

Rodrigo Nunes Cal

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO BENZONIDAZOL EM
ISOLADOS HUMANOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

UBERABA – MG

2007

Rodrigo Nunes Cal

**INDUÇÃO DE RESISTÊNCIA AO BENZONIDAZOL EM
ISOLADOS HUMANOS DE *TRYPANOSOMA CRUZI***

Monografia apresentada ao Curso de Biomedicina da Universidade Federal do Triângulo Mineiro como requisito parcial para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina.

Orientador: Prof. Dr. André Luiz Pedrosa

Co-orientadora: Profa. Dra. Eliane Lages-Silva

UBERABA – MG

2007

”Há homens que lutam um dia e são bons. Há outros que lutam um ano e são melhores. Há os que lutam muitos anos e são muito bons. Porém, há os que lutam toda a vida, esses são imprescindíveis.”

Bertolt Brecht

Dedico este trabalho

À minha mãe Sandra, minha avó Leila e aos
meus irmãos Thiago e Leandro pelo apoio e incentivo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelo dom da vida e por me acompanhar sempre. Por permitir alcançar mais este objetivo, guiando meus passos e pensamentos.

Ao Prof. Dr. André Luiz Pedrosa pela valiosa orientação, disponibilidade nos momentos solicitados e contribuição para o meu aprendizado.

Aos Prof. Dr. Luís Eduardo Ramírez Giraldo e Profa. Dra. Eliane Lages-Silva pela co-orientação, disposição em sempre tirar as dúvidas e ensinamentos que me passaram.

Aos funcionários do Laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Cida, Cidinha, Cristina, Patrícia, Pollyana e Luciano pela assistência prestada durante a realização dos experimentos, em especial à Ana Cláudia.

Aos demais professores e funcionários da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, por tudo que me ensinaram, pela dedicação e atenção prestada.

Aos alunos de pós-graduação do Curso de Pós-Graduação em Medicina Tropical e Infectologia, Marlene, Daniela, Sandra, Rosiley, Ariana, Glenda e em especial, ao Paulo Edson, pela ajuda e transmissão de experiências.

Aos colegas de turma, Coralia, Ana Theresa, Ana Paula, Robertha e Lucas pelo companheirismo durante esses quatro anos, período inesquecível da minha vida.

Este trabalho foi realizado com o apoio financeiro do Programa Institucional de Bolsas de Iniciação Científica da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (PIBIC/FAPEMIG).

SUMÁRIO

| | |
|--|----|
| LISTA DE FIGURAS | 08 |
| LISTA DE TABELAS | 09 |
| LISTA DE ABREVIATURAS | 10 |
| RESUMO | 11 |
| 1. INTRODUÇÃO | 12 |
| 1.1 Doença de Chagas | 13 |
| 1.1.1 Aspectos históricos | 13 |
| 1.1.2 Epidemiologia | 14 |
| 1.1.3 Terapêutica | 16 |
| 1.2 Características do <i>Trypanosoma cruzi</i> | 19 |
| 1.2.1 Características gerais | 19 |
| 1.2.2 Resistência e suscetibilidade a drogas em <i>T. cruzi</i> | 20 |
| 2. JUSTIFICATIVA | 24 |
| 3. OBJETIVOS | 26 |
| 4. MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 Isolamento e manutenção das cepas de <i>T. cruzi</i> | 29 |
| 4.2 Curvas de crescimento | 30 |
| 4.3 Protocolo para indução de resistência ao benzonidazol | 31 |
| 4.4 Preparação de blocos de agarose contendo DNA genômico de <i>T. cruzi</i> | 31 |
| 4.5 Eletroforese em campo pulsátil | 32 |
| 5. RESULTADOS | 33 |
| 5.1 Crescimento <i>in vitro</i> das cepas de <i>T. cruzi</i> em meio LIT e LIT-Mod | 34 |
| 5.2 Avaliação da suscetibilidade das cepas de <i>T. cruzi</i> ao benzonidazol | 36 |
| 5.3 Indução de resistência <i>in vitro</i> ao benzonidazol em <i>T. cruzi</i> | 39 |
| 5.4 Caracterização genética | 42 |
| 6. DISCUSSÃO | 43 |
| 7. CONCLUSÕES | 48 |
| 8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS | 50 |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1: Fórmula estrutural do nifurtimox (1) e benzonidazol (2) | 18 |
| Figura 2: Curvas de crescimento das cepas de <i>T. cruzi</i> isoladas antes (1206 e 1230) e após (3306 e 3314) tratamento do paciente com 5mg/kg/dia de benzonidazol. | 35 |
| Figura 3: Curvas de crescimento das cepas 1230 (A) e 3314 (B) de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT normal e LIT modificado na presença e ausência de 5% de benzonidazol | 37 |
| Figura 4: Curvas de crescimento das cepas 1206 (A) e 3306 (B) de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT normal e LIT modificado na presença e ausência de 5% de benzonidazol | 38 |
| Figura 5: Curvas de crescimento das cepas 3306 (A) e 3314 (B) de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT normal na presença e ausência de diferentes concentrações de benzonidazol | 40 |
| Figura 6: Curvas de crescimento da cepa 3314 de <i>T. cruzi</i> cultivada em meio LIT normal na presença e ausência de diferentes concentrações de benzonidazol | 41 |
| Figura 7: Análise por eletroforese em campo pulsátil de cepas de <i>T. cruzi</i> cultivadas em meio LIT normal. Poço 1: cepa 1206; poço 2: cepa 3306; poço 3: cepa 3314 | 42 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Dados dos pacientes submetidos ao tratamento com 5mg/kg/dia de benzonidazol durante 60 dias | 29 |
| Tabela 2: Data de isolamento das cepas de <i>T. cruzi</i> e positividade das hemoculturas | 30 |

LISTA DE ABREVIATURAS

DNA - Ácido Desoxirribonucléico

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

KCl - Cloreto de Potássio

Kg - Quilograma

LIT - Liver Infusion Tryptose

mg - Miligrama

mL - Mililitro

M - Molar

NaCl - Cloreto de Sódio

Na₂HPO₄ - Fosfato Disódico

PFGE - Eletroforese em Campo Pulsátil

PSG - Solução de Fosfato de Sódio e Glicose

RAPD - Random Amplified Polymorphic DNA

RNA - Ácido Ribonucléico

SBF - Soro Bovino Fetal

SDS - Dodecil Sulfato de Sódio

TE - Tris-EDTA

UH - Urina Humana

Z - Zimodema

% - Porcentagem

°C - Graus Celsius

RESUMO

O principal objetivo deste trabalho foi avaliar o comportamento biológico e o perfil cariotípico de quatro cepas de *T. cruzi* isoladas de hemoculturas obtidas de dois pacientes chagásicos que foram submetidos ao tratamento com 5mg/kg/dia de benzonidazol por 60 dias. Assim, o crescimento *in vitro* das cepas isoladas antes (1230 e 1206) e após o tratamento dos pacientes (3314 e 3306) foi avaliado no meio LIT e LIT modificado (LIT-Mod – substituição do soro bovino por 3% de urina humana) na presença e ausência de soro de cão tratado com 1000 mg/kg de benzonidazol. As cepas 1230 e 1206 apresentaram maior crescimento nos meios de cultivo na ausência da droga, principalmente no meio LIT modificado. Porém, nos meios contendo 5% da droga, elas apresentaram menores quantidades de parasitos vivos durante um menor tempo em comparação com as outras duas cepas. Na tentativa de induzirmos resistência ao benzonidazol, as cepas 3314 e 3306 foram submetidas a diferentes concentrações da droga no meio LIT (1%, 2%, 3%, 4% e 5%), observando uma maior sobrevivência dos parasitos, principalmente no meio contendo 1% da droga. Os parasitos da cepa 3314 que sobreviveram à presença de 1% de benzonidazol foram novamente inoculados em meio LIT contendo diferentes concentrações da droga (0,2%, 0,5%, 1% e 2%), proporcionando uma indução de resistência nos parasitos. Os resultados obtidos levaram à conclusão de que (1) o meio LIT-Mod pode substituir o meio LIT para o cultivo *in vitro* de *T. cruzi*, (2) o tratamento do paciente com benzonidazol alterou as características de crescimento do parasito, (3) não houve diferenças no cariótipo molecular entre as cepas isoladas de um mesmo paciente e (4) a resistência ao benzonidazol parece ter surgido de eventos moleculares intrínsecos do parasito e não pela seleção de subpopulações resistentes do parasito.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 – DOENÇA DE CHAGAS

1.1.1 – Aspectos históricos

Os eventos que marcam a descoberta da tripanossomíase americana, ou doença de Chagas, iniciaram em 1907, quando Carlos Chagas, pesquisador de Manguinhos, chegou a Lassance, no norte de Minas Gerais, com a missão de combater a malária entre os trabalhadores da Estrada de Ferro Central do Brasil. Lá, teve sua atenção despertada por um inseto que proliferava nas frestas das paredes de pau-a-pique das casas, alimentando-se à noite do sangue de seus moradores. Por atacar preferencialmente o rosto, era chamado de “barbeiro” pela população local. Ao examinar estes insetos, Carlos Chagas encontrou neles um novo protozoário, que chamou de *Schizotrypanum cruzi*, em homenagem ao médico sanitarista Oswaldo Cruz. Chagas determinou a patogenicidade do microrganismo para animais de laboratório e descreveu sua presença em animais domésticos. Paralelamente, o pesquisador já havia detectado nos habitantes da região alterações patológicas ainda não conhecidas naquela época e começou, então, a investigar as ligações entre o novo parasito e a condição mórbida daquela população.

Em março de 1909, em um exame a fresco realizado em uma criança, Chagas encontrou protozoários flagelados que, após coloração por Giemsa, verificou ser semelhante aos encontrados em barbeiros. Esta data ficou marcada como a descoberta do agente causador e transmissor da nova doença, mais tarde denominada tripanossomíase americana ou “Doença de Chagas” (CARNEIRO, 1963).

Chagas e seus colaboradores identificaram as diversas manifestações clínicas da doença, separando-as entre as fases aguda e crônica, estudaram a biologia das várias espécies de barbeiros transmissores e descreveram minuciosamente a morfologia e o ciclo evolutivo do *Trypanosoma cruzi* no inseto transmissor e no hospedeiro vertebrado. Eles realizaram investigações experimentais, produziram estudos sobre a patogenia e anatomia patológica, desenvolveram métodos de diagnóstico, analisaram o papel dos reservatórios domiciliares e silvestres do parasito e apontaram a relevância da doença.

De forma até então inédita na história da medicina, um único investigador identificava o inseto transmissor, o agente etiológico e os seus reservatórios na natureza, e por fim os casos humanos de uma nova moléstia.

1.1.2 – Epidemiologia

A doença de Chagas ou tripanossomíase americana é uma infecção generalizada, causada por um protozoário flagelado, o *Trypanosoma cruzi*, transmitida naturalmente a humanos e a outros animais por meio de hemípteros hematófagos da subfamília *Triatominae* por meio das fezes e urina dos insetos infectados. Outras vias de transmissão são transfusão de sangue, transplante de órgãos, aleitamento materno, acidentes laboratoriais, congênita e oral (DIAS, 1992).

Acredita-se que antes da colonização européia da América, o parasito estava restrito aos pequenos mamíferos das matas e campos da América, desde a Patagônia até o sul dos Estados Unidos. Esses animais (tatus, gambás, roedores) convivem com barbeiros silvestres e entre eles circula o parasito. Com o início dos processos de colonização, aconteceram desequilíbrios ecológicos (desmatamentos, queimadas) em muitos lugares e os barbeiros foram

desalojados, invadindo as habitações humanas. A doença chegou ao homem e aos mamíferos domésticos, transformando-se em uma antropozoonose.

A transmissão vetorial para humanos tem sido atribuída, tradicionalmente, a dois ciclos conectados que são bem definidos: os ciclos silvestre e doméstico. A infecção humana através do ciclo doméstico é o resultado da domiciliação de vetores que trazem o parasito do ambiente silvestre para as habitações humanas. A presença ocasional de mamíferos e triatomíneos silvestres nessas habitações também representa uma fonte de transmissão do parasito. Além disso, a infecção humana pode ser adquirida via ciclo silvestre quando o homem invade esse ambiente (FERNANDES *et al.*, 1999).

A doença de Chagas apresenta algumas características associadas com a origem geográfica da cepa do *T. cruzi*, como: maior frequência de megaesôfago e megacólon no Brasil central e rara ocorrência ao norte do rio Amazonas; diferenças na resposta ao tratamento etiológico, com altos níveis de cura na Argentina, Chile e no estado do Rio Grande do Sul (CABRAL *et al.*, 1999).

Dados oficiais dão conta de que, hoje, pelo menos 16 milhões de indivíduos estão infectados pelo *T. cruzi*, com preocupantes taxas de morbi-mortalidade em várias regiões estudadas, acometendo principalmente populações socialmente marginalizadas, de origem rural (WHO, 1991). No Brasil, estima-se que existam cerca de 5 milhões de chagásicos (LIMA, 1983; DIAS, 1987), dos quais, aproximadamente 60% são provenientes de migração rural-urbana e residem atualmente em grandes centros urbanos (DIAS, 1987; DIAS & CONTIJO, 1995). As complicações mais graves em decorrência da doença causam cerca de 45.000 mortes por ano (WHO, 2003).

A tendência atual é de uma “urbanização” da endemia, em virtude de movimentos migratórios que derivam do modelo urbano-industrial e do progressivo empobrecimento das

áreas rurais latino-americanas, fazendo crescer a importância dos mecanismos não-vetoriais de transmissão do parasito (DIAS, 1985; TDR, 1980). A transmissão transfusional ganhou destaque em virtude da migração de indivíduos infectados para áreas urbanas com ineficiente sistema de controle das transfusões de sangue.

1.1.3 – Terapêutica

As parasitoses tropicais estão entre as doenças mais prevalentes do mundo, atingindo milhões de pessoas. A prevenção destas doenças depende de medidas ecológicas, sanitárias, assim como emprego de fármacos antiparasitários eficazes e seguros (FRAYHA *et al.*, 1997).

A eficácia dos fármacos depende do conhecimento detalhado do ciclo de vida, metabolismo e biologia em geral dos parasitos. No passado, os indivíduos infectados eram tratados com produtos extraídos de plantas, por administração exclusivamente oral, pois se acreditava que o sítio das infecções fosse o trato intestinal. Os avanços dos conhecimentos anatômicos, bioquímicos e estudos fisiológicos, e o entendimento de quase todos os ciclos de vida dos principais parasitos no homem, permitem que atualmente se realize o processo de planejamento de fármacos de maneira mais racional, com ênfase no mecanismo de ação, visando atingir diretamente os alvos específicos e essenciais dos parasitos (FRAYA *et al.*, 1997).

Desde a descoberta da doença, até os dias atuais, foram realizadas inúmeras tentativas de desenvolvimento de quimioterápicos, sem obter, entretanto, um medicamento totalmente eficaz. Os fármacos disponíveis atualmente para o controle da doença, benznidazol e nifurtimox (Fig. 1) apresentam baixa eficiência e fortes efeitos colaterais (STOPPANI, 1999), como anorexia, distúrbios gastrintestinais, neuropatias e erupções cutâneas (BERGER *et al.*, 1998), toxicidade, precauções para uso parenteral prolongado e resistência do parasito

(CROFT, 1999). Ambas as drogas quando administradas na fase aguda da doença têm apresentado cura em 50-70% dos pacientes; entretanto, elas curam somente cerca de 8% dos pacientes na fase crônica (PRATA, 1994).

Para o tratamento de alguns casos têm sido utilizados fármacos antifúngicos da classe dos azóis, entre eles cetoconazol, miconazol, econazol e itraconazol (STOPPANI, 1999; URBINA, 1999). A utilização destas drogas se baseia no fato de que tanto fungos quanto tripanossomatídeos produzem ergosterol, como um dos principais componentes das membranas celulares (DOCAMPO & SCHMUNIS, 1997; URBINA, 1997). Assim, quaisquer moléculas que inibam enzimas envolvidas na biossíntese de ergosterol são potenciais alvos para desenvolvimento de novos fármacos.

No caso do *T. cruzi* vários processos bioquímicos têm sido apontados como alvos terapêuticos potenciais, entre eles: a enzima tripanotona redutase (SALMON *et al.*, 1998), enzimas envolvidas na importação e interconversão de purinas, metabolismo do folato e pteridina, biossíntese de RNA mensageiro, biossíntese de lipídios, transialidase (FAIRLAMB, 1999), diidrofolato redutase (ZUCCOTTO *et al.*, 1999), enzimas do glicosomo, envolvidas no metabolismo energético, destacando-se a gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase (SOUZA *et al.*, 1998), e bloqueio da diferenciação celular do parasito (URBINA *et al.*, 1993).

Além disso, sabe-se que diferentes cepas de *T. cruzi* apresentam grande variabilidade genética, sendo que algumas cepas têm-se mostrado mais patogênicas a modelos experimentais (MARTINEZ-DIAZ *et al.*, 2001), enquanto outras se mostram resistentes ao tratamento com determinadas drogas. Apesar destas características serem conhecidas, pouco se sabe sobre os mecanismos moleculares que governam a resistência a drogas nesse parasito.

MURTA *et al.* (1998), sugerem que a resistência natural do parasito pode ser um fator importante para explicar a baixa taxa de cura em pacientes chagásicos. O aparecimento de

resistência a drogas em parasitos torna imprescindível a pesquisa e o desenvolvimento de novos produtos de origem natural, semi-sintética ou sintética, com atividade antiparasitária, além da utilização de técnicas moleculares para a caracterização da suscetibilidade das cepas às drogas em questão. O desenvolvimento de fármacos mais efetivos e menos tóxicos requer o total conhecimento do ciclo de vida e metabolismo do *T. cruzi*. Para o desenvolvimento destes, é cada vez mais importante a seleção do alvo terapêutico, o que permite uma busca racional por agentes que provoquem a resposta desejada específica para o controle da doença. O maior foco para descoberta de novos fármacos antichagásicos tem sido a identificação e caracterização bioquímica e molecular dos alvos (CROFT, 1999).

A identificação de marcadores moleculares para suscetibilidade ou resistência do *T. cruzi* a drogas pode ser útil como fator preditor de cura da doença de Chagas. É possível que com o uso de técnicas de biologia molecular, a detecção da presença do parasito no sangue de pacientes chagásicos poderá ser realizada simultaneamente com a caracterização da suscetibilidade ou resistência da cepa do *T. cruzi* a drogas.

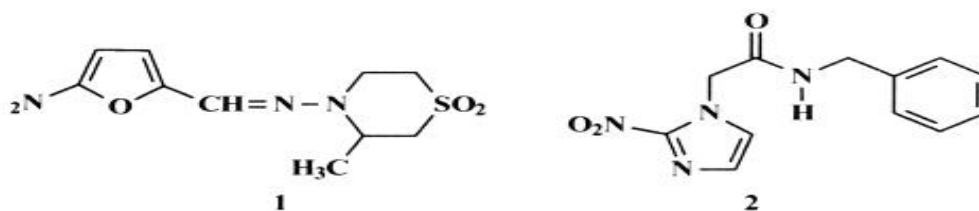


Figura 1: Fórmula estrutural do nifurtimox (1) e benznidazol (2).

1.2 - Características do *Trypanosoma cruzi*

1.2.1 – Características gerais

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. As características desta ordem incluem a presença de flagelo e cinetoplasto, uma organela autoreplicável que contém o DNA extranuclear. O parasito é transmitido por insetos triatomíneos hematófagos infectados pertencentes à família Reduviidae, sendo as principais espécies transmissoras : *Triatoma infestans*, *Rhodnius prolixus* e *Panstrongylus megistus*. Os hospedeiros vertebrados somam uma grande variedade de espécies, incluindo o homem.

O ciclo biológico do parasito é complexo, envolvendo vários estágios distintos de desenvolvimento nos diversos hospedeiros e se inicia quando os triatomíneos se contaminam durante a ingestão de sangue de mamíferos infectados. Os parasitos ingeridos se multiplicam na luz intestinal do inseto como formas flageladas epimastigotas e, quando se encontram no intestino posterior, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes, que são eliminadas nas fezes e urina. A infecção do hospedeiro vertebrado pelo *T. cruzi* tem início quando os parasitos eliminados pelo inseto encontram uma descontinuidade na pele ou mucosa. Ao penetrar no hospedeiro, o parasito tem a capacidade de atingir os tecidos subcutâneos podendo invadir diferentes tipos celulares principalmente macrófagos (BRENER, 1992). No sangue dos hospedeiros vertebrados, os parasitos apresentam-se sob a forma de tripomastigotas, e nos tecidos, como amastigotas, que se diferenciam em tripomastigotas antes de serem liberadas das células infectadas. Após o rompimento dessas células, tripomastigotas são novamente liberados no sangue periférico, podendo invadir novas células.

1.2.2 – Resistência e suscetibilidade a drogas em *T. cruzi*

As populações do *T. cruzi* são caracterizadas por um comportamento biológico heterogêneo, uma alta variabilidade genética e um curso clínico distinto no hospedeiro vertebrado (DOST *et al.*, 2002). Essa heterogeneidade pode ser uma das razões que explica a variabilidade nas manifestações clínicas na doença de Chagas e as diferenças regionais de sua morbidade (DEVERA *et al.*, 2002). Variações intra-específicas nas diferentes cepas de *T. cruzi* têm sido demonstradas em nível morfo-biológico, bioquímico e genético (ANDRADE, 1974; ANDRADE, 1985; MILES *et al.*, 1977; MOREL & SIMPSON, 1980; STEINDEL *et al.*, 1993). Além disso, tem sido relatada a existência de grande polimorfismo cromossômico entre cepas e clones de *T. cruzi* (HENRIKSSON *et al.*, 1996).

Em uma determinada área geográfica, pode circular uma ou várias sub-populações do parasito, porém, geralmente com predomínio de uma delas (OLIVEIRA *et al.*, 1993). A eletroforese de isoenzimas do parasito indica distintas populações (zimodemas) circulando nos ciclos doméstico e silvestre (MILES *et al.*, 1978). A resistência natural a drogas de cepas silvestres pode ser vista como um meio de transmissão desse caráter no ciclo doméstico (FILARDI & BRENER, 1987). Admite-se que as populações de *T. cruzi* sejam policlonais, podendo alguns clones se sobrepor a outros, determinando as características da cepa em estudo (DOYLE, 1984).

Vários pesquisadores têm se dedicado a avaliar a suscetibilidade e resistência natural do parasito a drogas utilizadas no tratamento da doença de Chagas. FILARDI & BRENER (1987) descreveram a existência de cepas que são naturalmente resistentes e sensíveis ao tratamento com benzonidazol e nifurtimox. Diferenças na suscetibilidade do *T. cruzi* a quimioterápicos também foram apontadas por outros autores (BRENER, COSTA & CHIARI, 1976; ANDRADE, MAGALHÃES & PONTES, 1985; NEAL & VAN BUEREN, 1998).

Durante os últimos 20 anos, a suscetibilidade de diversas cepas isoladas de diferentes reservatórios e áreas geográficas ao benzonidazol e nifurtimox foi determinada (ANDRADE *et al.*, 1985 e 1992; FILARDI & BRENER, 1987; MURTA *et al.*, 1998; TOLEDO *et al.*, 1997). Neste contexto, 56% das cepas de *T. cruzi* foram consideradas suscetíveis ao benzonidazol, 16,82% parcialmente suscetíveis e 27,1% resistentes. Um fator que poderia contribuir para essas diferenças durante o tratamento da doença é o tipo da cepa que predomina em cada área geográfica (ANDRADE *et al.*, 1985 e 1997; MURTA *et al.*, 1998; REVOLLO *et al.*, 1998). FILARDI & BRENER (1987) inocularam 47 cepas isoladas de pacientes humanos, vetores domésticos e silvestres em ratos para determinar a suscetibilidade e resistência natural do *T. cruzi* a partir da examinação de sangue e hemocultura dos ratos tratados com benzonidazol e nifurtimox. Os autores observaram a alta taxa de cura em ratos infectados pelas cepas oriundas do sul do Brasil e Argentina (93,3 a 100%), diferentemente daquelas provenientes de Minas Gerais, apresentando diferentes graus de sensibilidade às drogas.

A seleção *in vivo* de populações de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol foi obtida através de tratamentos rápidos e sucessivos de ratos infectados com a cepa Y, demonstrando a presença de uma heterogeneidade populacional nessa cepa, o que sugere que o tratamento inicial elimina os subclones suscetíveis e preserva os resistentes, os quais se multiplicam e dominam a população. Esta cepa é considerada ter média resistência ao benzonidazol. Ratos infectados com ela mostraram 50% de taxa de cura depois do tratamento (MURTA & ROMANHA, 1998). Muitos estudos de caracterização biológica demonstram que cepas de *T. cruzi* isoladas de humanos, reservatórios e vetores de distintas áreas geográficas mostram diferentes comportamentos em modelos experimentais (DEANE *et al.*, 1963; ANDRADE e MAGALHÃES, 1997).

Existem vários protocolos relacionados à indução de resistência *in vitro* das cepas do *T. cruzi* aos fármacos da classe dos azóis, nifurtimox e benzonidazol (NOZAKI *et al.*, 1996; NIRDÉ *et al.*, 1995; BUCKNER *et al.*, 1998). Pesquisadores utilizando diferentes protocolos obtiveram *in vitro* cepas resistentes a determinadas drogas (DVORAK & HOWE, 1977; NOZAKI, ENGEL & DVORAK, 1996; NIRDÉ, LARROQUE & BARNABÉ, 1995). Todavia, estudos comparativos de suscetibilidade em cepas a drogas demonstraram que não há correlação entre suscetibilidade a drogas *in vitro* e *in vivo* (SCOTT & MATTHEWS, 1987; NEAL & VAN BUEREN, 1988; RIBEIRO-RODRIGUES *et al.*, 1995).

Em um estudo realizado por MURTA *et al.*, (1998), 45 cepas do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes ao benzonidazol e nifurtimox foram analisadas em relação a 6 diferentes marcadores moleculares. Neste estudo, o perfil heterozigoto (zimodema B) agrupou exclusivamente cepas sensíveis e ocorreu predominantemente em áreas geográficas onde o tratamento da doença de Chagas tem sido relatado como mais eficaz, demonstrando que este zimodema está associado ao fenótipo de suscetibilidade do *T. cruzi* a drogas.

VILLARREAL *et al.* (2005) analisaram a expressão diferencial de genes nas cepas de *T. cruzi* resistentes ao benzonidazol, observando que cada uma atua independentemente do seu próprio grupo genético quando é submetida à pressão por drogas. Os autores tiveram como hipótese que os mecanismos envolvidos na sensibilidade natural ao benzonidazol são diferentes daqueles envolvidos na indução de resistência à droga.

MURTA *et al.* (2006) analisaram os níveis de transcrição e tradução do gene codificador da Old Yellow Enzyme de *Trypanosoma cruzi* (TcOYE) em cepas de *T. cruzi* sensíveis, naturalmente resistentes ao benzonidazol e nifurtimox, com resistência selecionada *in vivo* e induzida *in vitro*. Os autores observaram que todas as cepas do *T. cruzi* apresentaram 4 cópias deste gene, exceto na cepa com resistência induzida *in vitro*, mostrando que 3 das 4

cópias do gene estão deletadas nesta população, sugerindo que a baixa regulação deste gene não é um evento pós-transcricional. Os mesmos autores observaram também que a localização cromossômica deste gene e os polimorfismos detectados nas cepas estão associados com o zimodema e não com o fenótipo de resistência a droga, mostrando que um dos mecanismos que conferem a indução de resistência *in vitro* relaciona com a deleção de cópias deste gene estudado.

A identificação de genes que são diferentemente expressos nas cepas resistentes e suscetíveis das populações de *T. cruzi* poderá ajudar no aumento do entendimento das bases moleculares relacionadas com a resistência a drogas presente nesse parasito, conduzindo para o descobrimento de novos alvos terapêuticos (MURTA *et al.*, 2006).

JUSTIFICATIVA

2. JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas, nas suas diferentes manifestações clínicas, é uma doença que afeta milhões de pessoas no mundo. As drogas utilizadas atualmente contra o *T. cruzi* são tóxicas e pouco efetivas, o que as torna de pouca utilidade para os que mais necessitam: pessoas com a saúde debilitada por outras doenças ou sem recursos financeiros, que vivem em regiões tropicais e subtropicais. Ainda, a descrição de cepas do parasito que adquire resistência após o tratamento do paciente com benzonidazol pode torná-lo sem utilidade em um futuro próximo. Daí a necessidade de se buscar medicamentos novos que sejam menos tóxicos e com preços acessíveis a grande parte da população afetada ou que permitam sua inclusão em políticas públicas de combate à doença.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

O trabalho desenvolvido nesta monografia teve como objetivo geral caracterizar os mecanismos de resistência ao benzonidazol em cepas de *Trypanosoma cruzi* obtidas de pacientes chagásicos crônicos. Para tanto, propomos os seguintes objetivos específicos:

- Selecionar cepas de *T. cruzi* antes e após o tratamento com benzonidazol.
- Comparar o crescimento do parasito em meio LIT e LIT-Mod na presença e ausência de benzonidazol.
- Estudar alterações nos perfis biológico e genético das cepas selecionadas.
- Determinar um perfil de resistência/suscetibilidade a droga em *T. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 – Isolamento e manutenção das cepas de *T.cruzi*

O trabalho foi realizado com quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* (1206, 3306, 1230 e 3314) procedentes de hemoculturas obtidas de dois pacientes (Tabela 1). As hemoculturas foram realizadas de acordo com a metodologia proposta por CHIARI *et al.* (1989). A tabela 2 indica a data de isolamento das cepas e a positividade das hemoculturas. Estas cepas são mantidas criopreservadas no laboratório de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro. Para a realização deste estudo os parasitos foram descongelados e inicialmente cultivados em meio de cultura LIT (*Liver Infusion Tryptose* - NaCl 0,4%; KCl 0,04%; Na₂HPO₄ 0,8%; glicose 0,2%; triptose 0,5%; infuso de fígado 0,5%; hemoglobina 2,0%; gentamicina 0,024mg/m; penicilina G 500UI/mL) (CASTELLANI *et al.*, 1967). No pico máximo de parasitismo *in vitro* realizaram-se diversos inóculos para o acompanhamento do comportamento destas cepas na presença e ausência de droga.

TABELA 1: Dados dos pacientes

| Paciente | Data de nascimento | Estado de origem | Forma clínica da doença de Chagas | Cepas isoladas* | |
|----------|--------------------|------------------|-----------------------------------|-----------------|------|
| | | | | Pré | Pós |
| 1 | 29/7/1989 | Bahia | Indeterminada | 1206 | 3306 |
| 2 | 28/3/1969 | Bahia | Indeterminada | 1230 | 3314 |

*Cepas isoladas antes (Pré) e após (Pós) tratamento do paciente por 2 meses com 5mg/kg/dia benzonidazol.

TABELA 2: Data de isolamento das cepas de *T. cruzi* e positividade das hemoculturas.

| Paciente | Cepa | Data do isolamento | Hemocultura (Tubos+/total de tubos) |
|-----------------|-------------|---------------------------|--|
| 1 | 1206 | Janeiro/2004 | 4/6 |
| | 3306* | Janeiro/2006 | 5/6 |
| 2 | 1230 | Janeiro/2004 | 6/6 |
| | 3314* | Janeiro/2006 | 2/6 |

*As cepas 3306 e 3314 apresentaram positividade na hemocultura 22 meses após o tratamento dos pacientes.

4.2 – Curvas de crescimento

O crescimento *in vitro* das cepas isoladas antes (1230 e 1206) e após tratamento dos pacientes (3314 e 3306) foi avaliado pelo inóculo de $2,0 \times 10^6$ formas epimastigotas nos meios LIT e LIT modificado pela substituição do soro bovino por 3% de urina humana (LIT-Mod) na presença e ausência de soro de cão tratado com 1000 mg/kg de benzonidazol, adquirindo como volume final 10mL em cada tubo de Falcon. Os experimentos foram realizados em triplicata e a contagem dos parasitos foi realizada em câmara de Neubauer diariamente durante 20 dias. Após o término da contagem, a média dos valores foi calculada para a obtenção das curvas de crescimento.

4.3 – Protocolo para indução de resistência ao benzonidazol

Na tentativa de induzirmos resistência ao benzonidazol em *T. cruzi*, $2,0 \times 10^6$ formas epimastigotas das cepas 3314 e 3306, que foram isoladas de pacientes previamente submetidos ao tratamento com benzonidazol, foram inoculadas em meio LIT e em meio LIT contendo 1%, 2%, 3%, 4% e 5% de soro de cão tratado com 1000 mg/kg de benzonidazol e o seu crescimento foi acompanhado por 20 dias. Os parasitos que sobreviveram à presença de benzonidazol foram novamente inoculados em meio contendo a droga e, assim, sucessivamente, até que a cepa de *T. cruzi* cultivada na presença de droga apresentasse crescimento igual ao controle cultivado na ausência de droga.

4.4 – Preparação de blocos de agarose contendo DNA genômico de *T. cruzi*

As suspensões de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram centrifugadas a $2.000 \times g$ durante 10 minutos a $4^\circ C$ para obtenção do sedimento parasitário. O sedimento de células foi lavado 2 vezes com solução salina e, posteriormente, ressuspensionado para obter uma suspensão a $5,0 \times 10^8$ parasitos/mL. Em seguida, os parasitos foram adicionados a uma solução de agarose 2%/PSG 2 \times , volume a volume. Rapidamente, 63 microlitros da mistura foram transferidos a um molde de acrílico e, em seguida, para um banho de gelo por 10 minutos. Os blocos foram transferidos para um tubo de Falcon contendo o mesmo volume de solução de lise (0,5mg/mL de proteinase K; 0,1g de SDS 1%; 5mL de EDTA 1M e 10mL de água destilada) e colocados no banho-maria a $42^\circ C$ durante 48 horas. Utilizou-se a solução de TE alto (100mL de TRIS, HCL, 1M e pH 7,4; 250mL de EDTA 0,2M, pH 8,0 e 500mL de água destilada estéril) para lavar os blocos por 2 dias, trocando a solução de lavagem a cada 24 horas. Os blocos foram estocados com solução de TE alto a $4^\circ C$.

4.5 – Eletroforese em campo pulsátil

A análise do cariótipo molecular das cepas foi feita através da técnica da eletroforese em campo pulsátil (*Pulsed Field Gel Electrophoresis* – PFGE). Os blocos contendo DNA dos parasitos foram colocados nos poços do gel de agarose 1%. O gel foi submerso em um tampão de TBE 0,5X e submetido a uma alternância periódica de dois campos elétricos, a partir de eletrodos dispostos nos lados de um hexágono formando um ângulo de 120°. A distribuição gradual de potenciais resulta num campo elétrico homogêneo em todo o gel permitindo uma corrida retilínea para a análise de cariótipos. A temperatura ideal de corrida do gel foi de 10°C. A condição de corrida consistiu de três etapas: pulsos de 60s por 24h a 150V; pulsos de 120s por 24h a 150V e pulsos de 180s por 24h a 150V.

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 – Crescimento *in vitro* das cepas de *T. cruzi* em meio LIT e Lit-Mod

Primeiramente, as curvas de crescimento das cepas 1230, 3314, 1206 e 3306 foram determinadas em meio LIT convencional e LIT modificado. Observamos uma diferença de crescimento entre as cepas isoladas de um mesmo paciente; entretanto, essa diferença não foi significativa. As cepas 1230 e 1206 apresentaram maior crescimento em relação às aquelas isoladas depois do tratamento dos pacientes em ambos os meios de cultivo, atingindo uma superioridade de densidade parasitária máxima de aproximadamente $1,72 \times 10^7$ e $1,05 \times 10^7$ parasitos/mL no meio LIT; $3,08 \times 10^7$ e $1,55 \times 10^7$ no meio LIT-Mod, respectivamente. Estas cepas apresentaram maior crescimento no meio LIT-Mod, atingindo uma superioridade de densidade parasitária máxima de aproximadamente $7,0 \times 10^6$ parasitos/mL em relação ao meio LIT (Figs. 2A e 2B).

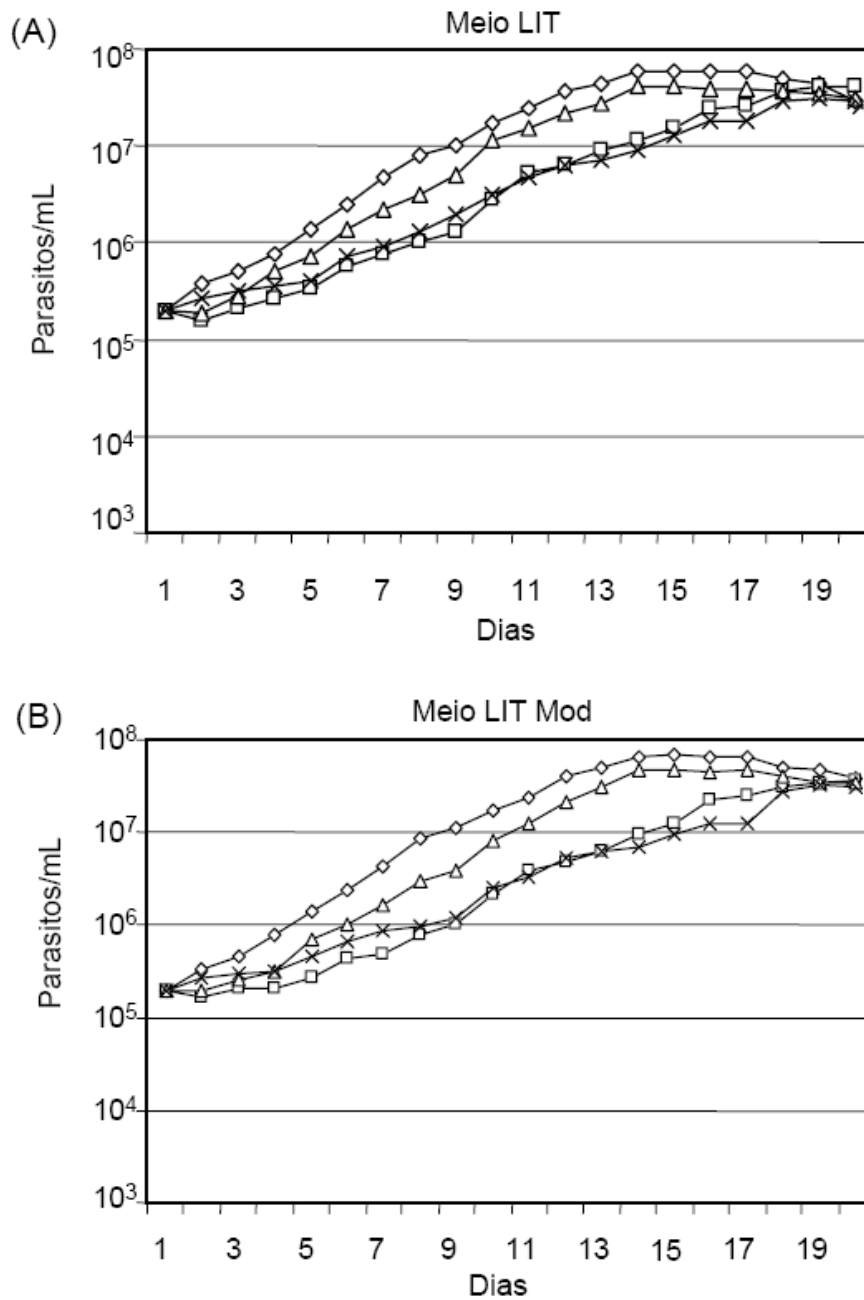


Figura 2: Curvas de crescimento das cepas de *T. cruzi* isoladas antes (1206 e 1230) e após (3306 e 3314) tratamento do paciente com 5mg/kg/dia de benzonidazol. As cepas foram cultivadas em meio LIT (A) e LIT modificado (B). Símbolos: Cepa 1230 (◇); cepa 1206 (△), cepa 3306 (×); cepa 3314 (□).

5.2 Avaliação da suscetibilidade das cepas de *T. cruzi* ao benzonidazol

As curvas de crescimento das cepas 1230 e 3314 (Figs. 3A e 3B) e 1206 e 3306 (Figs. 4A e 4B) foram determinadas na presença e na ausência de 5% de benzonidazol nos meios de cultivo LIT e LIT-Mod. As cepas isoladas antes do tratamento dos pacientes (cepas 1230 e 1206) comportaram-se diferentemente nos meios contendo a droga em comparação com as outras duas cepas, nas quais observamos uma alta mortalidade dos parasitos 24 horas após a adição de benzonidazol nos meios de cultivo, principalmente no meio LIT. Observamos menores quantidades de parasitos vivos durante um menor tempo em seus perfis de crescimento, demonstrando que o tratamento pelo qual os pacientes foram submetidos com benzonidazol alterou os perfis de crescimento das cepas. Desta forma, podemos considerar que as cepas 1230 e 1206 são mais suscetíveis ao benzonidazol que as cepas 3314 e 3306.

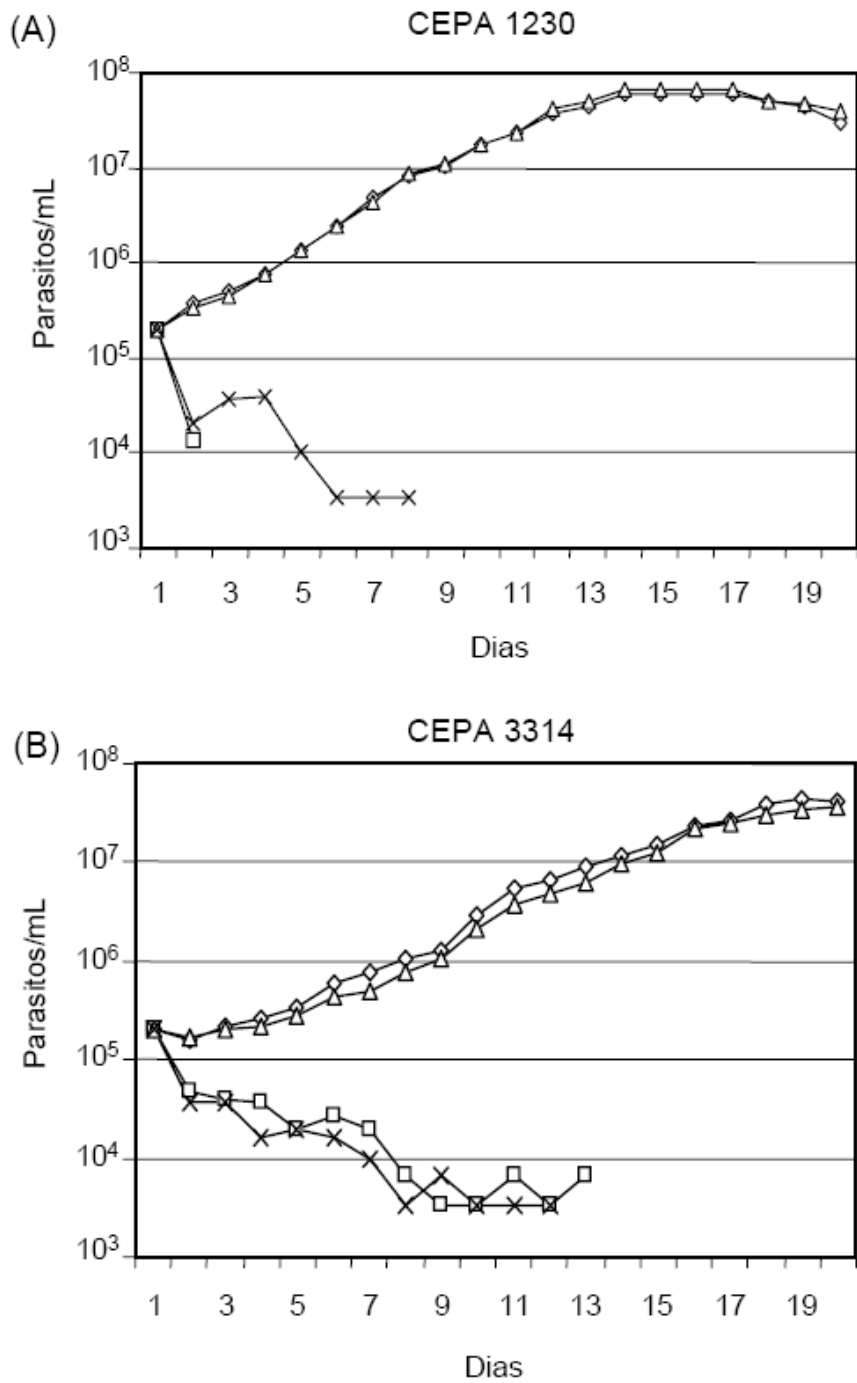


Figura 3: Curvas de crescimento das cepas 1230 (A) e 3314 (B) de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT normal e LIT modificado na presença e ausência de 5% de benzonidazol. Símbolos: meio LIT (◇); LIT+BZ (□), LIT-Mod (△); LIT-Mod+BZ(×).

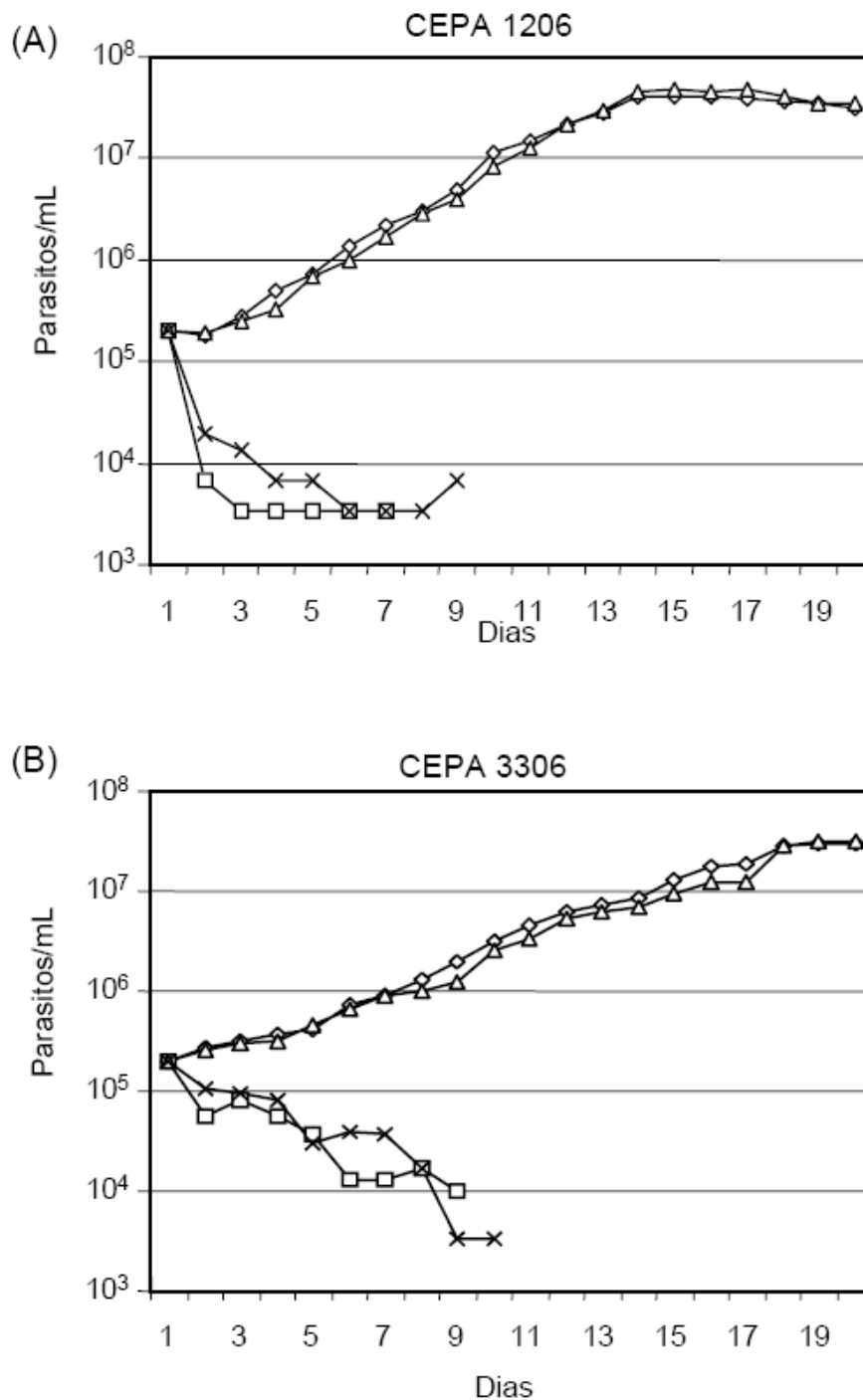


Figura 4: Curvas de crescimento das cepas 1206 (A) e 3306 (B) de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT normal e LIT modificado na presença e ausência de 5% de benzonidazol. Símbolos: meio LIT (◇); LIT+BZ (□), LIT-Mod (△); LIT-Mod+BZ(×).

5.3 Indução de resistência *in vitro* ao benzonidazol em *T. cruzi*

As cepas 3306 e 3314, isoladas após o tratamento dos pacientes, foram cultivadas em diferentes concentrações de benzonidazol no meio LIT normal (1%, 2%, 3%, 4% e 5% de soro de cão contendo a droga metabolizada), na tentativa de induzirmos resistência à droga. Observamos uma maior sobrevivência dos parasitos, principalmente no meio contendo 1% da droga. Comparando-se a quantidade de parasitos vivos nestes meios, podemos notar que a diferença foi maior quando aumentamos a concentração da droga de 1% para 2% em ambas as cepas, apresentando uma maior mortalidade dos parasitos. A cepa 3314 apresentou maior quantidade de parasitos vivos durante um maior tempo nos meios contendo todas as concentrações da droga (Fig. 5A e 5B). Os parasitos desta cepa que sobreviveram à presença de 1% de benzonidazol foram novamente inoculados em meio LIT contendo diferentes concentrações da droga (0,2%, 0,5%, 1% e 2%). Após alguns dias, esta cepa cultivada na presença de 0,2% da droga apresentou um crescimento maior em relação ao controle cultivado na ausência de droga, demonstrando que houve uma indução de resistência aos parasitos da cepa 3314 (Fig. 6).

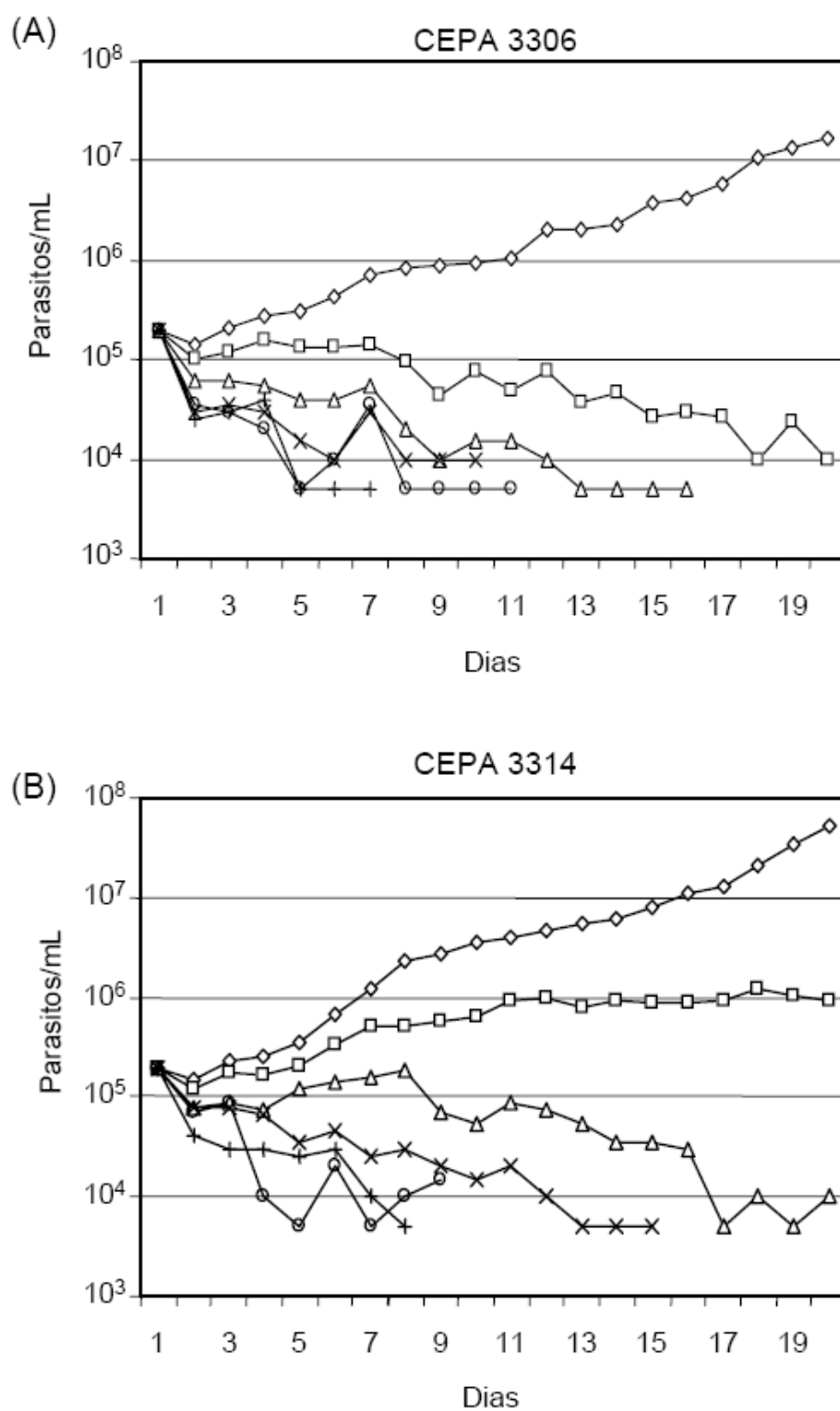


Figura 5: Curvas de crescimento das cepas 3306 (A) e 3314 (B) de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT normal na presença e ausência de diferentes concentrações de benzonidazol. Símbolos: meio LIT (\diamond); meio LIT+1% de BZ (\square); meio LIT+2% de BZ (\triangle); meio LIT+3% de BZ (\times); meio LIT+4% de BZ (\circ); meio LIT+5% de BZ ($+$).

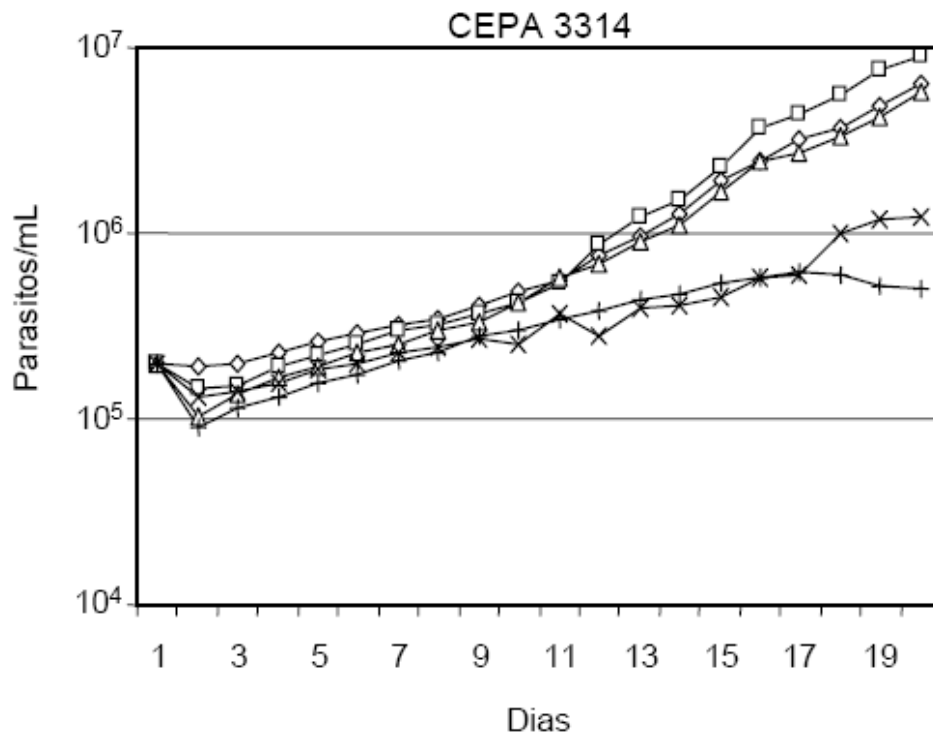


Figura 6: Curvas de crescimento da cepa 3314 de *T. cruzi* cultivada em meio LIT normal na presença e ausência de diferentes concentrações de benznidazol. Símbolos: meio LIT (◇); meio LIT+0,2% de BZ (□); meio LIT+0,5% de BZ (△); meio LIT+1% de BZ (×); meio LIT+2% de BZ (+).

5.4 Caracterização genética

Observou-se que as cepas 1206 e 3306 apresentaram cariótipos moleculares idênticos antes e após o tratamento do paciente com benzonidazol através da técnica de eletroforese em campo pulsátil. Não foi possível comparar o cariótipo da cepa 3314 com a cepa 1230, uma vez que não houve DNA genômico desta última para efetuar a análise.

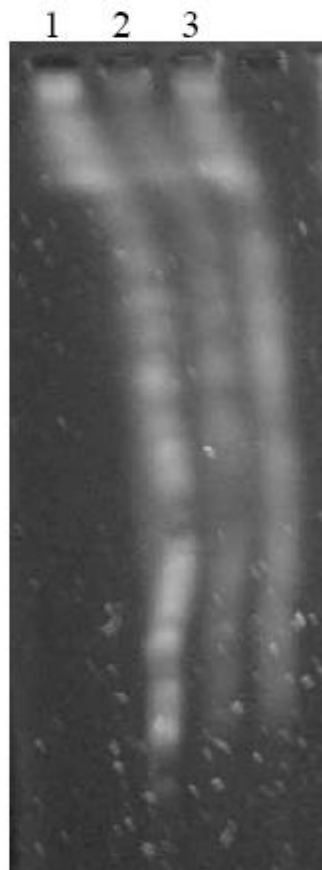


Figura 7: Análise por eletroforese em campo pulsátil de cepas de *T. cruzi* cultivadas em meio LIT normal. Poço 1: cepa 1206; poço 2: cepa 3306; poço 3: cepa 3314.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

Neste estudo, analisamos o crescimento em meio axênico e o perfil cariotípico de cepas de *T. cruzi* isoladas de hemoculturas obtidas de dois pacientes chagásicos que foram submetidos ao tratamento com 5mg/kg/dia de benzonidazol por 60 dias. Foi testado o crescimento destas cepas nos meios de cultivo LIT normal e LIT modificado na presença e ausência de diferentes concentrações de soro de cão tratado com 1000 mg/kg de benzonidazol para verificar a ocorrência de efeitos desta droga sobre os perfis de crescimento dos parasitos, possibilitando a análise da suscetibilidade/resistência *in vitro* a esta droga.

Diferenças na suscetibilidade de cepas de *T. cruzi* a drogas (ANDRADE, 1985; FILARDI & BRENER, 1987) podem, em parte, explicar diferenças na eficácia das drogas no tratamento de hospedeiros vertebrados infectados com *T. cruzi*. A existência de cepas naturalmente resistentes ao benzonidazol e ao nifurtimox foi descrita anteriormente (FILARDI & BRENER, 1987). Neste estudo, as cepas isoladas após o tratamento dos pacientes com benzonidazol (3306 e 3314) cresceram menos nos meios de cultivo na ausência da droga, porém, estas cepas apresentaram maiores quantidades de parasitos vivos durante um maior tempo em relação às outras duas cepas nos meios contendo 5% da droga, demonstrando a existência de resistência a droga nestas cepas e que a elevada mortalidade dos parasitos das cepas 1230 e 1206 indica uma suscetibilidade *in vitro* delas à droga. Estes dados mostram que o tratamento do paciente com benzonidazol pode influenciar as características de crescimento dos parasitos.

O parasito possui a capacidade de adaptar-se aos vários meios em que sobrevive por meio de alterações em suas características biológicas. O isolamento geográfico faz com que o parasito possa evoluir separadamente, adaptando-se a diferentes condições ambientais e ocasionando o surgimento de diferenças genéticas entre as linhagens, na qual vão se

acumulando com o tempo. As cepas estudadas foram isoladas de pacientes provenientes da mesma cidade no estado da Bahia, descartando a possibilidade de interferência do fator ambiental no surgimento de diferenças genéticas acumuladas com o tempo entre elas.

A parasitemia elevada observada na fase aguda da doença tende a decrescer como resultado da resposta imune do hospedeiro, tornando-se baixa na fase crônica da infecção (BARRETT *et al.*, 2003). As cepas 1206 e 1230 apresentaram 4 e 6 tubos positivos no total de 6 tubos analisados na hemocultura, diferentemente das cepas 3306 e 3314, que possuíram 5 e 2 tubos positivos, respectivamente. Estas cepas apresentaram positividade na hemocultura 22 meses após o tratamento dos pacientes.

O crescimento dos parasitos estimulado pela urina humana levou pesquisadores dedicados à otimização de condições de cultivo *in vitro* de células a substituir o SBF por quantidades adequadas de UH, permitindo o crescimento ótimo de *Leishmania braziliensis* (ARMSTRON & PATTERSON, 1994). As cepas isoladas antes do tratamento dos pacientes (1230 e 1206) apresentaram maior crescimento nos meios de cultivo, principalmente no meio LIT modificado, destacando-se a maior sobrevivência dos parasitos neste meio contendo a droga em comparação ao meio LIT, mostrando que a alteração da composição do meio proporcionou condições suficientes aos parasitos para estimular um maior crescimento.

MURTA *et al.* (1998) caracterizaram várias cepas de *T. cruzi* segundo diferentes marcadores moleculares. Os autores mostraram que o perfil isoenzimático heterozigoto (zimodema B) está associado ao fenótipo de suscetibilidade de cepas do *T. cruzi* ao benzonidazol. Relataram também a existência do perfil isoenzimático Z1 e Z2 em populações do *T. cruzi* sensíveis e naturalmente resistentes a drogas. Também estudos utilizando marcadores moleculares mostraram que as cepas do *T. cruzi* dividem-se nos grupos 1 e 2, independentemente do seu fenótipo de resistência a drogas, indicando que não existe correlação

entre esses marcadores e suscetibilidade do parasito a drogas. Marcadores moleculares auxiliariam na prescrição de esquemas terapêuticos específicos para o tratamento de pacientes com infecções por cepas sensíveis ou resistentes a drogas.

O DNA repetitivo do parasito apresenta duas importantes características: alto número de cópias no genoma e alta frequência de polimorfismos. Muitos elementos repetitivos carregam seqüências promotoras e reguladoras, participando assim da ativação ou desativação de genes do parasito (NOVAK *et al.*, 1993; REQUENA *et al.*, 1994). O significado biológico ou funcional da maioria das seqüências de DNA repetitivas permanece obscura e especulativa (MARTIN, 1995; REQUENA, 1996). A presença de maiores quantidades de parasitos vivos durante um maior tempo observada nas cepas 3314 e 3306 nos meios de cultivo contendo a droga sugere que o tratamento dos pacientes induziu a resistência ao benzonidazol através de possíveis alterações na regulação da expressão gênica dos parasitos.

As cepas 3314 e 3306 foram submetidas a diferentes concentrações da droga no meio LIT com o objetivo de indução de resistência *in vitro*. Observamos que a cepa 3314 apresentou maiores quantidades de parasitos vivos durante um maior tempo, principalmente no meio contendo 1% da droga. Estes resultados podem sugerir a existência de uma heterogeneidade entre elas, apesar de serem resistentes ao tratamento com benzonidazol.

Alguns genes já caracterizados em *T. cruzi* estão presentes em duas ou mais cópias no genoma, que podem estar localizadas em uma única região do cromossomo ou em diferentes cromossomos. MURTA *et al.* (2006) induziram resistência ao benzonidazol em uma cepa de *T. cruzi* através da exposição aumentada de diferentes concentrações da droga, mostrando que a deleção de cópias do gene codificador da Old Yellow Enzyme de *Trypanosoma cruzi* (TcOYE) é um dos mecanismos envolvidos na indução de resistência *in vitro* no parasito. A análise dos resultados obtidos através da inoculação dos parasitos sobreviventes da cepa 3314 em

diferentes concentrações da droga demonstra que houve uma indução de resistência, pois esta cepa cultivada na presença de 0,2% da droga apresentou um crescimento maior em relação ao controle cultivado na ausência de droga.

O cariótipo de *T. cruzi* parece ser estável nas diferentes formas evolutivas do parasito. Existem relatos de alterações na localização dos genes que codificam o RNA da seqüência líder do miniexon durante o cultivo prolongado do parasito (WAGNER & SO, 1990). Variações no cariótipo têm sido relatadas previamente em *T. cruzi* e podem aparecer espontaneamente durante a cultura *in vitro* e/ou durante a seleção para a resistência à droga (NOZAKI *et al.*, 1996). O fato de o cariótipo das cepas estudadas serem idênticos antes e após o tratamento dos pacientes com benzonidazol sugere que não houve seleção de subclones do parasito e que a resistência surgiu de mecanismos moleculares intrínsecos do parasito.

CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

Os resultados alcançados pela caracterização dos crescimentos de isolados humanos de *T. cruzi*, obtidos antes e após o tratamento dos pacientes com benzonidazol permitem concluir que:

- O meio LIT-Mod pode substituir o meio LIT para o cultivo *in vitro* de *T. cruzi*.
- O tratamento do paciente com benzonidazol alterou as características de crescimento do parasito.
- Não houve diferenças detectáveis no cariótipo molecular entre as cepas isoladas de um mesmo paciente antes e após o tratamento com benzonidazol.
- A resistência ao benzonidazol parece ter surgido de eventos moleculares intrínsecos do parasito e não pela seleção de subpopulações resistentes do parasito.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 3, n. 1, p. 65-121, 1974.

ANDRADE, S.G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 18, supl. I, p. 39-46, 1985.

ANDRADE, S., MAGALHÃES, J.B. & PONTES, A.L. Evolution of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bulletin of the World Health Organization** v. 63, p. 721-726, 1985.

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

ANDRADE, S.G., MAGALHÃES, J.B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 30, n. 1, p. 27-35, 1997.

ARMSTRONG, TC., PATTERSON, J.L. Cultivation of *Leishmania braziliensis* in an economical serum-free medium containing human urine. **J. Parasitol.**, v. 80, p. 1030-2, 1994.

BARRETT, M. P., BURCHMORE R.J., STICH A., LAZZARI J.O., FRASCH A.C., CAZZULO J.J., KRISHNA S. The trypanosomiases. **The Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.

BERGER, I., BARRIENTOS, A.C., CÁCERES, A., HERNÁNDEZ, M., RASTRELLI, L., PASSREITER, C.M., KUBELKA, W. Activity of extracts and fractions of five Guatemalan plants against *Trypanosoma cruzi*. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. **J. Ethnopharmacol**, v. 62, supl. II, p. 107-115, 1998.

BRENER, Z., COSTA, A.G. & CHIARI, E. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 18, p. 450-455, 1976.

BRENER, Z. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro. Ed. Guanabara Koogan, 1992.

BUCKNER F., WILSON A., WHITR T., VAN VOORHIS W. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 42, p. 3245-50, 1998.

CARNEIRO, M. História da doença de Chagas, 1963.

CABRAL, H.R., GLOCKER, T.M., NOVALS, I.T., KRAINBUHL, V.A. The esophagus in patients with Chagas disease in Cordoba, Argentina. Histologic-immunohistochemical, and evacuation time. **Rev. Fac. Cienc. Med. Univ. Nac. Cordoba**, v. 56, p. 27-33, 1999.

CASTELLANI O., RIBEIRO L.V., FERNANDES J.F. Differentiation of *Trypanosoma cruzi* in culture. **J. Protozool**, v. 14, p. 447-451, 1967.

CHIARI, E., DIAS, J.C.P., LANA, M., CHIARI, C.A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 22, p. 19-23, 1989.

CROFT, S.L. Pharmacological Approaches to Antitrypanosomal Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 2, p. 215-220, 1999.

DEANE, M.P., BRITO, T., DEANE, L.M. Pathogenicity to mice of same strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from wild animal. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v.5, p. 225-235, 1963.

DEVERA, R., ILLARRAMENDI, X., MONTOYA-ARAÚJO, R., PIRMEZ, C., FERNANDES, O., COURA, J.R. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Uberaba, v. 35, n. 4, p. 323-330, 2002.

DIAS, J.C.P. Aspectos socio culturales y económicos relativos al vector de la enfermedad de Chagas. In. **TONN, R. & CARCAVALLO, R. Factores Biológicos y Ecológicos en la Enfermedad de Chagas**. Organización Panamericana de la Salud/ Servicio Nacional de Chagas, Buenos Aires, v. 2, p. 289-304, 1985.

- DIAS, J.C.P. *Control of Chagas' disease in Brazil*. **Parasitology Today**, v. 3, p. 336-341, 1987.
- DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas Disease. **In: Wendel S., Brener Z., Camargo M.E & Rassi A. Chagas disease (American Trypanosomiasis)**: Its impact on transfusion and clinical medicine. ISBT Brazil 92- São Paulo, 1992.
- DIAS, J.C.P., CONTIJO, E.D. Epidemiologia da doença de Chagas. **In: Manejo clínico em doença de Chagas**. Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Medicina, Núcleo de Estudos em Doenças de Chagas, Belo Horizonte, 1995.
- DOCAMPO, R., SCHMUNIS, G.A Sterol biosynthesis inhibitors: potential chemotherapeutics against Chagas disease. **Parasitology Today**, v. 13, p. 129-130, 1997.
- DOST, C.K., ALBUQUERQUE, S., HEMLEBEN, V., ENGELS, W., PRADO Jr, J.C. Molecular genetic characterization of different *Trypanosoma cruzi* strains and comparison of their development in *Mus musculus* and *Calomys callosus*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 88, p. 609-616, 2002.
- DVORAK, J.A. & HOWE, C.L. The effects of Lampit (Bayer 2402) on the interaction of *Trypanosoma cruzi* with vertebrate cells *in vitro*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 26, p. 58-63, 1977.
- DOYLE, S.P., DVORAK, J.A., ENGEL, J.C. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. **J. Protozool.**, v. 31, p. 280-283, 1984.
- FAIRLAMB, A.H. Future prospects for the chemotherapy of Chagas' disease. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 59, supl. II, p.179-187, 1999.
- FERNANDES, O., MANGIA, R.H., LISBOA, C.V., PINHO, A.P., MOREL, C.M., ZINGALES, B., CAMPBELL, D.A., JANSEN, A.M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro (Brazil) revealed by the nontranscribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, London, v. 118, p. 161-166, 1999.

- FILARDI, L.S & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, p. 755-759, 1987.
- FRAYHA, G.J., SMYTH, J.D., GOBERT, J.G., SAVEL, J. The mechanisms of action of antiprotozoal and anthelmintic drugs in man. **Gen. Pharmacol.**, v. 28, n. 2, p. 273-299, 1997.
- HENRIKSSON, J., ASLUND, L., PETTERSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 12, p. 108-114, 1996.
- LIMA, J.T.F. Incremento do programa de controle da doença de Chagas no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 16, p. 128-129, 1983.
- MARTINEZ-DIAZ, R.A., ESCARIO, J.A., NOGAL-RUIZ, J.J., GOMEZ-BARRIO, A. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, n. 1, p. 53-59, 2001.
- MARTIN, F., MARAÑÓN, C., OLIVARES, M., ALONSO, C., LOPEZ, M.C. Characterization of a non-long terminal repeat retrotransposon cDNA (L1Tc) from *Trypanosoma cruzi*: homology of the first ORF with the Ape family of DNA repair enzymes. **J. Mol. Biol.**, v. 247, p. 49-59, 1995.
- MILES, M.A., TOYE, P.J., OSWALD, S.C., GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi* circulating independently in a rural area of Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 71, n. 3, p. 217-225, 1977.
- MILES, M.A., SOUZA, A.A., POVOA, M.M., SHAW, J.J., LAINSON, R., TOYÉ, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-21, 1978.
- MOREL, C., SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Baltimore, v. 29, supl. I, p. 1070-1074, 1980.

- MURTA, S.M.F. & ROMANHA, A.J. In vivo selection of a population of *Trypanosoma cruzi* and clones resistant to benznidazole. **Parasitology**, v. 116, p. 165-171, 1998.
- MURTA, S.M.F., KRIEGER, M.A., MONTENEGRO, L.R., CAMPOS, F.M., PROBST, C.M., ÁVILA, A.R., MUTO, N.H., OLIVEIRA, R.C., NUNES, L.R., NIRDÉ, P., ROMERO, O.B., GOLDENBERG, S., ROMANHA, A.J. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with in vitro-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 146, p. 151-162, 2006.
- NEAL, R.A. & VAN BUREN, J. Comparative studies of drug susceptibility of five strains of *Trypanosoma cruzi* in vivo and in vitro. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, p. 709-714, 1988.
- NIRDÉ, P., LARROQUE, C., BARNABÉ, C. Drug-resistance epimastigotes of *Trypanosoma cruzi* and persistence of this phenotype after differentiation into amastigotes. **C. R. Acad Sci Paris**, v. 318, p. 1239-1244, 1995.
- NOVAK, E., DE MELLO, M., GOMES, H.B., GUEVARA, P., RAMIREZ, J.L., FRANCO DA SILVEIRA, J. Repetitive sequences in the ribosomal intergenic spacer of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 60, p. 273-280, 1993.
- NOZAKI, T., ENGEL, J. & DVORAK, J. Cellular and molecular biological analyses of nifurtimox resistance in *Trypanosoma cruzi*. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, p. 111-117, 1996.
- PRATA, A. Chagas's disease. **Infect. Dis. Clin. North. Am.**, v. 8, p. 61-76, 1994.
- REQUENA, J.M., MARTIN, F., SOTO, M., LOPEZ, M.C., ALONSO, C. Characterization of a short interspersed reiterated DNA sequence of *Trypanosoma cruzi* located at the 3'- end of a poly (A) + transcript. **Gene**, v. 146, p. 245-250, 1994.
- REQUENA, J.M., LOPEZ, M.C., ALONSO, C. Genomic repetitive DNA Elements of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology Today**, v. 12, p. 279-282, 1996.

REVOLLO, S., OURY, B., LAURENT, J.P., BARNABÉ, C., QUESNEY, V., CARRIÈRE, V., NOEL, S., TIBAYRENC, M. *Trypanosoma cruzi*: impact of clonal evolution of the parasite on its biological and medical properties. **Exp. Parasitol.**, v. 89, p. 20-39, 1998.

RIBEIRO-RODRIGUES, R., DOS SANTOS, W., OLIVEIRA, A.B., SNECKUS, V., ZANI, C. & ROMANHA, A. Growth inhibitory effect of naftofuran and naftofuranquinone derivatives on *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, v. 5, p. 1509-1512, 1995.

SALMON, L., LANDRY, V., MELNYK, O., MAES, L., SHERGHERAERT, C., DAVIOUD-CHARVET, E. A general approach to the synthesis of polyamine linked-monoindolylmaleimides, a new series of trypanothione reductase inhibitors. **Chem.Pharm.Bull.**, v. 46, p. 707-710, 1998.

SCOTT, V.R. & MATTHEWS, T.R. The efficacy of an n-substituted imidazole, RS-49676, against a *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 37, p. 308-313, 1987.

SOUZA, D.H.F., GARRAT, R.C., ARAÚJO, A.P.U., GUIMARÃES, B.G., JESUS, W.D.P., MICHELS, P.A.M., HANNAERT, V., OLIVA, G. *Trypanosoma cruzi* glycosomal glyceraldehydes-3-phosphate dehydrogenase: structure, catalytic mechanism and targeted inhibitor design. **FEBS lett.**, v. 424, p. 131-135, 1998.

STEINDEL, M., DIAS NETO, E., MENEZES, C.L.P., ROMANHA, A.J., SIMPSON, A.J.G. Random amplified polymorphic DNA analysis of *Trypanosoma cruzi* strains. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 60, p. 71-80, 1993.

STOPPANI, A.O.M. Quimioterapia de la enfermedad de Chagas. **Medicina** (Buenos Aires), v. 59, Supl. II, p. 147-165, 1999.

TDR (WHO/UNDP/WB). Workshop about mathematical computer models in the control of Chagas' disease. Description of the final simulation model, including a listing of the computer program and of the data files (J. E. Rabinovich, org.), Caracas: IVIC, 1980.

TOLEDO, M.J.O., A.L.F. GUILHERME, J.C., SILVA, M.V., GASPERI, A.P., MENDES, M.L., GOMES & S. MARQUES DE ARAÚJO. *Trypanosoma cruzi*: chemotherapy with benznidazole in mice inoculated with strains from Parana state and from different endemic

areas of Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical**, São Paulo, v. 39, p. 283-290, 1997.

URBINA, J.A., MARCHAN, E., LAZARDI, K., APITZ-CASTRO, R., GIL, F., AGUIRRE, T., PIRAS, M.M., PIRAS, R. Inhibition of phosphatidylcholine biosynthesis and cell-proliferation in *Trypanosoma cruzi* by ajoene, an antiplatelet compound isolated from garlic. **Biochem.Pharmacol.**, v. 45, p. 2381-2387, 1993.

URBINA, J.A. Lipid biosynthesis pathways as chemotherapeutic targets in kinetoplastid parasites. **Parasitology**, v. 114, p. 91-99, 1997.

URBINA, J.A. Chemoterapy of Chagas' Disease: the how and the why. **J. Mol. Med.**, v. 77, p. 332-338, 1999.

VILLARREAL, D., NIRDÉ P., HIDE, M., BARNABÉ, C., TIBAYRENC, M. Differential gene expression in benznidazole-resistant *Trypanosoma cruzi* parasites. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 49, p. 2701-9, 2005.

WAGNER, W., SO, M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi* : involvement of multicopy genes. **Infection and Immunity** , v. 58, p. 3217-3224, 1990.

WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva: WHO. (Technical Report Series, 811), 1991.

WHO – World Health Organization Statisical Information System Website-
<http://www.who.ch>, 2003.

ZUCCOTTO, F., BRUM, R., PACANOWSKA, D.G., PEREZ, L.M.R., GILBERT, I.H. The struture-based desing and synthesis of selective inhibitors of *Trypanosoma cruzi* dihydrofolate reductase. **Bioorg. Med. Chem. Lett.**, v. 9, p. 1463-1468, 1999.