vago, A.R.; Pena, S.D.J.; Galvão, L.M.C. e Chiari, E. (1998). *Trypanosoma cruzi*: Optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. *Exp. Parasitol.* v. 88, p. 28-33.
- Grasela, D.M.; Olsen, S.J.; Mummaneni, V.; *et al.* (2000). Ravuconazole: multiple ascending oral dose study in healthy subjects. Em: Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, Abst. 838, Toronto, Ontário, Canadá.
- Guedes, P.M. (2006). Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça Beagle infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Parasitologia), Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
- Guedes, P.M.; Urbina, J.A.; de Lana, M.; Afonso, L.C.; Veloso, V.M.; Tafuri, W.L.; Machado-Coelho, G.L.; Chiari, E. e Bahia, M.T. (2004). Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.*, v. 48 (11), p. 4286-4292.
- Guedes, P. M.; Urbina, J.A.; de Lana, M.; Afonso, L.C.; Veloso, V.M.; Tafuri, W.L.; Machado-Coelho, G.L.; Chiari, E. e Bahia, M.T. (2006). Advances in Chagas Disease Chemotherapy. *Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry*, v. 5, p. 175-186.
- Guedes, P. M.; Veloso, V.M.; Afonso, L.C.C.; Caliari, M.V.; Carneiro, C.M.; Diniz, L.F.; Marques-da-Silva, E.A.; Caldas, I.S.; Do Valle Matta, M.A.; Souza, S.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Galvão, L.M. e Bahia, M.T. (2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v. 130, p. 43-52.
- Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Caliari, M.V.; Carneiro, C.M.; Souza, S.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Bahia, M.T. e Galvão, L.M.C. (2007). *Trypanosoma cruzi* high infectivity *in vitro* is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 102(2), p. 141-147.
- Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Gollob, K.J.; Afonso, L.C.; Caldas, I.S.; Vianna, P.; de Lana, M.; Chiari, E.; Bahia, M.T. e Galvão, L.M. (2008). IgG isotype profile is correlated with cardiomegaly in Beagle dogs infected with distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, v.124, p. 163–168.
- Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Tafuri, W.L.; Galvão, L.M.; Carneiro, C.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Soares, K.A e Bahia, M.T. (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.*, v.84(1), p. 9-17.

- Gusmão, R. d'A.; Rezende, J.M.; Rassi, A.; Gam, A.A. e Neva, F.A. (1982). Antibody levels to *Trypanosoma cruzi* in infected patients with and without evidence of chronic Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 31, p. 452-458.
- Hankins, E.G.; Gillespie, J.R.; Aikenhead, K. e Buckner, F.S. (2005). Upregulation of sterol C14-demethylase expression in *Trypanosoma cruzi* treated with sterol biosynthesis inhibitors. *Molecular and Biochemical Parasitology*, v. 144, p. 68–75.
- Hoff, R.; Teixeira, R.S.; Carvalho, J.S. e Mott, K.E. (1978). *Trypanosoma cruzi* in the cerebrospinal fluid during the acute stage of Chagas' disease. *N. Engl. J. Med.*, v. 298, p. 604-606.
- Hotez, P.J.; Remme, J.H., Buss, P.; Alleyne, G.; Morel, C. e Mreman, J.G. (2004). Combating tropical infectious diseases: report of the Disease Control Priorities in Developing Countries Project. *Clin. Infect. Dis.*, v. 38(6), p. 871-878.
- Hunter C.A.; Ellis-Neyes, L.A.; Slifer, T.; Kanaly, S.; Gruning, G.; Fort, M. Rennick, D. E Araujo, F.G. (1997). IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J. Immunol.*, v.158, p. 3311-3316.
- Ingléssis, I.; Carrasco, H.A.; Añez, N.; Fuenmayor, C.; Parada, H.; Pacheco, J.A. e Carrasco, H.R. (1998). Clinical, parasitological and histopathologic follow-up studies of acute Chagas patients treated with benznidazole. *Arch. Inst. Cardiol. Mex.*, v. 68, p. 405-410.
- Joseph-Horne, T. e Hollomon, D.W. (1997). Molecular mechanisms of azole resistance in fungi. *F. E. M. S. Microbiol. Lett.*, v. 149, p.173–180.
- Kalil, J. e Cunha-Neto, E. (1996). Autoimmunity in Chagas disease cardiomyopathy: Fullfilling the criteria at last? *Parasitol. Today*, v. 12, p. 396-399.
- Kawano, Y.; Noma, T. e Yata, J. (1994). Regulation of human IgG subclass production by cytokines IFN-g and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG 2. *Journal of Immunology*, v.153, p. 4948-4958.
- Kirchhoff, L.V. (2000). American trypanosomiasis (Chagas' disease). Em: Rakel, R.E. (Ed.), *Conn's Current Therapy*. W. B. Saunders, p.101–102, New York.
- Kirchhoff, L. V. (1989). Is *Trypanosoma cruzi* a new threat to our blood supply? *Ann. Intern. Med.*, v.10, p. 773-775.
- Krettli, A.U. e Brener, Z. (1976). Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, v. 116, p. 755–760.

- Krettli, A.U. e Brener, Z. (1982). Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.*, v. 129, p. 2009-2012.
- Lana, M. e Chiari, C.A. (1986). Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi*, isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 81, p. 247-253.
- Lana, M.; Chiari, E. e Tafuri, W.L. (1992). Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 87 (1), p. 59-71.
- Laranja, F.S.; Dias, E.; Nobrega, G. e Marinda, A. (1956). Chagas' disease – a clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, v. 14, p. 1035-1060.
- Lauria-Pires, L.; Braga, M.S.; Vexenat, A.C.; Nitz, N.; Simoesbarbosa, A.; Tinoco, D.L. e Teixeira, A.R. (2000). Progressive chronic Chagas heart disease ten years after treatment with anti-*Trypanosoma cruzi* nitroderivatives. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 63(3-4), p.111-118.
- Ley, V.; Andrews, N.W.; Robbins, E.S. e Nussenzweig, V. (1988). Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an ineffective cycle in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, v. 2, p. 649-659.
- Liendo, A.; Lazard, K. e Urbina, J.A. (1998). *In-vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 41, p. 197-205.
- Machado, E.M.; Fernandes, A.J.; Murta, S.M.; Vitor, R.W.; Camilo, D.J.Jr.; Pinheiro, S.W.; Lopes, E.R.; Adad, S.J.; Romanha, A.J.; Romanha, A.J. e Pinto Dias, J.C. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 65(6), p. 958-965.
- Macedo, V.O. e Silveira, C.A. (1987). Perspectivas da terapêutica específica na doença de Chagas. Experiências na forma indeterminada. *Rev. Soc. Brás. Med. Trop.*, v.20, p. 24-26.
- Martins, H.R.; Figueiredo, L.M.; Valamiel-Silva, J.C.O.; Carneiro, C.M.; Machado-Coelho, G.L.L.; Vitelli-Avelar, V. M.; Bahia, M.T.; Martins-Filho, O.A.; Macedo, A.M. e Lana, M. (2008). 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. Chemother.*, v. 61(6), p. 1319–1327.

- Mayer, M. e Rocha Lima, H. (1914). Zum Verhalten von *Schizotrypanum cruzi* in Warmbluetern und Arthropoden. Arch. Schiffs. u Tropen-Hyg., v.5, p. 101-136.
- McCabe, R.E. (1988). Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas disease. J. Infect. Dis., v. 158, p. 1408-1409.
- Michailowsky, V.; Silva, N.M.; Rocha, C.D.; Vieira, L.Q.; Lannes-Vieira, J. e Gazzinelli, R.T. (2001). Pivotal role of interleukin-12 and interferon-g axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. Am J Pathol. v. 159, p.1723-1733.
- Mikamo, H.; Yin, X.H.; Hayasaki, Y.; Shimamura, Y.; Uesugi, K.; Fukayama, N.; Satoh, M. e Tamaya, T. (2002). Penetration of ravuconazole, a new triazole antifungal, into rat tissues. Chemotherapy, v. 48, p. 7-9.
- Minoprio, P.M.; Eisen, H.; Forni, L.; D'Imperio Lima, M.R.; Joskowicz, M. e Coutinho, A. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. Quantitation of both T and B- cells responses. Scand. J. Immunol. v. 24, p. 661-668.
- Molina, J.T.; Brener, Z.; Urbina, J.A. e Romanha, A.J. (2000a). Activity of TAK 187 triazole on mice infected with *Trypanosoma cruzi* stains differently susceptible to benznidazole. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, v. 95; p. 304.
- Molina, J.T.; Martins-Filho, O.; Brener, Z.; Romanha, A.J.; Loebenberg, D. e Urbina, J.A. (2000b). Activities of the triazole derivative SCH 56592 (posaconazole) against drug-resistant strains of the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi* in immunocompetent and immunosuppressed murine hosts. Antimicrob. Agents Chemother., v. 44 (1), p. 150-155.
- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. Mem.Inst.Oswaldo Cruz, v. 98.5, p. 577-591.
- Moore, K.W.; O'Garra, A.; Malefyt, R.W.; Vieira, P. e Mosmann, T.R. (1993). Interleukin-10. Annu. Rev. Immunol., v. 11, p.165-190.
- Moreira, A.A.B.; Souza, H.B.W.T.; Amato Neto, V.; Matsubara, L.; Pinto, P.L.S.; Tolezano, J.E.; Nunes, E.V. e Okumura, M. (1992). Avaliação da atividade terapêutica do itraconazol nas infecções crônicas, experimental e humana, pelo *Trypanosoma cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop., v. 34, p. 177-180.
- Morel, C. M. e Lazdins, J. (2003). Chagas disease. Nat. Rev. Microbiol., v. 1(1), p. 14-15.

- Morgan, J.; Dias, J.C.P.; Gontijo, E.D.; Bahia-Oliveira, L.; Correa Oliveira, R.; Colley, D.G. e Powell, M.R. (1996). Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, p.355-359.
- Murta, S.M.F.; Gazzinelli, R.T.; Brener, Z. e Romanha, A.J. (1998) Molecular characterization of susceptible and naturally resistant strains of *Trypanosoma cruzi* to Benznidazole and Nifurtimox. *Mol. Biochem. Parasitol.*, v. 93, p. 203-214.
- Murta, S.M.F.; Ropert, C.; Alves, R.O.; Gazzinelli, R.T. e Romanha, A.J. (1999). *In vivo* treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destructin and cytokine release by macrophages during infection with a drug susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. *Parasite Immunology*, v. 21, p. 535-544.
- Nobrega, A. A.; Garcia, M.H.; Tatto, E.; Obara, M.T.; Costa, E.; Sobel, J. e Araujo, W.N. (2009). Oral transmission of Chagas disease by consumption of açai palm fruit, Brazil. *Emerg. Infect. Dis.*, v. 15, p. 653-655.
- Parada, H.; Carrasco, H.A.; Añez, N.; Fuenmayor, C. e Inglessis, I. (1997). Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *Int. J. Cardiol.*, v. 60, p. 49-54.
- Perez-Fuentes, R.; Guégan, J.F.; Barnabé, C.; López-Colombo, A.; Salgado Rosas, H.; Torres-Rasgado, E.; Briones, B.; Romero-Díaz, M.; Ramos-Jiménez, J. e Sánchez-Guillén Mdel, C. (2003). Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. *Int. J. Parasitol.*, v. 33(3), p. 293-299.
- Polak, A. e Richle, R. (1978). Mode of action of the 2-nitroimidazole derivative benznidazole. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, v. 72 (1), p. 45-54.
- Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect. Dis.*, v. 1(2), p. 92-100.
- Raaflaub, J. 1980. Multiple-dose kinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneimittelforschung*, v. 30, p. 2192-2194.
- Raaflaub, J. e Ziegler, W.H. (1979). Single-dose pharmacokinetics of the trypanosomicide benznidazole in man. *Arzneim. Forsch.*, v. 29, p. 1611-1614.
- Rassi, A. (1979). Clínica: Fase aguda. Em: Brener, Z.; Andrade, Z. *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Editora Guanabara Koogan S.A., cap. 7, p.249-264, Rio de Janeiro.

- Rassi, A. e Luquetti, A.O. (1992). Therapy of Chagas disease. Em: Wendel, S.; Brener, Z.; Camargo, E. e Rassi, A. (eds). Chagas Disease(American Trypanosomiasis): its Impact on Transfusion and Clinical Medicine. ISBT, p. 237-247, São Paulo.
- Rassi Jr, A.; Rassi, A. e Little, W. C. (2000). Chagas' Heart Disease. Clin. Cardiol., v. 23, p. 883-889.
- Remme, J.H.F.; Feenstra, P.; Lever, P,R.; Medici, A.C.; Morel, C.M.; Noma, M.; Ramaiah, K.D.; Richards, F.; Seketeli, A.; Shminis, Van Brakel, W.H. e Vassal, A. (2006). Tropical diseases targeted for elimination: Chagas disease, lymphatic filariasis, onchocerciasis and leprosy. Disease Control Piorities in Developing Countries, v. 22, p. 433-447.
- Ribeiro, B.M.; Crema, E. e Rodrigues Jr., V. (2008). Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease. Human Immunology, v. 69, p. 484-489.
- Richle, R. (1973). Chemotherapy of experimental acute Chagas disease in mice: beneficial effect of Ro-71051 on parasitemia and tissue parasitism. Le Progres Medical, p. 101-282.
- Rossi, M.A. e Bestetti, R.B. (1995). Unified hypothesis about the pathogenesis of chronic Chagas cardiopathy. Therapeutic implications. Arq. Bras, Cardiol., v. 64(3), p. 255-260.
- Rossi, M.A. (2008). Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. Int. J. Card., v. 66, p. 183-194.
- Russomando, G.; De Tomassone, M. M.; De Guillen, I.; Acosta, N.; Vera, N.; Almiron, M.; Candia,N.; Calcena, M.F. e Figueredo, A. (1998). Treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and followed up by the polymerase chain reaction. Am. J. Trop. Med. Hyg., v. 59(3), p. 487-491.
- Salgado, J. A. (1962). Current clinical review of the 1st described human case of Chagas' disease. Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo, v. 4, p. 330-337.
- Salvatella, R.A. (2007). Achievements in controlling Chagas disease in Latin America. WHO (World Health Organization), Geneva.
- Santos, F.R.; Pena, S.D.J. e Epplen, J.T. (1993). Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. Hum. Genet., v. 90, p. 655-656.

- Sathler-Avelar, R.; Vitelli-Avelar, D.M.; Massara, R.L.; Borges, J.D.; Lana, M.; Teixeira-Carvalho, A.; Dias, J.C.P.; Elói-Santos, S.M. e Martins-Filho, O.A. (2006). Benznidazole treatment during early-indeterminate Chagas' disease shifted the cytokine expression by innate and adaptive immunity cells toward a type 1-modulated immune profile. *Scan. J. of Immunol.*, v. 64, p. 554-563
- Sathler-Avelar, R.; Vitelli-Avelar, D.M.; Massara, R.L.; Lana, M.; Pinto Dias, J.C.; Teixeira-Carvalho, A.; Eloi-Santos, S.M. e Martins-Filho, O.A. (2008). Etiological treatment during early chronic indeterminate Chagas disease incites an activated status on innate and adaptive immunity associated with a type 1-modulated cytokine pattern. *Microbes. Infect.*, v. 10, p. 103-113.
- Schijman, A.G.; Altchek, J.; Burgos, J.M.; Biancardi, M.; Bisio, M.; Levin, M.J. e Freilij, H. (2003). Aetiological treatment of congenital Chagas' disease diagnosed and monitored by the polymerase chain reaction. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 52, p. 441-449.
- Schijman, A.G.; Vigliano, C.; Burgos, J.; Favalaro, R.; Perrone, S. Laguens, R. e Levin, M.J. (2000). Early diagnosis of recurrence of *Trypanosoma cruzi* infection by polymerase chain reaction after heart transplantation of a chronic Chagas' heart disease patient. *J. Heart Lung Transplant.*, v.19 (11), p. 1114-1117.
- Schijman, A.G.; Vigliano, C.A.; Viotti, R.J.; Burgos, J.M.; Brandariz, S.; Lococo, B.E.; Leze, M.I.; Armenti, H.A. e Levin, M.J. (2004). *Trypanosoma cruzi* DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.70 (2), p. 210-220.
- Schmuñis, G.A. e Yadon, Z.E. (2009). Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. *Acta Tropica*, in press.
- Segura, M.A.; Molina de Raspi, E. e Basombrio, M.A. (1994). Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanocidal treatment. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 89, p. 213-216.
- Silva, L.H.P. e Nussenzweig, V. (1953). Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, v. 20, p. 191-203.
- Silveira, C.A.N.; Castilho, E. e Castro, C. (2000). Avaliação do tratamento específico para o *Trypanosoma cruzi* em crianças, na evolução da fase indeterminada. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v.33 (2), p. 191-196.
- Solari, A.; Ortiz, S.; Soto, A.; Arancibia, C.; Campillay, R.; Contreras, M.; Salinas, P.; Rojas, A. e Schenone, H. (2001). Treatment of *Trypanosoma cruzi*-infected children

- with nifurtimox: a 3 year follow-up by PCR. *J. Antimicrob. Chemother.*, v. 48, p. 515–519.
- Sosa Estani, S. e Segura, E.L. (1999). Treatment of *Trypanosoma cruzi* infection in the undetermined phase. Experience and current guidelines of treatment in Argentina. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 94 (1), p. 363-365.
- Sosa Estani, S.; Segura, E.L.; Ruiz, A.M.; Velazquez, E.; Porcel, B.M. e Yampotis, C. (1998). Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 59 (4), p. 526-529.
- Stoppani, A.O.P. (1999). Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. *Medicina*, v. 59, p. 147-165.
- Streiger, M.L.; Barco, M.L.; Fabbro, D.L.; Arias, E.D. e Amicone, N.A. (2004). Longitudinal study and specific chemotherapy in children with chronic Chagas' disease, residing in a low endemicity area of Argentina. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v. 37, p.365-375.
- Stuart. K.; Brun, R.; Croft, S.; Fairlamb, A.; Gutler, R.E.; McKerrow, J.; Reed, S. e Tarleton, R. (2008). Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.*, v. 118 (4), p. 1301-1310.
- Tanowitz, H.B.; Machado, F.S.; Jelicks, L.A.; Shirani, J.; de Carvalho, A.C.C.; Spray, D.C.; Factor, S.M.; Kirchhoff, L.V. e Weiss, L.M. (2009). Perspectives on *Trypanosoma cruzi*-Induced Heart Disease (Chagas Disease). *Progress in Cardiovascular Diseases*, v.51 (6), p.524-539.
- Tarleton, R.L. (2003). Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends. Parasitol.*, v. 19, p. 447-451.
- Tarleton, R.L.; Reithinger, R.; Urbina, J.A.; Kitron, U. e Gutler, R.E. (2007). The challenges of Chagas Disease - grim outlook or glimmer of hope. *PLoS. Med.*, v. 4, p. 1852-1857.
- Tarleton, R. L.; Zhang, L. e Downs, M.O. (1997). Autoimmune rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, v. 94, p. 3932-3937.
- Teixeira, M.M.; Gazzinelli, R.T. e Silva, J.S. (2002). Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol.*, v. 18, p. 262-265.

- Toledo, M.J.O.; Gasperi, M.V.; Marques de Araújo, S. e Lana, M. (1995). Berenice-62 and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi*: comparison of their susceptibility to benzidazole. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 90, p. 201(Abstract).
- Toledo, M.J.O.; Guilherme, A.L.F.; Silva, J.C.; Gasperi, M.V.; Mendes, A.P.; Gomes, M.L. e Araújo, S.M. (1997). *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with Benznidazole in mice inoculated with strains from Paraná state and from diferent endemic areas of Brazil. Rev. Inst. Med. Trop., v. 39; p. 283-290, São Paulo.
- Tostes Jr, S.; Lopes, E.R.; Pereira, F.E. e Chapadeiro, E. (1994). Miocardiopatia chagásica crônica humana: estudo quantitativo de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ nos exsudatos inflamatórios. Rev. Soc. Brasil. Med. Trop., v. 27, p.127-134.
- Tyler, K.M. e Engman, D.M. (2001). The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited. Int. J. Parasitol., v. 31 (5-6), p. 472-481.
- Urbina, J.A. (2002). Chemotherapy of Chagas Disease. Curr. Pharm. Design, v. 8, p. 287–295.
- Urbina, J. A. (2009a). Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 104, p. 311-318.
- Urbina, J.A. (1999). Parasitological cure of Chagas disease: Is it possible? Is it relevant? Mem. Inst. Oswaldo Cruz, v. 94, p. 349-355.
- Urbina, J.A. (2009b). Specific chemotherapy of Chagas disease: Relevance, current limitations and new approaches. Acta Trop., in press.
- Urbina, J.A. e Docampo, R. (2003). Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. Trends Parasitol., v. 19 (11), p. 495–501.
- Urbina, J.A.; Lira, R.; Visbal, G. e Bartroli, J. (2000). *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the new triazole derivative UR-9825 against the protozoan parasite *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. Antimicrob. Agents Chemother., v. 44 (9), p. 2498-2502.
- Urbina, J.A.; Payares, G.; Contreras, L.M.; Liendo, A.; Sanoja, C.; Molina, J.; Piras, M.M.; Piras, R.; Perez, N.; Wincker, P. e Loebenberg, D. (1998). Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. Antimicrob. Agents Chemother., v. 42, p. 1771–1777.
- Urbina, J.A., Payares, G., J., Sanoja, C.; Liendo, A.; Lazardi, K.; Piras, M.M.; Perez, N.; Wincker, P. e Ryley, J.F. (1996). Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. Science, v. 273, p. 969–971.

- Urbina, J.A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Molina, J.; Lira, R.; Brener, Z. e Romanha, A.J. (2003a). *In vitro* and *in vivo* activities of ravuconazole on *Trypanosoma cruzi*, the causative agent of Chagas disease. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 21, p. 27–38.
- Urbina, J.A.; Payares, G.; Sanoja, C.; Molina, J.; Lira, R.; Brener, Z. e Romanha, A.J. (2003b). Parasitological cure of acute and chronic experimental Chagas disease using the long-acting experimental triazole TAK-187. Activity against drug resistant *Trypanosoma cruzi* strains. *Int. J. Antimicrob. Agents*, v. 21, p. 39-48.
- Vago, A.R.; Andrade, L.O.; Leite, A.A.; d'Avila Reis, D.; Macedo, A.M.; Adad, S.J.; Tostes Jr., S.; Moreira, M.C., Filho, G.B. e Pena, S.D. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.*, v. 156(5), p. 1805-1809.
- Viotti, R.; Vigliano, C.; Armenti, H. e Segura, E. (1994). Treatment of chronic Chagas disease with long-term follow-up. *Am. Heart J.*, v. 127, p. 151-162.
- Viotti, R., Vigliano, C.; Lococo, B.; Bertocchi, G.; Petti, M.; Alvarez, M.G.; Postan, M. e Armenti, A. (2006). Long-term cardiac outcomes of treating chronic Chagas disease with benznidazole versus no treatment: a nonrandomized trial. *Ann. Int. Med.*, v. 144(10), p. 724–734.
- Vitor, R.W.A. e Chiari, E. (1987). Avaliação de antígenos do *Trypanosoma cruzi* para a Reação de Hemaglutinação Indireta. I. Diferentes extratos antigênicos. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, v. 29 (3), p. 178-182.
- Voller, A.; Bidwell, D.E. e Bartlett, A. (1976). Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice, *Bull. W.H.O.*, v. 53, p. 55-65.
- Zhang, L. e Tarleton, R.L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *Journal of Infectious Diseases*, v. 180, p. 480-486.
- Zhang, L. e Tarleton, R.L. (1996). Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp. Parasitol.*, v. 84, p. 203-213.
- WHO (World Health Organization). (2008). Executive board. Chagas disease: control and elimination. Report of the secretariat. EB124/17.
- WHO (World Health Organization). (2002). Report of the Expert Committee on the Control of Chagas disease. Technical Report Series, 905, p.85.

- WHO (World Health Organization). (2007). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Report of scientific group in Chagas disease. Buenos Aires, Argentina, April 17-20, 2005. Update July 2007.
- Wincker, P.; Britto, C.; Pereira, J.B.; Cardoso, M.A.; Oelemann, W. e Morel, C.M. (1994). Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 51, p. 771-777.
- Workman, P.; White, R.A.; Walton, M.I.; Owen, L.N. e Twentyman, P.R. (1984). Preclinical pharmacokinetics of benznidazole. *Br. J. Cancer*, v. 50, p. 291-303.
- Workshop on Epidemiology and Social Determining Factors of Chagas Disease. Basic information for surveillance and control policy in Latin America. (2007). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 102 (I), p. 5-10.
- Yun, O.; Lima, M.A.; Ellman, T.; Chambi, W.; Castillo, S.; Flevaud, L.; Roddy, P.; Parreño, F.; Viñas, P.A. e Palma, P.P. (2009). Feasibility, drug safety, and effectiveness of etiological treatment programs for Chagas disease in Honduras, Guatemala, and Bolivia: 10-year experience of Medecins sans Frontieres. *PLoS Negl. Trop. Dis.*, v. 3(7), p. 488-496.