

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease

Caracterização biológica e avaliação do potencial para reativação das populações do *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes com a forma digestiva da Doença de Chagas

Wanessa Maria Dos Santos
Eliana Lages Silva
Cristiane Pontes Andrade

Abstract: In patients with natural or induced immunodepression, for example, by means of the human immunodeficiency virus (HIV), the *trypanosoma cruzi* may behave as an opportunist pathogen, making possible the re-activation occurrence of Chagas Disease in these patients. It has already been discussed that patients with the digestive form of this disease show a depletion of the TCD4 cells in the circulating blood, suggesting that this clinical form could also be related to depression of the immune response. Thus, the purpose of this study was to evaluate experimentally the biological behavior, the ability for re-activation and genetic profiles of *T. cruzi* populations isolated in two patients with the digestive form of the Chagas Disease. In order to do this, 25 mice per isolate were infected with 3×10^3 trypomastigotes of the *t. cruzi*. The evaluation of the biological parameters (infectivity, mortality, parasitemy, and pre-patent and patent periods) analysed during the acute phase of infection, showed the occurrence of patente parasitemy, however, low, during the evaluation period. The period of occurrence of the parasitemy peak under observation (average of 33,5 days) and the low morbidity rate (15%) are equivalent to that observed for the bioderm III strain. In this phase, analysis of the tissue parasitism by Hematoxylin and Eosin stain put in evidence parasitism in 20% of the animals, and the parasites were found in the heart and bladder. The hematoxylin and Eosin stain technique showed inflammation only in the cardiac tissue and in the smooth muscle tissue of the gastrointestinal joints, during the acute phase. In the chronic phase there was no significant statistical difference in the number of animals, immunosuppressed (33,3%) or not (20%), that showed tissue trypomastigotes, and a greater number of animals with inflammation of the heart tissue among those immunosuppressed. The opposite occurred only for the gastrointestinal joints. The analysis of the genetic data characterization shows that there was a tendency to the emergence of *t. cruzi* populations after immunosuppression in the chronic phase of the infection, detected by the LSSP-PCR technique, only for the 1931 isolated, suggesting a strain-dependent reactivation process. However, the genetic characterization showed that the *t. cruzi* populations present in the inoculated material in the mice was different from that found in the patients' blood, showing that the results obtained in this study cannot be extrapolated to the human cases of the Chagas Disease.

Keywords: *Trypanosoma cruzi* . Chagas Disease. Immunosuppression.

Resumo: Em pacientes com imunodepressão natural ou induzida, por exemplo, pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), o *trypanosoma cruzi* pode comporta-se como um patógeno oportunista, possibilitando a ocorrência de reativação da Doença de Chagas nestes pacientes. Já foi demonstrado que pacientes com a forma digestiva da doença apresentam uma depleção de células TCD4 no sangue circulante, sugerindo que esta forma clínica também possa estar relacionada com a depressão da resposta imune. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar experimentalmente o comportamento biológico, a capacidade de reativação e os perfis genéticos de população do *T. cruzi* isoladas de dois

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

pacientes com a forma digestiva da doença de chagas. Para isso, 25 camundongos por isolado foram infectados com 3×10^3 tripomastigotas do *T. cruzi*. A avaliação dos parâmetros biológicos (infectividade, mortalidade, parasitemia e períodos pré-patente e patente) avaliados durante a fase aguda da infecção mostrou a ocorrência de parasitemia patente, porém baixa, durante todo o período de avaliação. O período de ocorrência pica de parasitemia observado (médio de 33, dias) e a baixa taxa de mortalidade (15%) equivale ao observado para as cepas do biotipo III. Nesta fase, a análise do parasitismo tecidual pela hematoxilina-eosina evidenciou parasitismo em 20% dos animais, sendo encontrados parasitos no coração e na bexiga. A técnica da hematoxilina-eosina inflamação apenas nos tecidos cardíacos e musculares liso das junções gastrintestinais, durante a fase aguda. Na fase crônica não houve diferença estatística significativa no número de animais, imunossuprimidos (33%) ou não (20%) que apresenta amastigota tecidual, e observou-se um maior número de animais com inflamação do tecido cardíaco em aqueles imunossuprimidos. O inverso ocorreu para as junções gastrintestinais. A análise dos dados da caracterização genética mostra que houve uma tendência a emergência de populações dos presentes no material inoculado nos camundongos foi divergente daquelas encontradas no sangue dos pacientes, mostrando que os resultados obtidos neste estudo não podem ser extrapolados para os casos humanos da Doença de chagas.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*. Doença de Chagas. Imunossupressão.

1 Introdução

A tripanossomíase americana, conhecida como Doença de Chagas, foi descoberta há um século por Carlos Chagas, sob circunstâncias peculiares. Ao ser enviado a um povoado em Minas Gerais para dirigir uma campanha antimalárica, tomou conhecimento de um inseto hematófago, o vetor da infecção parasitária presente na casa de barro e madeira da região (CHAGAS, 1909). Neste contexto, Chagas conseguiu determinar o ciclo parasitário, identificar os insetos vetores, os reservatórios domésticos e silvestres do parasito, descrever a doença e seu diagnóstico.

A Doença de Chagas é encontrada de forma endêmica do norte do México ao sul da Argentina (URBINA; DOCAMPO, 2003). Sua prevalência e incidência variam devido ao impacto dos programas de controle da transmissão do vetor, movimentos migratórios humanos de áreas rurais para urbanas e mudanças no padrão sócioeconômico das comunidades em risco (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). Os países com maior incidência incluem Bolívia, Brasil, Argentina, Chile e Venezuela. Globalmente, a moléstia representa a terceira doença tropical mais importante,

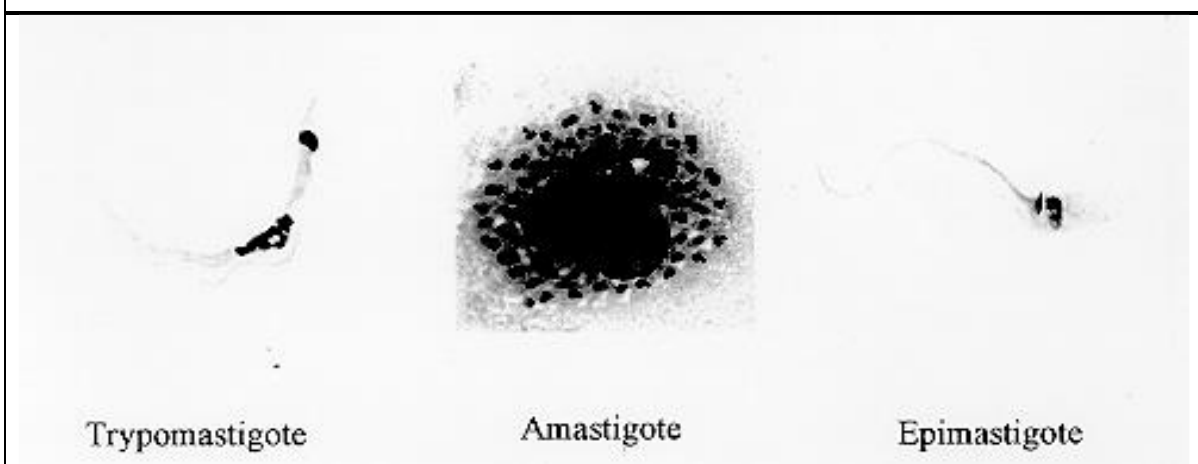
SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

estimando que haja aproximadamente de 10 a 12 milhões de indivíduos infectados (GASCON et al., 2007).

O *T. cruzi* pertence ao filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, e se caracteriza pela presença de um flagelo e uma única mitocôndria, onde está localizado o cinetoplasto que corresponde a uma condensação do DNA extra-nuclear, presente em todos os membros da ordem Kinetoplastida (DE SOUZA, 1999). O cinetoplasto é formado por uma rede de moléculas de DNA circulares concatenadas de dois tipos, denominadas minicírculos e maxicírculos, e compreende aproximadamente 20-25% do DNA celular total do *T. cruzi* (WESTENBERGER et al., 2006).

Durante seu ciclo evolutivo, as diferentes formas do *T. cruzi* são caracterizadas com base na posição relativa entre o cinetoplasto e o núcleo, e pela presença ou ausência de um flagelo, Apresentando basicamente três formas morfológicas: tripomastigotas, amastigota e epimastigota (Figura 1). Além disso, os diferentes estágios evolutivos do parasito apresentam uma variabilidade genética em suas populações, gerando cepas com características próprias, variando o tropismo tecidual e a virulência (CAMARGOS et al., 2000).

Figura 1. Estágios de desenvolvimento do *Trypanosoma cruzi*.



Fonte: DE SOUZA, 1999.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Na maioria dos casos envolvendo o homem e outros mamíferos a infecção ocorre através da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas, eliminadas nas fezes e/ou urina dos triatomíneos durante o repasto sanguíneo, pela pele lesada ou mucosa íntegra. Porém, a transmissão também pode acontecer por vias alternativas como, congênita, oral, por transfusão sanguínea ou acidentes de laboratórios e transplantes (WHO, 2002).

Depois que o parasito infecta o indivíduo, há um período de incubação que pode variar de 1-2 semanas (Revisado por MACEDO et al., 2002). A doença se manifesta por uma fase aguda, compreendendo os fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros meses de infecção caracterizada pela presença abundante de parasitas no sangue, seguida por uma longa fase crônica, com escassos parasitas, e remota possibilidade de cura espontânea. A fase aguda ocorre em qualquer idade, contudo demonstram predomínio dos casos na primeira década de vida (PELLEGRINO; REZENDE, 1953; PRATA, 2001; WHO, 2002; MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006).

A porta de entrada da infecção pode ser aparente ou inaparente. Quando existe porta de entrada aparente, esta pode ser observada sob a forma de nódulo ou eritema na pele (Chagoma de inoculação) ou um edema bipalpebral (sinal de Rômana), quando a penetração se dá pela conjuntiva ocular (DIAS, 1997; ANDRADE, 2005).

As manifestações clínicas e sintomas agudos desaparecem cerca de 4-8 semanas após o início da infecção (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006). De um modo geral quando se obtém um desequilíbrio entre o parasito-hospedeiro, a doença passa para a fase crônica, onde o número de tripomastigotas na corrente sanguínea reduz a níveis indetectáveis nos exames diretos. Esta fase é caracterizada por um longo período de latência clínica, chamada de forma indeterminada, que pode durar de 10-30 anos em vários casos ou permanecer por toda a vida (PRATA, 2001; WHO, 2002).

Após esse período vários indivíduos podem apresentar diferentes manifestações clínicas relacionadas ao comprometimento de determinados órgãos (ANDRADE, 2000; PRATA, 2001; WHO, 2002; COURA, 2003). As diferentes manifestações clínicas encontradas nos indivíduos infectados podem estar relacionadas às variações

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Eurípedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

na resposta imune contra o parasito. Se esta resposta for ineficaz, há um descontrole na carga parasitária, acarretando reações inflamatórias persistentes e o agravamento da doença. Acredita-se que a resposta imune desenvolvida na fase aguda exerça um papel crucial nas manifestações crônicas da doença (TARLETON, 2003; MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006).

Para Higuchi e colaboradores (2003), a baixa frequência de positividade do xenodiagnóstico, durante a fase crônica da Doença de Chagas e elevada durante episódios de reativação em pacientes imunodeprimidos, evidenciam que o parasito está presente sob um controle ativo do sistema imunológico do hospedeiro na fase crônica.

De acordo com COURA (2007) as diferentes fases e formas clínicas da Doença de Chagas podem ser subdivididas em fase aguda assintomática, oligossintomática ou sintomática. Essa evolui para a fase crônica na qual o indivíduo infectado pode permanecer na forma indeterminada ou evoluir para a forma cardíaca, digestiva, mista (cardíaca e digestiva) ou nervosa (existência duvidosa e recentemente relatada em pacientes imunodeprimidos).

A prevalência e distribuição geográfica das formas clínicas da Doença de Chagas são divergentes, variando entre os países e apresentando diferenças regionais em um mesmo país, como mostrado por dados anátomo-clínicos e estudos longitudinais da população de áreas endêmicas. Essa diferença possivelmente ocorre devido a fatores, como controle de vetores, triagem de doadores de sangue, assistência médica e social, diferentes cepas de *T. cruzi*, condições nutricionais do paciente, resistência natural a infecção e cor (DIAS et al., 2002).

No Brasil, alguns estudos demonstram que na Bahia predomina a forma cardíaca, em Goiás os “megs”, em Minas Gerais as formas mistas (cardíaca e digestiva) e no Rio Grande do Sul e Rio de Janeiro a forma indeterminada (REZENDE; MOREIRA, 2000; COURA et al., 1983).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

A primeira referência documentada da suspeita da existência da forma digestiva na Doença de Chagas surgiu em 1916, quando o próprio Carlos Chagas observou que durante a infecção aguda, alguns adultos exibiam uma acentuada disfagia para determinados tipos de alimentos cuja ingestão necessitava de ser acompanhada de água. Os pacientes relatavam que o trânsito do alimento era interrompido no esôfago, causando imensa dor. Mesmo a ingestão de líquidos poderia ser difícil, sendo às vezes impossível, havendo desta forma, a necessidade de que o mesmo fosse administrado em pequenas doses. Tal fenômeno, sem qualquer explicação patogênica na época, foi denominado então de “Mal do Engasgo” (CHAGAS, 1916).

As manifestações digestivas da Doença de Chagas têm sido relatadas em diversos países como Uruguai, Peru, Bolívia (revisto em REZENDE; MOREIRA, 2000) e apresenta importância epidemiológica na Argentina, Chile e Brasil (ROMAÑA; ROMAÑA, 1960; ATIAS, 1969; CASTRO et al., 1992; COURA et al., 1985), apresentam prevalência em torno de 10,9%, com discrepâncias dependendo do tipo de estudo elaborado. com diferenças regionais nítidas de acordo com o país ou região estudada. Os dados obtidos com estudos anatomopatológicos apontam o megacólon como a manifestação digestiva de maior frequência (LOPES et al., 1989). Contudo, estudos clínico-radiológicos mostram maior frequência do megaesôfago (COURA et al., 1983).

No Brasil, esta forma da doença é mais incidente em Minas Gerais, São Paulo, Goiás e Bahia, sendo o megaesôfago a forma mais comum. Estudos longitudinais avaliando a incidência da esofagopatia chagásica mostram resultados variáveis em diferentes regiões do país: 3,9% na Bahia; 2% em Goiás; entre 2,9% a 8,8% em Minas Gerais (COURA et al., 1985; PEREIRA et al., 1985; CASTRO et al., 1992).

As manifestações digestivas podem ser encontradas isoladamente ou em associação com a forma cardíaca da Doença de Chagas. A presença do megaesôfago e do megacólon em um mesmo paciente é frequente, ocorrendo em 37,7% dos casos (XIMENES et al., 1984). A associação com a cardiopatia chagásica foi detectada em 50% dos chagásicos com megaesôfago (DIAS et al., 1983).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

O megaesôfago ocorre mais comumente fase crônica da doença, contudo, o tempo necessário para o seu desenvolvimento após a fase aguda é variável. Existem relatos de casos de evolução rápida, como indicado pelo diagnóstico da presença de megaesôfago em crianças, ou o seu aparecimento dentro de 1 a 3 anos em adultos (revisto por MACEDO, 1999) ou ainda, casos com lenta evolução demorando até 13 anos para sua manifestação (CASTRO et al., 1992).

É consenso que o tempo necessário para a evolução das alterações esofágicas é menor do que o necessário para o desenvolvimento da cardiopatia chagásica. A forma digestiva antecipa o envolvimento cardíaco em muitos pacientes (TEIXEIRA et al., 2006).

A incidência da forma digestiva da Doença de Chagas nas diferentes faixas etárias vem sofrendo alterações, ao longo do tempo. Em Uberaba-MG, no ano de 1947, foi constatado que 4,7% dos pacientes com megaesôfago e 6% com megacólon tinham idade superior a 60 anos (FREITAS JR., 1950). Contudo, estudo realizado em Ribeirão Preto-SP, entre 1979 a 1990 verificou que 28% dos pacientes com megaesôfago e 33,5% dos pacientes com megacólon apresentavam idade superior a 60 anos (MENEHELLI et al., 1991), recentemente Kamiji; Oliveira (2005) evidenciaram que a maioria dos portadores da forma digestiva da Doença de Chagas são pacientes geriátricos.

O sistema nervoso entérico tem por ação interagir e coordenar as diferentes funções viscerais. Para uma motilidade ordenada dos diversos segmentos do trato digestivo, principalmente esôfago e cólon, é necessário uma inervação intrínseca íntegra. A sensibilidade dos músculos lisos a diferentes estímulos como distensão, trauma, concentração iônica, entre outros, é dependente da ação moderada do plexo mionterico. No entanto, situações que levam a desnervação intrínseca do sistema digestivo repercutem necessariamente na fisiologia dos órgãos atingidos (REZENDE; MOREIRA, 2000).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Eurípedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

A Doença de Chagas crônica, em sua forma digestiva, está associada com destruição parcial ou total dos neurônios dos plexos mioentéricos de Auerbach e de Meissner. Essa deservação ocorre de maneira irregular e descontínua, ao longo de todo trato digestivo dependendo de fatores ligados ao parasito e hospedeiro (MENEGHELLI, 2004).

O mecanismo que determina como se processa a destruição neuronal não está completamente esclarecido, tendo sido sugeridas duas hipóteses (ANDRADE; ANDRADE, 1966): primeiro, destruição direta por produtos parasitários, representados por uma neurotoxina ou por enzimas, provenientes do rompimento de ninhos parasitários; segundo, destruição indireta em consequência da reação inflamatória, ocasionada pela presença do parasito ou indiretamente provocada pelos mesmos.

No trato gastrointestinal as alterações de motilidade do esôfago e do cólon, se sobressaem na forma digestiva, resultante em megaesôfago e megacólon. Observa-se que o cólon é mais acometido, seguido pelo esôfago e pela associação megaesôfago e megacólon (FIGUEIRÊDO et al., 2002).

O achado anatômico normalmente encontrado nesta forma clínica da Doença de Chagas é a destruição das células ganglionares parassimpáticas, associadas às camadas musculares dos órgãos dilatados. O processo inflamatório e a destruição neuronal nos plexos mioentéricos estão associados com miosite e fibrose na musculatura lisa destes órgãos (MONCAYO; ORTIZ YANINE, 2006).

A presença de parasitos é raramente detectada na análise histopatológica, contudo, testes moleculares que apresentam o kDNA do *T. cruzi* como alvo de amplificação pela PCR indicando a presença do parasito diretamente o qual parece influenciar no desenvolvimento das lesões crônicas encontradas na forma digestiva da Doença de Chagas (VAGO et al., 1996; LAGES-SILVA et al., 2001).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Embora todo o cólon possa estar alargado, geralmente apenas a dilatação do o sigmóide e o reto é observada, sendo a constipação uma complicação frequente, podendo ocorrer também meteorismo e disquezia (FIGUEIRÊDO et al., 2002). Ao exame do enema opaco o aumento do calibre da sigmóide em relação ao normal é o elemento de definição (CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS, 2005). O espessamento da camada muscular circular ocorre precocemente na doença. Em chagásicos crônicos com megacólon, há uma redução no número de gânglios ao longo de todo o cólon.

Em relação ao esôfago, os plexos mioentéricos constituem cerca de 5% da massa esofágica total e a densidade neuronal varia ao longo da extensão da víscera, aumentando a partir do nível da cartilagem cricóide até o esôfago médio e mantendo sua densidade até a cárdia. Pacientes com megaesôfago podem ter menos que 95% do número normal de gânglios com perda de neurônios uniforme ao longo da extensão do esôfago. Um megaesôfago pode atingir 26 vezes o seu peso normal e armazenar mais de dois litros de líquido. Histologicamente há espessamento epitelial e infiltração de leucócitos (ocasionalmente profundo na mucosa muscular e submucosa). A mucosa espessada pode ter erosões e esofagites, como resultado da estagnação peristáltica (TANOWITZ et al., 1992).

Disfagia, dor esofagiana espontânea, regurgitação, odinofagia, pirose, constipação intestinal, sialose com hipertrofia glândulas salivares e manifestações pulmonares, são as manifestações clínicas mais comuns relacionadas ao megaesôfago (FIGUEIRÊDO et al., 2002; VALEZI et al., 2004).

O diagnóstico da esofagopatia chagásica baseia-se em exames clínicos, laboratoriais e radiológicos. O exame radiológico constitui o método mais importante, devido aos diferentes padrões de apresentação morfológica (REZENDE; MOREIRA, 2000).

O Quadro 1 e a Figura 2 demonstram os grupos radiológicos segundo classificação de Rezende em 1982.

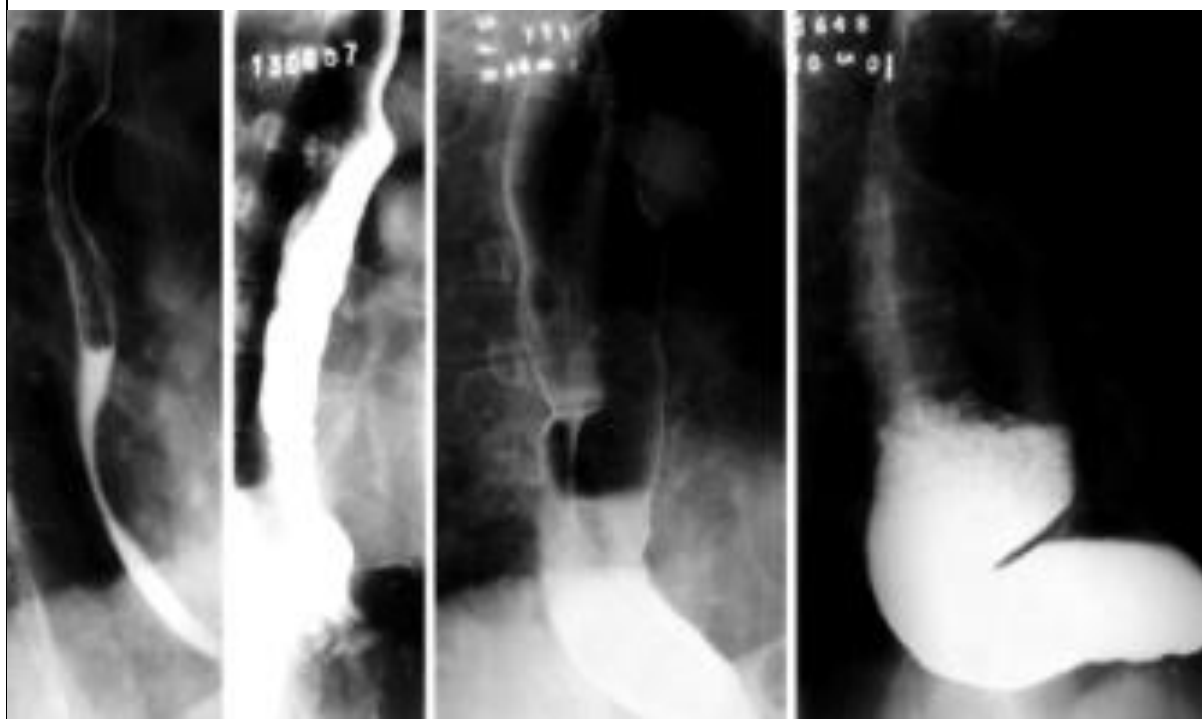
SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Quadro 1. Classificação radiológica do megaesôfago chagásico.

Grupo I	Grupo II	Grupo III	Grupo IV
Calibre aparentemente normal ao exame radiológico.	Aumento pequeno a moderado do calibre.	Grande aumento de diâmetro.	Dolicoesôfago.
Trânsito lento.	Apreciável retenção de contraste.	Atividade motora reduzida.	Grande capacidade de retenção, atônico, alongado, dobrando-se sobre a cúpula diafragmática.
Pequena retenção na radiografia tomada um minuto após a ingestão de contraste.	Presença frequente de ondas terciárias, associadas ou não a hipertonía do esôfago.	Hipotonía do esôfago inferior.	
		Grande retenção de contraste.	

Fonte: REZENDE, 1982.

Figura 2. Grupos radiológicos da esofagopatia chagásica segundo classificação de Rezende (1982). Da esquerda para a direita: grupo I, grupo II, grupo III, grupo IV



Fonte: FIGUEIRÊDO, 2002.

Desde há várias décadas, os casos de reativação da Doença de Chagas em indivíduos imunodeprimidos têm sido documentados (FERREIRA, 1999). Provavelmente, este processo ocorre devido à quebra do equilíbrio entre o parasito e

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

hospedeiro, resultando na multiplicação do parasito, com consequente aumento da parasitemia e da inflamação tecidual (SARTORI et al., 1998).

O processo de reativação pode ser induzido pela imunodepressão de qualquer etiologia como neoplasias, transplante e drogas (BOCCHI et al., 1996; SALGADO et al., 1996; RASSI et al., 1997; RASSI et al., 1998; GALLERANO et al., 2007; MARCHIORI et al., 2007). Com o surgimento da epidemia da Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (SIDA), na década de 80, houve aumento de interesse no estudo em áreas endêmicas para Doença de Chagas devido à possíveis casos de reativação dessa parasitose em indivíduos imunocomprometidos pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e co-infectados com *T. cruzi* (FERREIRA et al. 1997; GALHARDO et al., 1999; FERREIRA, 2009). Além desses fatores relacionados ao parasito como cepa, genótipo e níveis de parasitemia, também podem estar relacionados à reativação da Doença de Chagas (PEREIRA et al., 1996).

Estudos conduzidos em modelos experimentais cronicamente infectados com *T. cruzi*, e que receberam diferentes drogas imunossupressoras, demonstraram a reativação da doença com aumento da parasitemia e mortalidade, podendo determinar seu caráter oportunista (BRENER; CHIARI, 1971; ANDRADE et al., 1987; PEREIRA et al., 1996; ANDRADE et al., 1997; GUERRA et al., 2001; TANIWAKI et al., 2005).

Após obter uma cura clínica da doença com uso de medicamentos tripanossomicidas ou nos casos assintomáticos, a relação parasito-hospedeiro pode ser alterada através do tratamento com drogas imunossupressoras capazes de modular a imunidade celular e a produção de anticorpos (CALABRESE, 1999).

Por outro lado, quando são administradas antes da infecção as drogas imunossupressoras podem promover um aumento da imunidade celular, induzindo resistência contra o agente intracelular (TRIPATHY; MACKANESS, 1969) e em animais com infecção reativa, o uso de medicamentos tripanossomicida reduz as manifestações da doença impedindo a reativação (NISHIOKA, 2000).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Eurípedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

O critério atualmente aceito como o padrão-ouro para o diagnóstico da reativação da Doença de Chagas é a detecção de formas tripomastigotas do parasito no sangue periférico, no líquido pericárdico ou no líquido, detectados ao exame microscópico direto (PEREZ-RAMIREZ et al., 1999; SARTORI et al., 2002; RELATÓRIO TÉCNICO, MS, 2006; DIEZ et al., 2007). Como métodos diretos no sangue estão disponíveis o exame a fresco, a pesquisa em creme leucocitário, o microhematócrito e o método QBC (*Quantitative Buffy Coat*). No líquido, o parasito é pesquisado no precipitado de material centrifugado (RELATÓRIO TÉCNICO, MS, 2006). Porém, não ocorre aumento nos títulos de IgM e IgG (SARTORI, 1998; PRATA, 2001).

Para fins de vigilância epidemiológica, são considerados casos de reativação da Doença de Chagas apenas aqueles que apresentarem detecção de infecção pelo *T. cruzi* por diagnóstico parasitológico direto no sangue ou outros fluídos corporais, associado à meningoencefalite e/ou miocardite aguda. Diante da suspeita clínica, a negatividade da pesquisa direta do parasito não exclui a possibilidade de reativação da Doença de Chagas. Nestes casos, pesquisas repetidas no sangue e no líquido devem ser realizadas (RELATÓRIO TÉCNICO, MS, 2006).

Em geral, a imunodepressão em pacientes com infecção pelo *T. cruzi* resulta em reativação da infecção com manifestações clínicas mais graves que as habitualmente observadas nas formas agudas resultantes de transmissão por triatomíneos ou pós-transfusionais. Geralmente os episódios de reativação são caracterizados por astenia, febre, anorexia, anemia, presença de nódulos subcutâneos dolorosos e alterações cardíacas e/ou neurológicas. Ou ainda, a imunodepressão pode permanecer inteiramente assintomática, sendo evidenciada somente pela parasitemia (DIEZ et al., 2007).

Nos episódios de reativação, o Sistema Nervoso Central (SNC) encontra-se entre 75% a 80% dos casos, e o coração, em 25% a 44% (FERREIRA, 1999; VAIDIAN et al., 2004). Além destes, outras apresentações incomuns tem sido descritas, como por exemplo, envolvimento gástrico e esofágico (FERREIRA et al., 1997; FONTES REZENDE et al., 2006) e neoplasias uterinas (CONCETTI et al., 2000).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Um aspecto de grande importância, observado em mais de 80% dos casos de reativação em pacientes HIV-positivos, foi a ocorrência deste processo quando a contagem de células T CD4 era menor que 200 células/mm³ (FERREIRA et al., 1997; SARTORI et al., 2002; RELATÓRIO TÉCNICO, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006; SARTORI et al., 2007).

Estudos experimentais mostram que a infecção aguda pelo *T. cruzi* induz alterações na resposta imune para contornar os mecanismos de defesa do hospedeiro. Além disso, observa-se uma redução na expressão de linfócitos CD3, CD4 e CD8, favorecendo sobrevivência do parasito (WHO, 2002).

As células T compreendem a grande maioria das células presentes no infiltrado inflamatório e no miocárdio de pacientes chagásicos, e um grande número de estudos tem demonstrado a habilidade destes linfócitos de reagir ao parasito e a antígenos do hospedeiro relacionados à Doença de Chagas. Portanto, é provável que as células T sejam as principais responsáveis pela reatividade imune nesta doença. Na Doença de Chagas, a importância das células T CD4, provavelmente através de sua função auxiliar na produção de anticorpos, foi demonstrada em estudos com modelos animais. A depleção destas células pela administração de anticorpos anti-CD4 em camundongos durante o curso da infecção conduziu a níveis elevados de parasitemia (RUSSO et al., 1988), e camundongos atímicos que receberam células T CD4 foram capazes de conter o desenvolvimento da parasitemia melhor que os camundongos controles (KIERSENBAUM, 1995).

Em pacientes portadores de megaesôfago tem sido observada depleção de células TCD4 no sangue circulante (LE MOS et al., 1998), sugerindo que esta forma clínica poderia também estar relacionada à depressão da resposta imune, e consequentemente com a liberação de populações do parasito com tropismo por este tecido.

Segundo Lemos e colaboradores (1998), existem três hipóteses que podem estar relacionadas com o decréscimo de células T CD4 no sangue periférico destes pacientes: ineficaz maturação de estas células devido ao estado de subnutrição

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

destes indivíduos com forma moderada a grave da doença; susceptibilidade destas células à apoptose; diferença no padrão de migração destas células para o local das lesões teciduais induzidas pela infecção pelo *T. cruzi*.

Estudo realizado por este grupo de pesquisa demonstrou que as populações do *T. cruzi* com tropismo pela musculatura lisa das junções gastrintestinais foram provenientes, em sua maioria, de animais infectados com cepas de pacientes portadores do HIV com reativação da Doença de Chagas (ANDRADE, 2008). Nestes pacientes o baixo nível de CD4 poderia permitir a exacerbação de clones específicos com tropismo seletivo por este tecido.

O processo de reativação da Doença de Chagas somente pode ser observado em pacientes imunodeprimidos, ocorrendo provavelmente devido a um desequilíbrio na relação parasito-hospedeiro, com diminuição da resposta imune celular com consequente maior multiplicação do parasito e lesão tecidual (SARTORI et al., 1998). Fatores relacionados ao parasito, como cepa, genótipo e níveis de parasitemia, também podem estar relacionados à reativação da Doença de Chagas.

Andrade (2008) demonstrou um marcado parasitismo da musculatura lisa das junções gastrintestinais, principalmente entre os animais infectados com cepas isoladas de pacientes com reativação da Doença de Chagas, nos quais o baixo nível de CD4 poderia permitir a exacerbação de clones específicos com tropismo seletivo por este tecido. Semelhante ao que ocorre em indivíduos infectados pelo HIV, tem sido demonstrado que chagásicos portadores de megaesôfago apresentam uma diminuição no nível de linfócitos T CD4 circulantes (LEMOS et al., 1998).

Considerando que estes constituem um fator essencial no controle do *T. cruzi* em todas as fases da doença (CALABRESE, 1999; SARTORI et al., 1999), questiona-se a possibilidade desta forma clínica estar relacionada com a depressão da resposta imune, e consequentemente com a liberação de populações do parasito com tropismo por este tecido.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Estes dados mostram que a importância do *T. cruzi* constituir um agente infeccioso capaz de gerar casos de reativação da Doença de Chagas em pacientes com algum grau de imunodepressão. Assim, a prévia caracterização de padrões biológicos e genéticos das cepas do parasito associadas às reativações poderá permitir uma monitoração adequada do *T. cruzi* nos pacientes portadores das mesmas com aumento da sobrevida (SARTORI et al., 1998; SARTORI et al., 1999).

2 Objetivos

O objetivo geral deste estudo é determinar experimentalmente o perfil biológico e o potencial para reativação das populações do *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes com a forma digestiva da Doença de Chagas, tendo como objetivos específicos: analisar o nível de parasitemia, taxa de mortalidade e parasitismo tecidual das populações de *Trypanosoma cruzi*, ocorrido durante a fase aguda e a fase crônica (antes e após imunossupressão) da infecção experimental em camundongos; detectar a emergência de novas populações do *Trypanosoma cruzi*, após a imunossupressão experimental, comparando os perfis genéticos do parasito, antes e após imunossupressão, com aqueles presentes no isolado dos pacientes; e finalmente, estabelecer relação entre os dados experimentais das populações do *Trypanosoma cruzi* com a clínica dos pacientes na forma gastrointestinal dos quais foram isolados.

3 Material e métodos

Este estudo foi experimental, prospectivo e longitudinal com corte transversal. Compuseram a amostra 50 camundongos *Swiss*, machos, pesando em torno de 20g, nascidos e mantidos no biotério da Disciplina de Parasitologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM), em condições apropriadas de temperatura, umidade, alimentação e água *ad libitum*. A linhagem *Swiss* pertence a um grupo heterogêneo, com características semelhantes às da população humana residente nas áreas endêmicas para doenças de Chagas, sendo por isso utilizado neste estudo experimental.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

No decorrer do período de imunossupressão foi administrada aos animais água acidificada (pH 5,0) e utilizada maravalha previamente autoclavada. Este trabalho faz parte do projeto encaminhado à Comissão de Ética no Uso de animais (CEUA) da UFTM, com o protocolo de número 29.

Foram utilizados dois isolados de *T. cruzi* obtidos a partir da hemocultura de pacientes com a forma digestiva da Doença de Chagas, realizadas na disciplina de Parasitologia da UFTM, entre 1931 e 1956. Para a obtenção das formas tripomastigotas do parasito utilizadas na infecção dos animais, as hemoculturas foram semeadas em cultura de macrófagos peritoneais de camundongo.

No momento do isolamento das cepas, uma amostra do sangue de cada paciente foi diluída, volume a volume, com guanidina-EDTA (guanidina-HCl 6M e EDTA dissódico 0,2M, pH 8,0, de acordo com Ávila e colaboradores, 1991), visando a posterior comparação entre os perfis genéticos das populações do parasito inoculados nos animais e aquelas isoladas nas fases tanto aguda quanto crônica, e após imunossupressão.

Foram utilizados grupos de 25 camundongos por isolado de *T. cruzi*. Cada animal foi infectado via intraperitoneal, com inóculo de 3×10^3 tripomastigotas, obtidos de cultivo celular dos isolados dos pacientes.

A infectividade dos isolados foi avaliada a partir do segundo dia após a infecção, pelo exame a fresco. Os casos nos quais não foi observada a positividade do exame a fresco foram submetidos ao exame de microhematócrito e/ou hemocultura. Pela análise das curvas de parasitemia foram determinados os períodos pré-patente e patente, assim como os picos e os dias correspondentes ao máximo de parasitemia. A taxa de mortalidade dos camundongos foi avaliada até o início da imunossupressão.

O exame a fresco foi realizado a partir da coleta de 5 µl de sangue, obtidos da cauda dos animais, colocado entre lâmina (26mm x 76mm) e lamínula (22mm x 22mm) e examinado ao microscópio com objetiva de 40x. E, a contagem dos parasitos, realizada pelo método de Brener (1962).

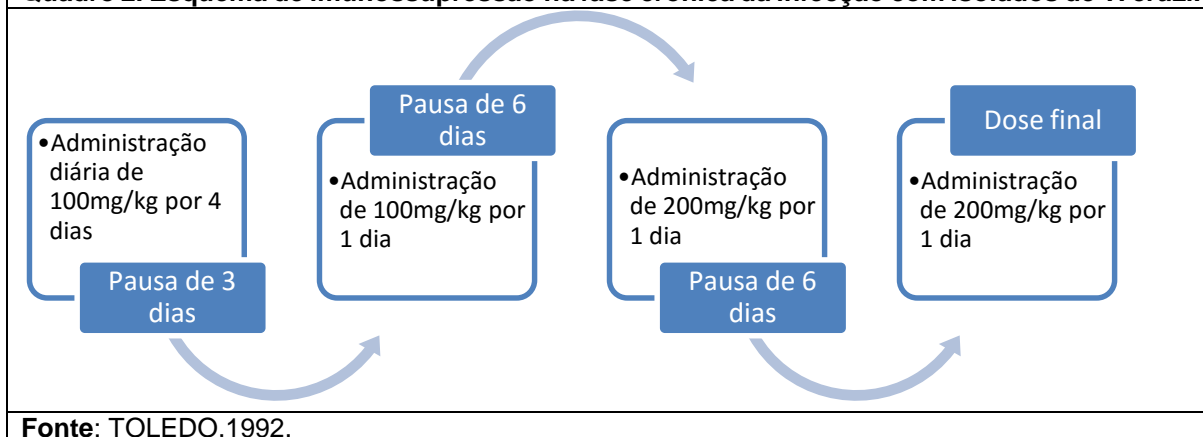
SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

O exame do microhematócrito ocorreu pela coleta de sangue do seio venoso retro-orbital de cada animal em tubo microcapilar heparinizado, até 50% de sua capacidade. Os tubos microcapilares foram vedados ao fogo e centrifugados a 9615xg em centrífuga própria. A análise efetuada em microscópio com objetiva de 10x, na região da interface leucócitos/plasma para a pesquisa de tripomastigotas sanguíneos do *T. cruzi*.

A técnica de hemocultura (CHIARI et al., 1989) ocorreu naqueles animais que apresentaram microhematócrito negativo. A coleta do sangue de cada camundongo foi feita, de modo asséptico, puncionando-se o seio venoso retro-orbital. O sangue foi adicionado em tubo de 15mL contendo três mililitros de meio de cultura LIT e mantidos em incubadora B.O.D., a 28° C. Para verificação da positividade os tubos receberam análise quinzenalmente até 90 dias após a realização da coleta do sangue, pelo exame alíquotas de 10 µl da suspensão entre lâmina e lamínula (22 mm x 22 mm), com aumento de 400 vezes.

Quatro meses após a infecção com os isolados de *T. cruzi*, realizou-se a imunossupressão em 11 a 14 animais de cada grupo, utilizando-se a ciclofosfamida (Cycram® - Meizler Comércio Internacional S.A.). A ciclofosfamida foi diluída em água estéril para injeções, de acordo com recomendações do fabricante, e administrada aos animais por via intraperitoneal. As doses do imunossupressor foram administradas a cada animal de acordo com o Quadro 2.

Quadro 2. Esquema de imunossupressão na fase crônica da infecção com isolados de *T. cruzi*.



SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges *LIPH Science*, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Cinco animais de cada grupo foram utilizados como controles infectados e não imunossuprimidos nos quais foi administrada água estéril para injeções correspondente ao mesmo volume de ciclofosfamida injetada nos animais imunossuprimidos.

A parasitemia de 10 camundongos de cada grupo foi avaliada a cada dois ou três dias, na fase aguda da infecção, do segundo ao 60º dia através do exame a fresco, e quantificados segundo Brener (1962). As curvas de parasitemia de cada isolado foram obtidas a partir da média aritmética de parasitos encontrados nos 10 camundongos avaliados, em cada dia de contagem.

Para avaliação da reativação a parasitemia foi avaliada por meio de microhematócrito e/ou exame a fresco, realizados antes do início do tratamento com a ciclofosfamida e diariamente durante a imunossupressão.

Com o auxílio do microhematócrito e/ou exame a fresco, foi feita a análise da reativação, antes do início e após o período de imunossupressão. Segundo a tabela adaptada de Torrico e colaboradores (2005), foi possível classificar a positividade do microhematócrito.

Tabela 1. Classificação da positividade do microhematócrito de acordo com o número de parasitos.

Classificação	nº de parasitos
+	1-5
++	6-10
+++	11-30
++++	>30

Fonte: Os autores.

Para se considerar a reativação da Doença de Chagas foram utilizados os seguintes critérios: primeiro, parasitemia negativa e que se tornou patente durante e/ou após a imunossupressão; segundo, aumento na positividade do microhematócrito durante e/ou após a imunossupressão.

Na fase aguda e na fase crônica, antes do início da imunossupressão, foi coletado aproximadamente 500µl de sangue do plexo venoso retro-orbital, de três animais, que

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

foi colocado em tubos de microcentrífuga de 1,5mL contendo igual volume de guanidina-EDTA.

No período de imunossupressão, nos animais em que foi detectada a reativação através do exame direto (microhematócrito e/ou a fresco), isolou-se o parasito coletando-se 50-100µL de sangue, em tubos de 1,5mL contendo 500µL de guanidina-EDTA. Nessa fase, a coleta do sangue foi realizada pela cauda para evitar o aumento na taxa de mortalidade, decorrente de anemia e/ou infecções bacterianas no plexo orbital.

As amostras dos animais foram preservadas a 4°C e, antes do processo de extração, foram fervidas durante quinze minutos em banho-maria para linearização dos minicírculos concatenados na rede do kDNA do *T. cruzi* (BRITTO et al., 1993), permitindo assim uma distribuição homogênea das sequências alvo para a PCR presentes nessas amostras.

Para análise histopatológica foram coletados fragmentos do cérebro, coração, rim/adrenal, fígado, pâncreas, músculo, baço, testículo, bexiga, diafragma e junções esôfago-gástrico, gastroduodenal, ileocecal, ceco-cólico. Os fragmentos dos tecidos foram lavados com solução fisiológica e fixados em formol 3,7% por, no mínimo, 48 horas.

Foram coletados os tecidos de cinco animais na fase aguda (30- 45 dias) e dois na fase crônica (4-5 meses) da infecção, após eutanásia por asfixia em câmara de éter. Durante o período de imunossupressão o estado clínico dos animais foi monitorado no mínimo quatro vezes ao dia e os tecidos foram coletados após a morte natural de cada animal.

Os fragmentos de tecidos, fixados em formol a 3,7%, foram recortados, desidratados em álcool etílico em concentrações crescentes (90% e absoluto), diafanizados em xilol e emblocados em parafina. De cada tecido foram realizados dois cortes subseqüentes de 4µm, utilizando-se micrótomo de parafina.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Para identificação das formas amastigotas do *T. cruzi* e para avaliação dos processos inflamatórios foi realizada coloração com hematoxilina-eosina. Os processos inflamatórios foram classificados em ausentes (-), discretos (+), moderados (++) ou intensos (+++).

A extração do DNA do sangue foi realizada nas amostras previamente fervidas seguindo o protocolo proposto por Gomes e colaboradores (1998). Alíquotas de 300µl do sangue lisado foram desproteinizadas com 300µl de fenol-clorofórmio (v/v). Essa mistura foi homogeneizada lentamente por cinco minutos e centrifugada a 6708xg por cinco minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo de 1,5mL e ao sedimento foram adicionados 200µL de H₂O milli-Q estéril e novamente homogeneizado e centrifugado, e o sobrenadante adicionado àquele anteriormente obtido. Em seguida, foi adicionado a este sobrenadante clorofórmio (v/v), que foi homogeneizado e centrifugado como anteriormente descrito. A precipitação do DNA presente na fase aquosa foi realizada com 2 volumes de etanol absoluto, 40µg de glicogênio (20mg/mL) e 10% de acetato de sódio (3M pH 5,2) em banho de gelo durante 15 minutos. Após a centrifugação a 13147xg por 15 minutos, o sobrenadante foi descartado. Após volatilização, o DNA foi diluído em 30µL de tampão *Low TE* (10mM Tris-HCl e 0,1mM EDTA pH 8,0), e estocado a 4 °C até o momento do uso nas reações de PCR e LSSP-PCR. Foi utilizado um controle negativo para descartar possíveis contaminações tanto aqui como em todos os processos de extração de DNA.

As amostras de cultura utilizadas para a realização dos inóculos e preservadas em guanidina-EDTA foram homogeneizadas e uma alíquota de 200µL de cada amostra foi transferida para tubos de microcentrífuga de 1,5mL. A estas foram adicionados 150µL de H₂O milli-Q estéril e 350µL de uma mistura de fenol-clorofórmio (v/v), sendo o clorofórmio obtido de uma mistura com álcool isoamílico na proporção 24:1. A mistura foi homogeneizada por cinco minutos e centrifugada a 6708xg durante cinco minutos. O sobrenadante obtido foi transferido para outro tubo de 1,5 ml e a este adicionado igual volume de clorofórmio-álcool isoamílico 24:1, repetindo o processo de homogenização e centrifugação. Novamente, o sobrenadante foi transferido para

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

outro tubo de 1,5mL e adicionado 10% de acetato de sódio (3M pH 5,2) e o dobro do volume de etanol absoluto gelado. Esta mistura foi homogeneizada e deixada em banho de gelo durante 15 minutos, para a precipitação do DNA, e, em seguida centrifugada a 6708xg durante 15 minutos. O sobrenadante foi decantado e, após a completa volatilização do etanol, o DNA seco diluído em 100µL de tampão Low TE (10mM Tris-HCl e 0,1mM EDTA pH 8,0). O DNA foi estocado a 4°C até o momento do uso nas reações de PCR e LSSP-PCR.

Um fragmento de 330pb foi amplificado com os seguintes iniciadores, dirigidos para a região constante dos minicírculos do kDNA (WINCKER et al., 1994):

121 (5'-AAATAATGTACGGGGGAGATGCATGA-3');

122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAAATATA-3').

A PCR foi realizada num volume final de 20µL contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 3,5mM MgCl₂, 75mM KCl, 0,2mM de cada dNTP's (dATP, dCTP, dGTP e dTTP), 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase (Cenbiot, Ludwig Biotecnologia Ltda), 20pmol de cada iniciador (121 e 122), 2µL de DNA e 30µL de óleo mineral (GOMES et al., 1998). O programa de amplificação consistiu de uma desnaturação inicial a 95°C (5 minutos) e 35 ciclos com desnaturação a 95°C (1 minuto), anelamento a 65°C (1 minuto) e extensão a 72°C (1 minuto), seguida de extensão final de 10 minutos, em um termociclador MJ Research PTC-100.

O produto da PCR correspondente à amplificação específica da região variável do kDNA do *T. cruzi* foi purificado em gel de agarose 1,5% (1,0% agarose comum e 0,5% agarose *low melting*) em TBE 1X (89mM Tris-borato, 2mM EDTA pH 8,0) preparado com água bidestilada estéril, em presença de 0,5µg/mL de brometo de etídeo. As bandas de 330pb foram visualizadas em um transiluminador de luz ultravioleta de comprimento de onda longo, e removidas com auxílio de um bisturi estéril. Após aquecimento em banho-maria as amostras foram homogeneizadas e diluídas 1:10 com água milli-Q estéril, sendo, então, utilizadas como DNA molde para as reações de *Low stringency single specific primer (LSSP)*-PCR (VAGO et al., 1996; VAGO et al., 2000).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Como a reação de LSSP-PCR é realizada com um único iniciador específico, utilizado sob condições de baixa estringência, todos os experimentos devem ser executados de modo a evitar qualquer tipo de contaminação química e bacteriológica (PENA et al., 1994; BARRETO et al., 1996). Desta maneira, alguns cuidados foram observados: desinfecção da cuba de eletroforese com HCl 0,25N e NaOH 0,5N (30 minutos cada) e água bidestilada estéril; exposição de todo material utilizado (cuba de eletroforese, pipetas, ponteiras, etc.) à radiação ultravioleta (30 minutos); aplicação do DNA no gel de agarose com intervalo de uma canaleta vazia entre cada amostra.

A reação de LSSP-PCR foi realizada utilizando-se o iniciador S35G (5'-AAATAATGTACGGGGGAGATG-3'). A mistura da reação teve um volume final de 22µL contendo 10mM Tris-HCl (pH 8,5), 2,5mM MgCl₂, 0,2mM de cada dNTP's (dATP, dCTP, dGTP and dTTP), 1,0 unidade de *Taq* DNA polimerase, 45pmol do iniciador e 4µL de DNA (fragmento de 330pb purificado em agarose e diluído 1:10) cobertos com 30µL de óleo mineral. A amplificação foi realizada com 40 ciclos abrangendo desnaturação a 94°C (1min), anelamento a 30°C (1min) e extensão a 72°C (1min), precedidos de desnaturação inicial a 94°C (5min). Após os 40 ciclos foi realizada uma extensão adicional a 72°C durante 7 minutos. Os produtos de LSSP-PCR foram separados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 7,5%, corados pela prata, gerando um perfil composto por múltiplas bandas. A análise dos perfis obtidos reflete a seqüência de nucleotídeos do DNA usado como molde, compondo sua "assinatura gênica" (PENA et al., 1994).

A análise dos perfis de "assinaturas gênicas" das amostras de *T. cruzi*, obtidas pela reação de LSSP-PCR, foi realizada visualmente em foto digitalizada do gel, onde os padrões de bandas foram marcados, e submetidos à análise de proporção de bandas compartilhadas entre as cepas e a construção de fenogramas com o *software* GelComparII (Applied Maths NV).

As taxas de mortalidade, a porcentagem de reativação e o parasitismo tecidual foram avaliados pelo teste binomial (duas proporções). O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a influência da parasitemia durante a fase crônica na reativação e na

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

positividade do exame a fresco durante a imunossupressão. Os demais parâmetros foram analisados com o teste do qui-quadrado.

O nível de confiança utilizado para a realização de todas as análises foi de 95%, considerando-se significativos os valores de $p < 0,05$. As análises foram realizadas utilizando-se o software BioEstat 4.0 (AYRES et al., 2005).

No *software* GelComparII (Applied Maths NV) foi utilizado o método da média aritmética não ponderada - UPGMA (*Unweighted Pair-Group Method Analysis*) para construção dos fenogramas.

4 Resultados

O exame do microhematócrito e a hemocultura, foram utilizados para avaliar a infectividade dos isolados de *T. cruzi* para os animais nos quais o exame a fresco apresentou-se negativo. Ambos os isolados apresentaram 100% de infectividade, dos quais 68% evidenciada pelo microhematócrito, correspondendo a 72% e 64% dos casos para os isolados 1936 e 1956, respectivamente. O isolado 1931 não induziu mortalidade entre os animais até o início da imunossupressão, contudo, para o isolado 1956 a taxa de mortalidade foi de 30 % (Tabela 2).

Tabela 2. Porcentagem de infectividade, positividade do microhematócrito e mortalidade de camundongos infectados com os isolados de *T. cruzi*.

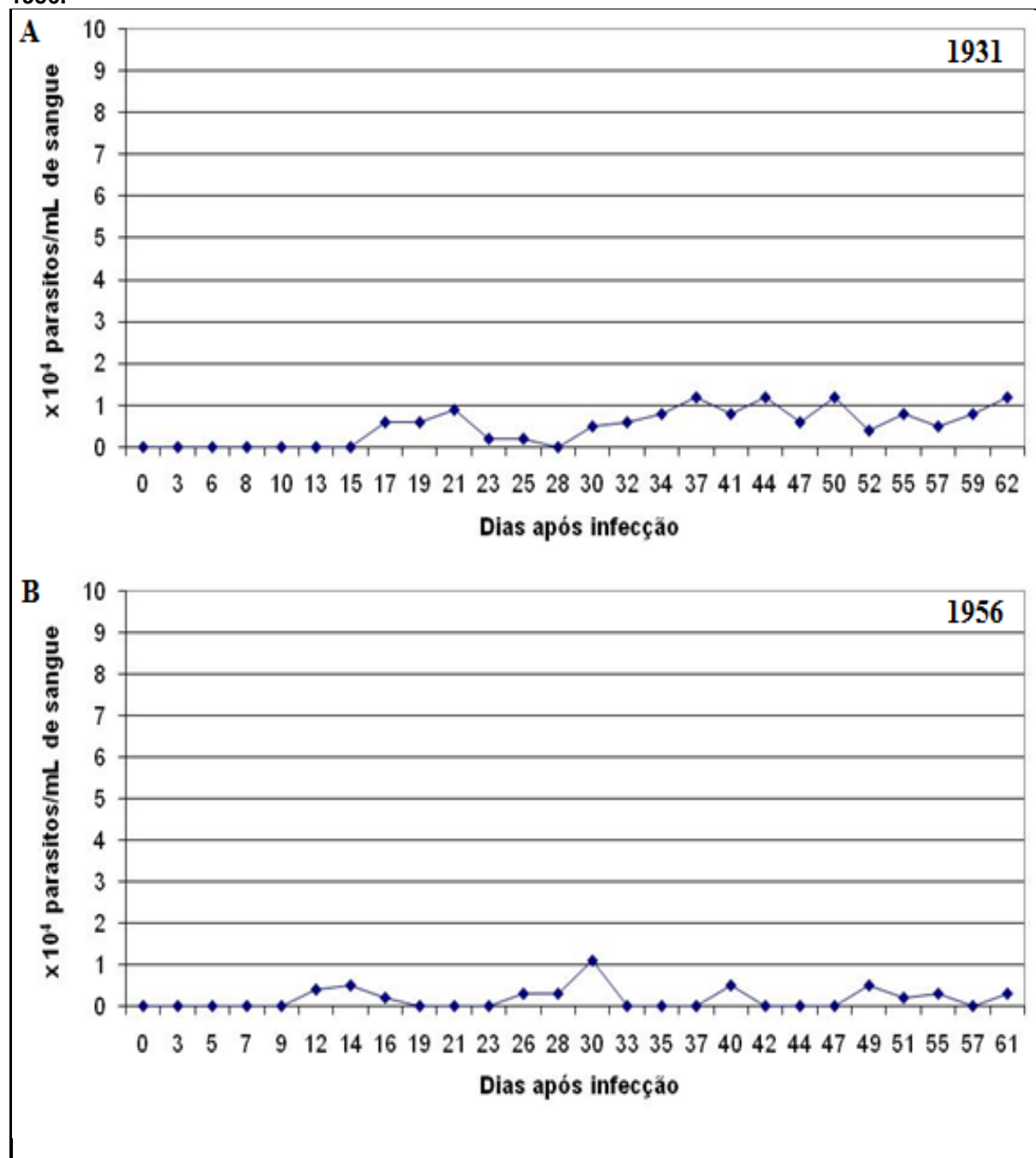
	1931	1956	Total
Infectividade	100	100	100
Microhematócrito	72	64	68
Mortalidade	0	30	15

Fonte: Os autores.

A Figura 3 apresenta as curvas de parasitemia, realizada com a média de parasitos encontrados em 10 camundongos inoculados com os isolados 1931 (Figura 3A) e 1956 (Figura 3B). O período pré-patente (PPP) foi de 9 e 15 dias para os animais infectados com os isolados 1931 e 1956, respectivamente, apresentando uma média de $12 \pm 4,2$ dias.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Figura 3. Curvas de parasitemia dos isolados de *T. cruzi*, sendo (A) isolado 1931 e (B) isolado 1956.



Fonte: Os autores.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

O período patente (PP) não pode ser determinado para os isolados de *T. cruzi* estudados já que estes apresentaram uma parasitemia constante, porém muito baixa, quase subpatente, durante todo o período de acompanhamento (Tabela 3). As curvas de parasitemia dos animais infectados de ambos os isolados foram semelhantes, onde a cepa 1931 apresentou pico máximo de $1,1 \times 10^4$ parasitos/mL de sangue no 30º dia de infecção e a cepa 1956 teve pico máximo de $1,2 \times 10^4$ parasitos/mL de sangue no 37º dia de infecção (Tabela 3).

Tabela 3. Avaliação da parasitemia na fase aguda experimental, de acordo com a origem dos isolados de *T. cruzi*, sendo (IND) parasitemia constante durante todo o período de avaliação; (Máx. parasitemia) máximo de parasitemia; (ND) parasitemia baixa e constante por mais de 40 dias sem pico bem definido; (PP) período patente; (PPP) período pré-patente.

Cepa	PPP (dias)	PP (dias)	nº. picos	Máx. parasitemia (parasitos/mL)	Máx. parasitemia (dia)
1931	9	IND	ND	$1,1 \times 10^4$	30
1956	15	IND	ND	$1,2 \times 10^4$	37
Total	$12 \pm 4,2$	IND	ND	$1,15 \times 10^4$	$33,5 \pm 4,9$

Fonte: Os autores.

Considerando que os isolados foram selecionados sem prévio conhecimento de seu comportamento em modelos experimentais, verificamos que ambos apresentaram comportamento semelhante, não evidenciando nenhum padrão que pudesse ser associado a uma maior virulência das populações do *T. cruzi* isoladas de pacientes com a forma digestiva da Doença de Chagas.

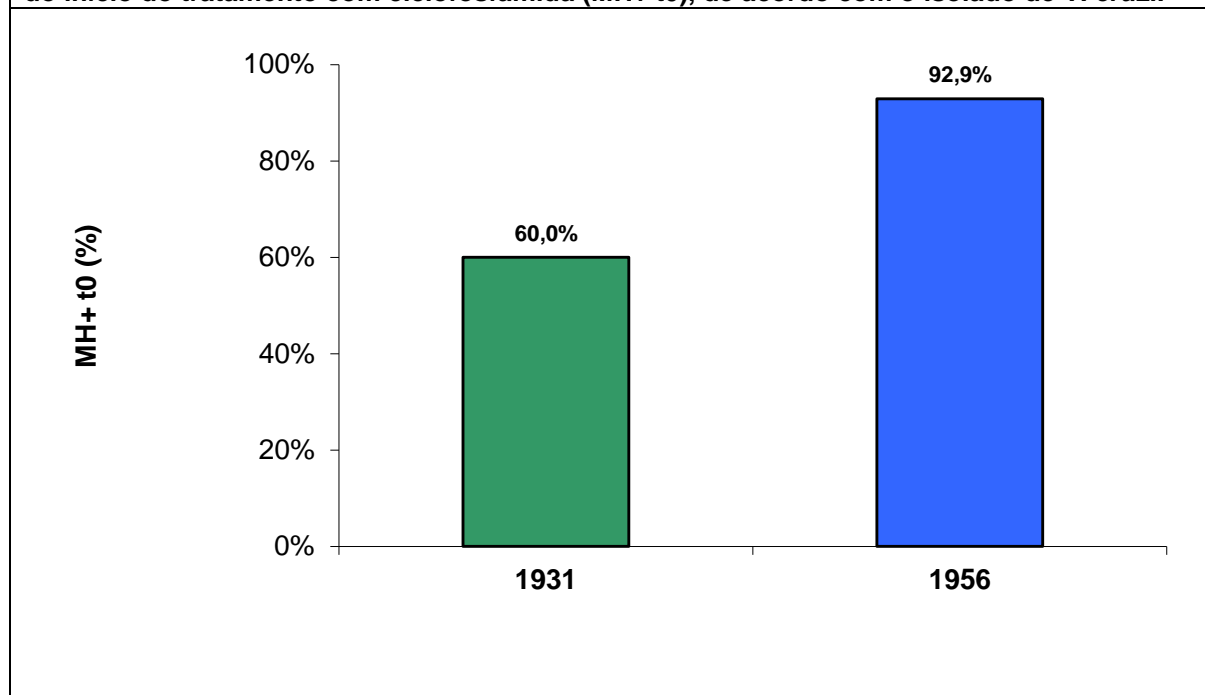
Para se detectar a parasitemia na fase crônica, antes e durante a imunossupressão, e assim caracterizar a reativação da Doença de Chagas, foi utilizada a técnica do microhematócrito e a classificação de acordo com a Tabela 1.

A parasitemia detectada na fase crônica, antes do início do tratamento com ciclofosfamida, foi maior entre os animais infectados com o isolado 1956, com 92,9% (10/11) dos camundongos com microhematócrito positivo, porém sem diferença

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

estatística significativa em relação ao isolado 1931, que apresentou 60% (9/15) dos camundongos com microhematócrito positivo (Figura 4).

Figura 4. Porcentagem de camundongos que apresentaram microhematócrito positivo antes do início do tratamento com ciclofosfamida (MH+ t0), de acordo com o isolado de *T. cruzi*.



Fonte: Os autores.

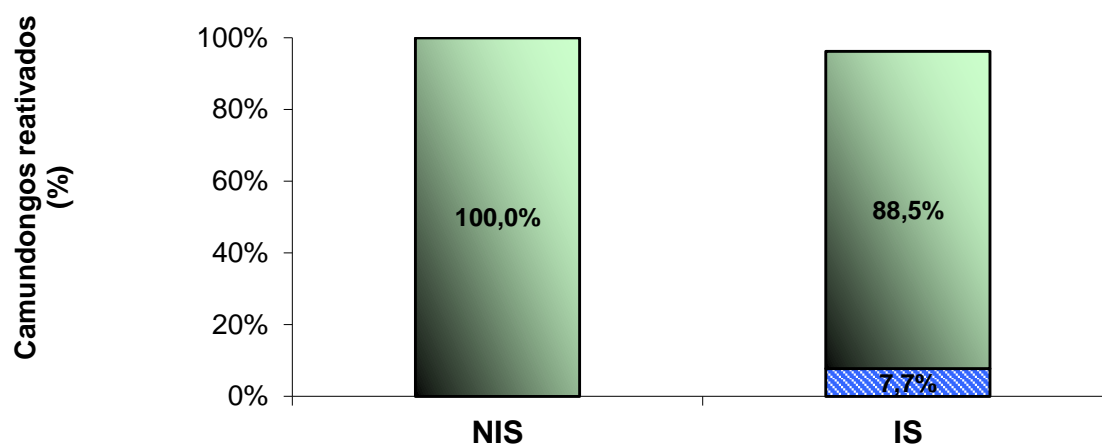
Para se avaliar o efeito da imunossupressão, após o início do tratamento com a ciclofosfamida os parâmetros foram avaliados conjuntamente para os dois isolados, de modo que a comparação entre os animais imunossuprimidos ou não fosse possível.

A reativação da Doença de Chagas foi detectada pela positividade ou aumento da positividade no microhematócrito em 91,2% (31/34) dos animais infectados com os isolados do *T. cruzi*. Essa taxa de reativação foi de 88,5% (23/26) entre os animais imunossuprimidos com a ciclofosfamida e de 100% (8/8) entre os animais não imunossuprimidos, sem diferença significativa entre ambos (Figura 5).

O processo de reativação foi confirmado pelo exame a fresco em 7,7% (2/26) dos animais imunossuprimidos. Entre os animais não imunossuprimidos não houve positividade de exame a fresco.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Figura 5. Porcentagem de camundongos cronicamente infectados com os isolados do *T. cruzi* que apresentaram reativação da parasitemia. A parte hachurada da coluna indica a porcentagem de animais cuja reativação foi confirmada pelo exame a fresco. IS – camundongos imunossuprimidos com ciclofosfamida; NIS – camundongos não imunossuprimidos.



Fonte: Os autores.

Entre os animais imunossuprimidos que apresentaram reativação da parasitemia, 26,1% (6/23) não apresentaram parasitemia detectável pelo microhematócrito na fase crônica antes do início do tratamento com ciclofosfamida. Já entre os animais imunossuprimidos que apresentaram microhematócrito positivo, 66,7% (2/3) não reativaram (Tabela 4, Figura 6).

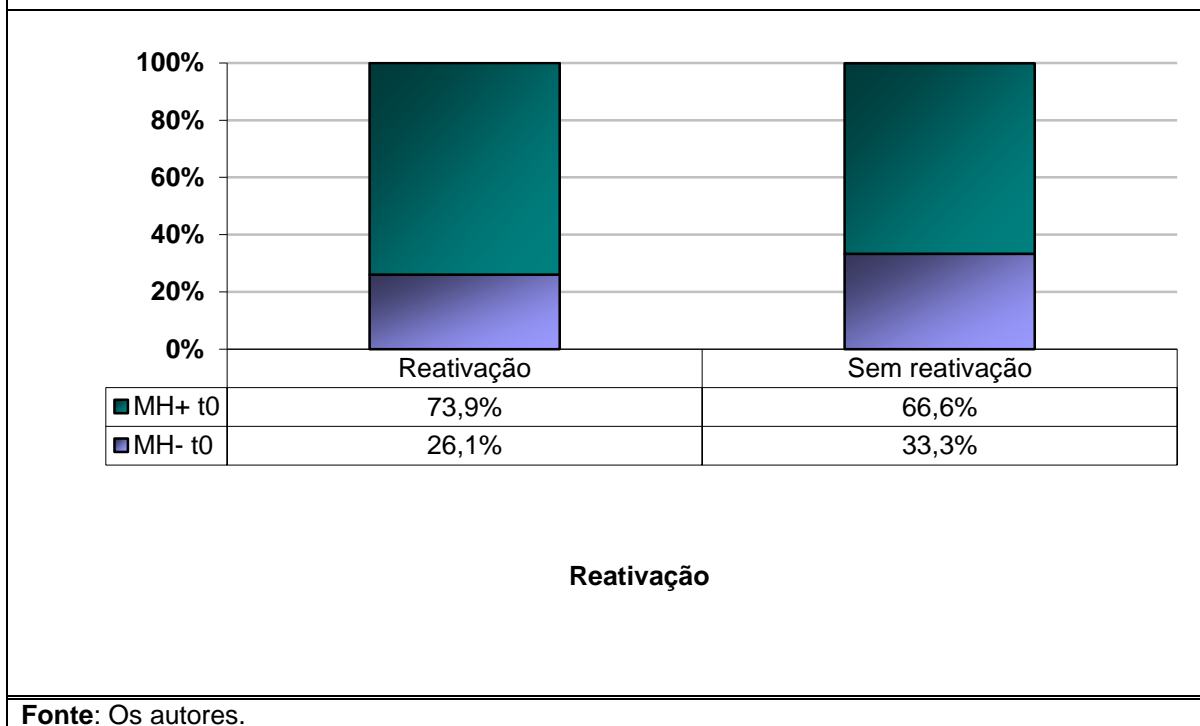
Tabela 4 - Comparação da influência da parasitemia na fase crônica no processo de reativação nos animais tratados com ciclofosfamida; MH- t0: microhematócrito negativo na fase crônica; MH+ t0: microhematócrito positivo na fase crônica; $p>0,05$

	Reativação	Sem reativação	Total
MH- t0	6	1	7
MH+ t0	17	2	19
Total	23	3	26

Fonte: Os autores.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Figura 6. Influência da parasitemia na fase crônica no processo de reativação durante o tratamento com ciclofosfamida, entre os animais do Grupo HIV+ R. MH- t0: microhematócrito negativo na fase crônica; MH+ t0: microhematócrito positivo na fase crônica; $p>0,05$.



Com relação aos animais não imunossuprimidos todos apresentaram reativação, sendo que 75% (6/8) dos animais apresentaram parasitemia detectável pelo microhematócrito antes do início da imunossupressão. A análise destes dados mostrou que a ocorrência da reativação nos camundongos foi independente da parasitemia na fase crônica ($p>0,05$, teste exato de Fisher).

A análise da reativação mostrou que este processo ocorreu independentemente do tratamento imunossupressor. Porém, pode-se afirmar que este processo ocorreu de forma mais intensa no grupo tratado com a ciclofosfamida, onde 7,7% dos animais apresentaram positividade do exame a fresco.

Os resultados do índice de reativação de acordo com os ciclos de imunossupressão (doses de ciclofosfamida) para cada grupo estão apresentados na Tabela 5. Pela análise desta tabela, verificamos que os animais imunossuprimidos foram mais

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

sensíveis à reativação, com 95,7% (22/23) de reativação após o segundo ciclo, quando comparado ao grupo não imunossuprimido ($p < 0,05$).

Tabela 5. Porcentagem de camundongos que apresentaram reativação da parasitemia de acordo com o ciclo de imunossupressão; $p < 0,05$ entre os grupos, quando avaliados o 1º e 2º ciclos em conjunto.

Ciclo de imunossupressão	Imunossuprimidos %	Não imunossuprimidos %
1º	69,6 (16/23)	75 (6/8)
2º	26,1 (6/23)	0 (0/8)
3º	4,3 (1/23)	25 (2/8)
Total	100,0 (23/23)	100 (8/8)

Fonte: Os autores.

Os dados apresentados na Tabela 6 são referentes à taxa de mortalidade dos camundongos durante o período de imunossupressão, de acordo com o ciclo. Podemos observar que entre os animais não imunossuprimidos a taxa de mortalidade durante esse período foi de 37,5% (3/8) contra 100% (26/26) para o grupo imunossuprimido, sendo esta diferença estatisticamente significativa.

Tabela 6. Mortalidade dos camundongos cronicamente infectados com as cepas do *T. cruzi*, de acordo com o ciclo de imunossupressão, em porcentagem e proporção.

Ciclo de imunossupressão	Imunossuprimidos		Não imunossuprimidos	
	%	\hat{p}	%	\hat{p}
1º	61,5	16/26	12,5	1/8
2º	15,4	4/26	25,0	2/8
3º	3,9	1/26	0,0	0/8
4º	19,2	5/26	0,0	0/8
Total	100,0	26/26	37,5	3/8

Fonte: Os autores.

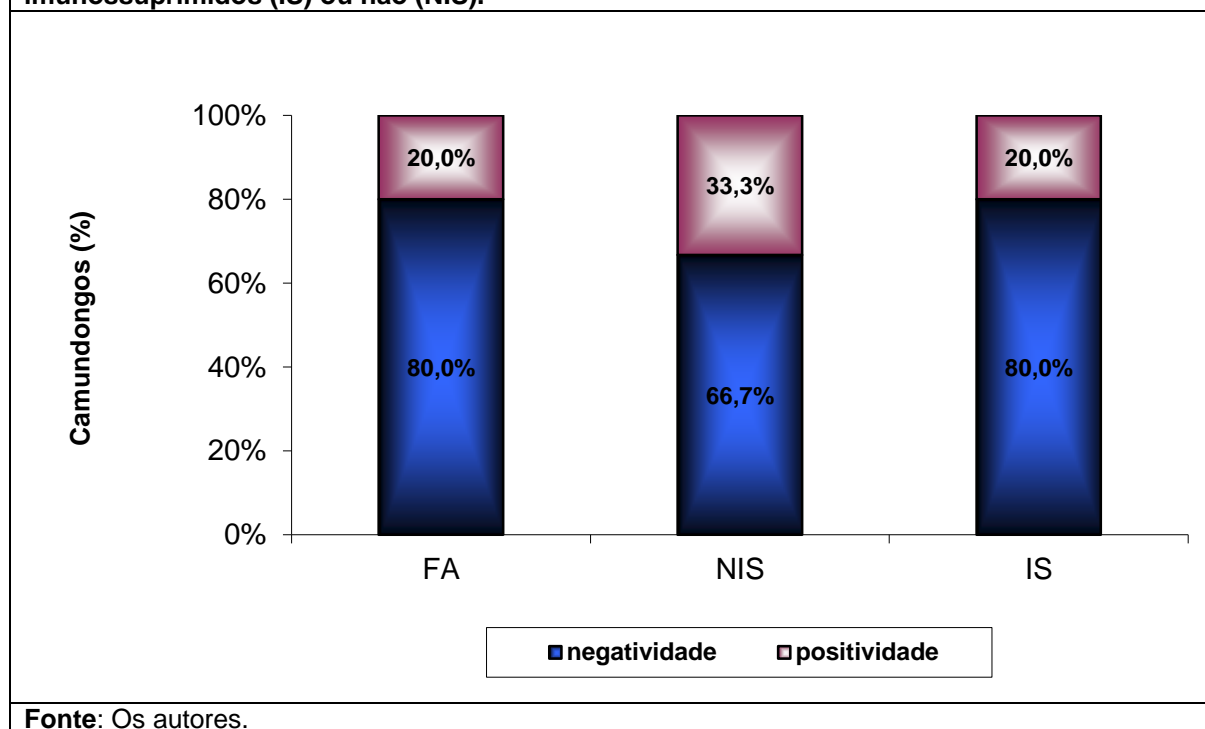
Para a avaliação do parasitismo tecidual foram analisados cortes histológicos, corados pela hematoxilina-eosina, de todos os órgãos coletados tanto na fase aguda (média de 33 dias de infecção) quanto crônica (média de 140 dias de infecção) e também durante o período de imunossupressão na fase crônica.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Na fase aguda da infecção, dos 10 camundongos infectados com os isolados de *T. cruzi*, e sacrificados para coleta dos órgãos, apenas 2 (20%) apresentaram ninhos parasitários teciduais, sendo um animal infectado com o isolado 1931 e outro com o 1956 (Figura 5).

A análise das lâminas dos animais não imunossuprimidos sacrificados na fase crônica da infecção mostrou que 33,3% (2/6) dos animais apresentaram ninhos de amastigotas teciduais. Entre os animais imunossuprimidos este número foi de 20% (2/10), de acordo com a Figura 7.

Figura 7. Distribuição dos camundongos infectados com os isolados do *T. cruzi*, quanto ao parasitismo tecidual durante a fase aguda (FA) e a fase crônica entre os animais imunossuprimidos (IS) ou não (NIS).



Não houve diferença significativa do parasitismo tecidual observado nas diferentes fases do estudo. A Tabela 7 mostra que o coração e a bexiga foram os tecidos encontrados parasitados na fase aguda.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Tabela 7 - Tropismo tecidual das cepas do *T. cruzi* nas diferentes fases do estudo.

	Tecido	Animais
		% (\hat{p})
Fase aguda	Coração	10 (1/10)
	Bexiga	10 (1/10)
Não imunossuprimidos	Coração	20 (2/10)
	Junção esôfago-gástrica	10 (1/10)
Imunossuprimidos	Músculo esquelético	20 (2/10)

Fonte: Os autores.

Entre os animais não imunossuprimidos foi observada a infecção do tecido cardíaco e da junção esôfago-gástrica. O músculo esquelético foi o único tecido parasitado entre os animais imunossuprimidos (Figura 8).

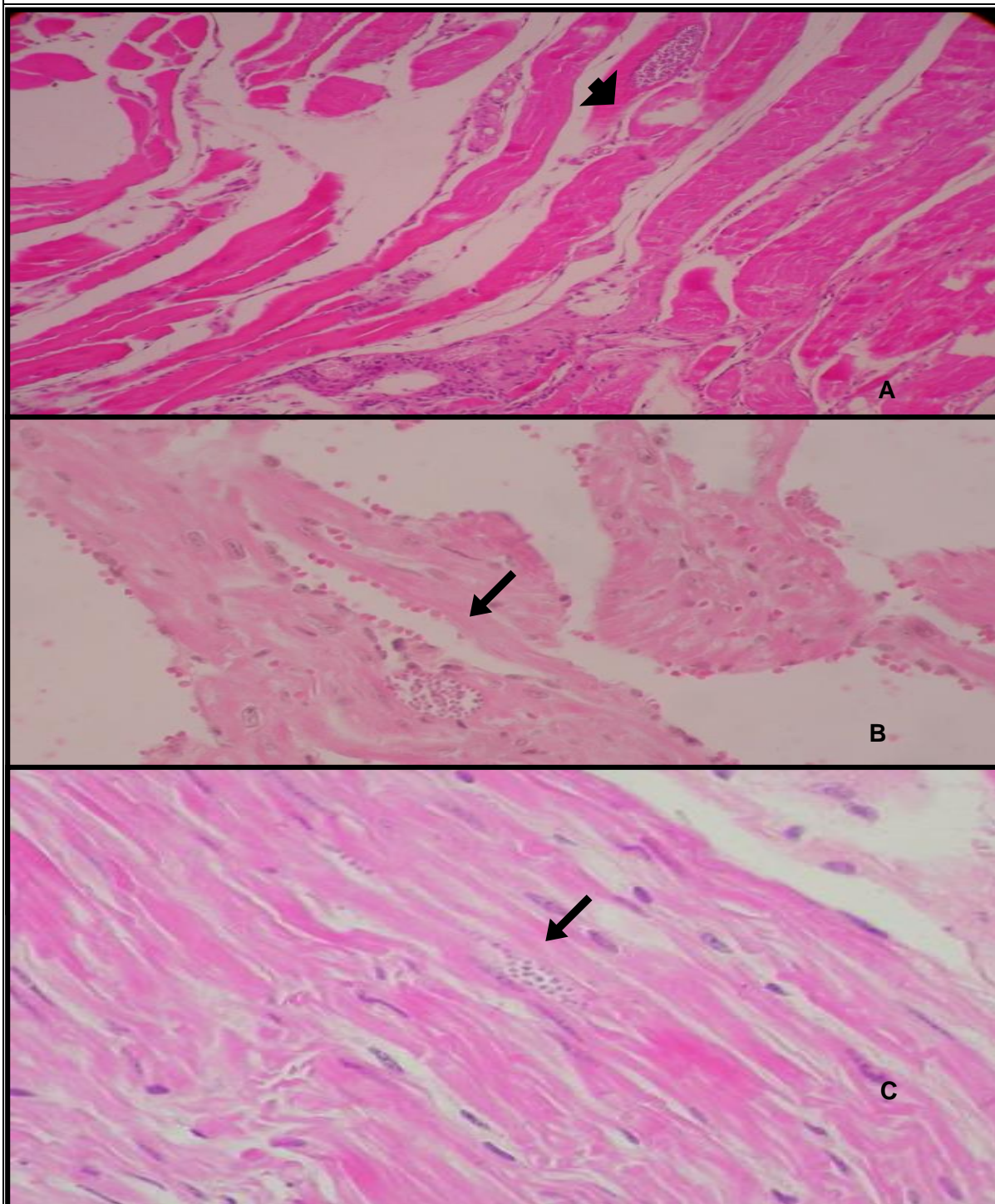
Neste estudo a análise dos processos inflamatórios nos órgãos coletados foi realizada pela técnica de hematoxilina-eosina. A Figura 9 ilustra os processos inflamatórios encontrados no músculo esquelético e nos tecidos cardíaco e encefálico.

A presença de infiltrados inflamatórios intralobulares e periportais discretos no fígado foi detectada em 50% (5/10) dos animais infectados com os isolados obtidos de pacientes com a forma digestiva da Doença de Chagas. O baço de 60% (6/10) dos animais inoculados com os isolados de *T. cruzi* apresentou hiperplasia da polpa branca durante esta fase. Nenhum processo inflamatório foi observado no tecido encefálico dos animais infectados com ambos os isolados.

A Figura 10 apresenta a distribuição dos camundongos quanto à intensidade dos processos inflamatórios no músculo esquelético, no músculo cardíaco e nas junções do sistema digestivo.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potential for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](http://www.liphscience.com) LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

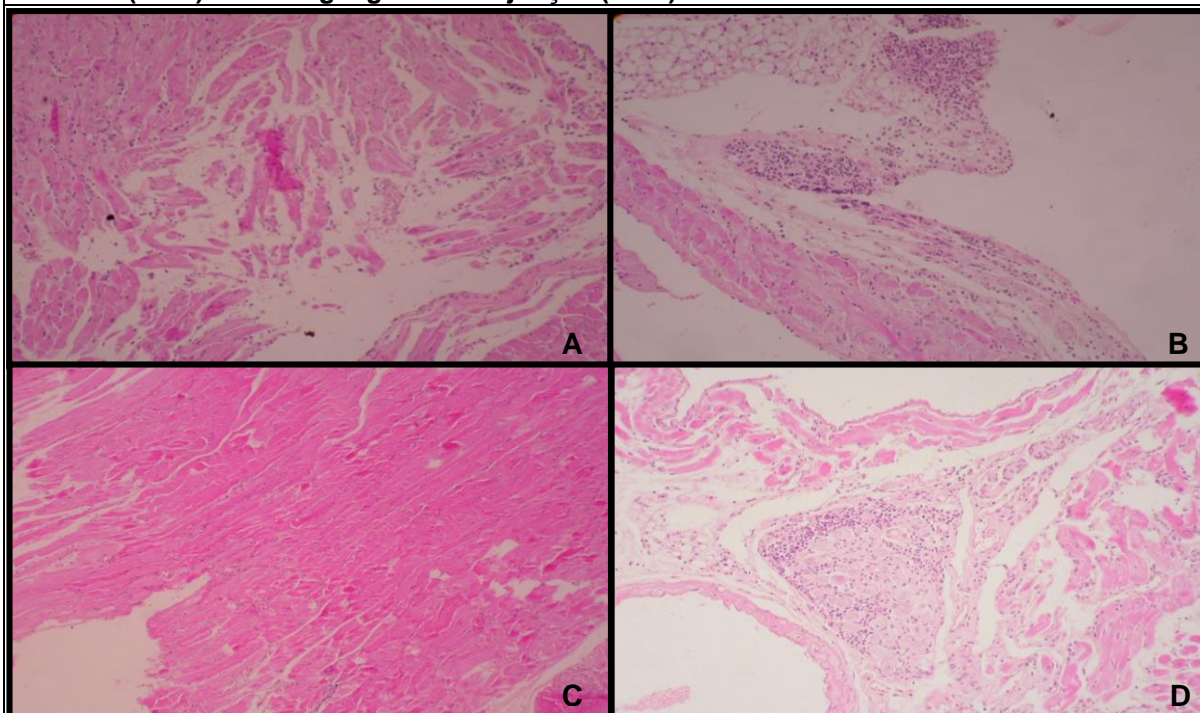
Figura 8. Fotomicrografias de cortes histológicos apresentando ninhos de parasitos, sendo (A) músculo esquelético, (B) miocárdio, (C) junção esôfago-gástrica. Hematoxilina-eosina, 400x.



Fonte: Os autores.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potential for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Figura 9. Fotomicrografias de corte histológicos mostrando processos inflamatórios na fase crônica da infecção. A - Miocardite discreta (200x). B - Miocardite moderada (200x). C - Miosite discreta (100x). D - Periganglionite na junção (200x). Hematoxilina-eosina.



Fonte: Os autores.

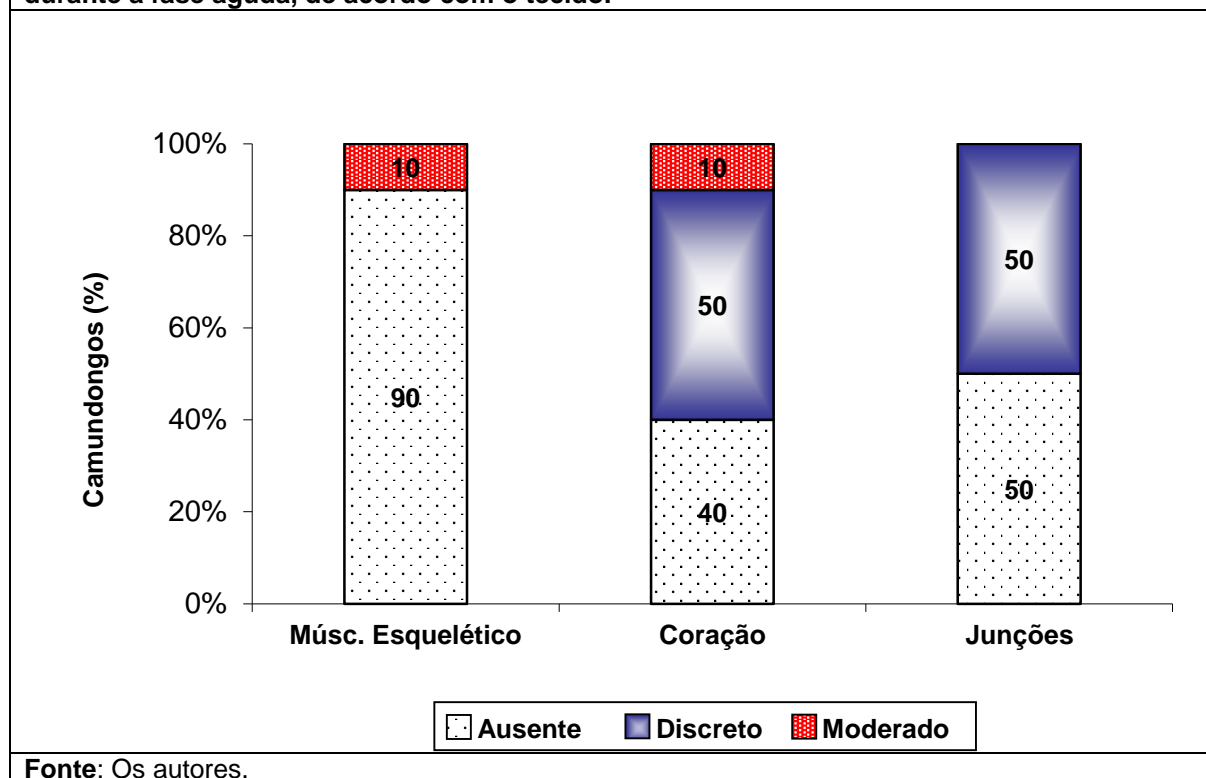
A periganglionite foi o processo predominante observado nas junções esôfago-gástrica e gastroduodenal.

Na fase crônica, o fígado dos animais não imunossuprimidos apresentou infiltrados inflamatórios intralobulares e periportais em 50% (3/6) dos animais. Dos animais necropsiados durante a imunossupressão, 40% (4/10) apresentou processo inflamatório intralobular moderado do parênquima hepático.

Entre os animais que não receberam tratamento com ciclofosfamida, o baço de 50% (3/6) dos animais apresentou hipoplasia da polpa vermelha nesta fase. Já entre os animais tratados com ciclofosfamida o processo reativo encontrado no baço foi bastante variável: 40% (4/10) dos animais apresentaram hiperplasia da polpa vermelha; 10% (1/10), hiperplasia da polpa branca; 10% (1/10), hipoplasia da polpa branca; e 10% (1/10), hipoplasia de ambas as polpas.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potential for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Eurípedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Figura 9. Distribuição dos camundongos quanto à intensidade dos processos inflamatórios durante a fase aguda, de acordo com o tecido.

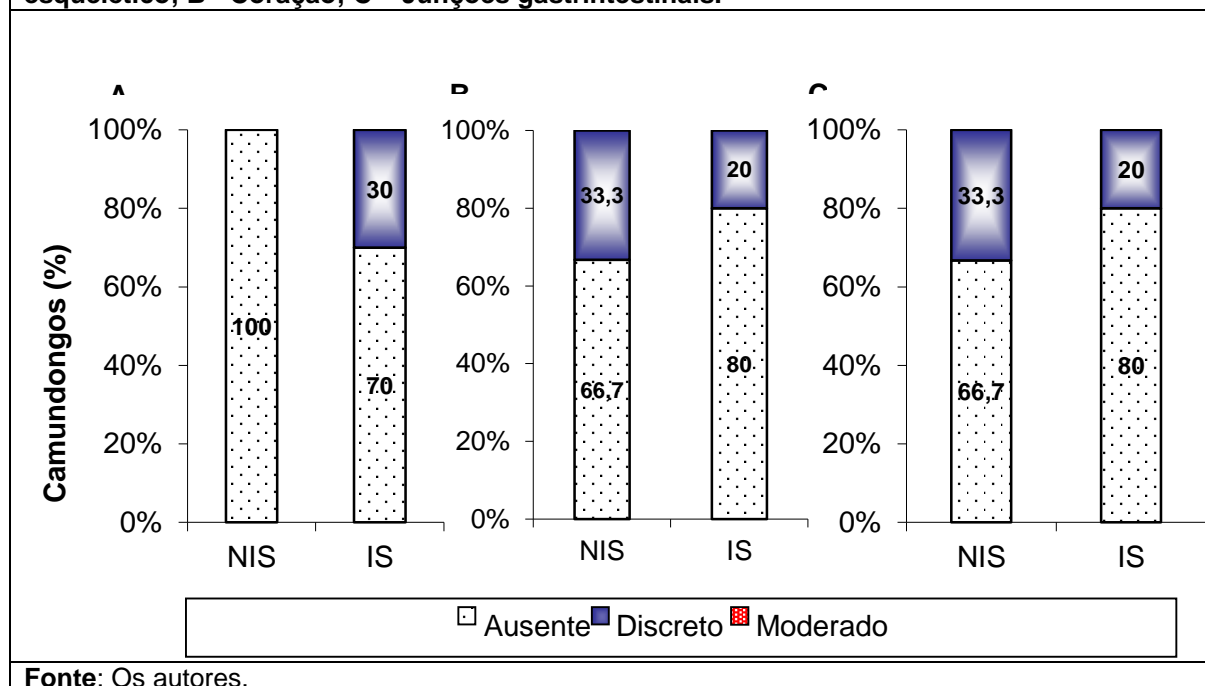


Nesta fase do estudo também não foi observada a inflamação do tecido encefálico em nenhum dos animais avaliados. Não foi observada a presença de processo inflamatório do músculo esquelético dos animais não imunossuprimidos. Já entre os animais tratados com a ciclofosfamida, 30% (3/10) eles apresentaram uma miosite discreta (Figura 10A). Com relação ao tecido cardíaco, foi observado um maior número de animais apresentando processos inflamatórios neste tecido entre aqueles imunossuprimidos (Figura 10B). Analisando-se as junções gastrintestinais encontramos inflamação em 20% (2/10) e 33,3% (2/6) dos animais imunossuprimidos e não imunossuprimidos, respectivamente (Figura 10C). Assim como na fase aguda, o processo observado nestes tecidos foi a periganglionite das junções esôfago-gástrica e gastroduodenal.

A análise da Figura 10 revela que a administração de ciclofosfamida não reduziu a quantidade e a intensidade do processo inflamatório tecidual.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potential for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Figura 10. Distribuição dos camundongos quanto à intensidade dos processos inflamatórios entre os animais não imunossuprimidos (NIS) e imunossuprimidos (IS). A - Músculo esquelético; B - Coração; C - Junções gastrintestinais.



Os polimorfismos da região hipervariável dos minicírculos do kDNA das populações do *T. cruzi* presentes no sangue dos pacientes, no inóculo e no sangue dos camundongos infectados, durante as fases aguda e crônica da infecção e durante o período de imunossupressão, foram caracterizadas geneticamente pela reação de LSSP-PCR.

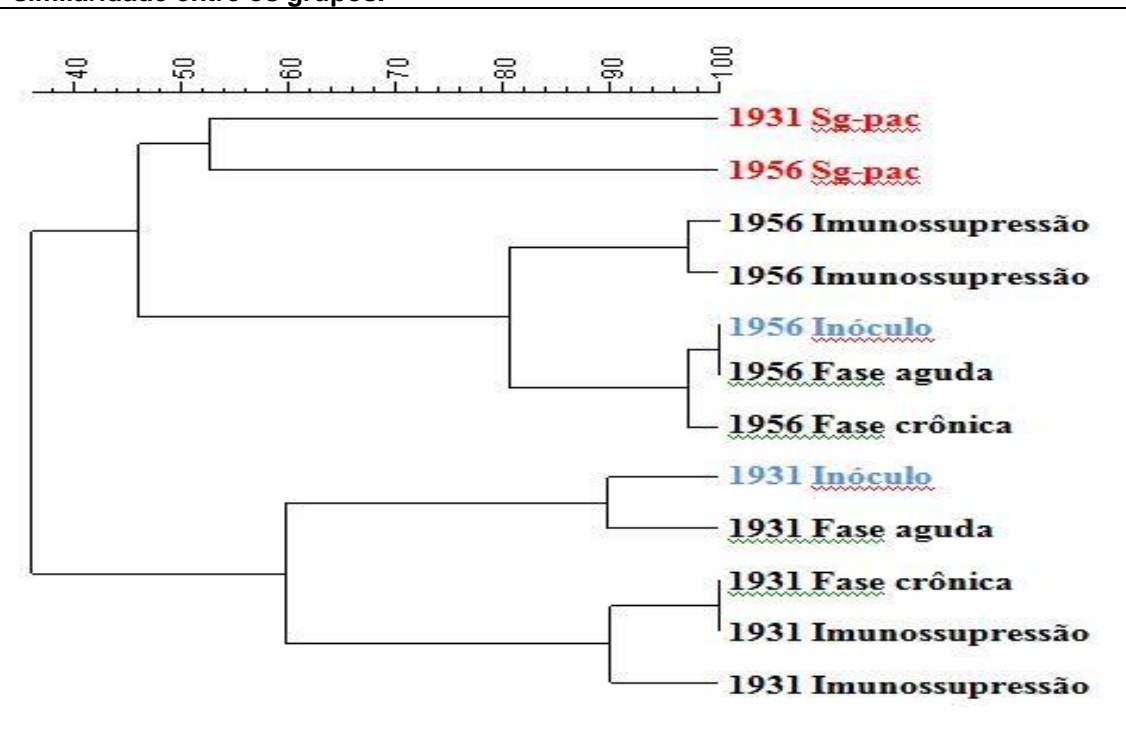
A caracterização genética dos dois isolados do *T. cruzi* utilizados neste estudo mostrou que estes são diferentes entre si, com um compartilhamento de bandas de 52,6%, porém eles estão localizados no mesmo braço do fenograma (Figura 11).

As duas amostras de *T. cruzi* utilizadas apresentaram elevada heterogeneidade entre os perfis genéticos presentes no sangue do paciente no momento do isolamento e aqueles presentes no inóculo. Houve um compartilhamento de

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

bandas entre o sangue do paciente e o inóculo de apenas 62,8% e 41,2% para os isolados 1931 e 1956, respectivamente. Para cada isolado o fenograma mostra o posicionamento das amostras do sangue e do inóculo em braços distintos (Figura 11).

Figura 11. Fenograma correspondente aos perfis de LSSP-PCR dos isolados de *T. cruzi* do sangue do paciente (Sg-pac) e do cultivo celular utilizado para inóculo (IN-TCC) de todas as cepas utilizadas no estudo. Os números correspondem à porcentagem de similaridade entre os grupos.



Fonte: Os autores.

Essa diferença pode ser explicada por uma possível seleção de populações do *T. cruzi* em cultura, já que o valor considerado como *borderline* para se considerar ou não uma seleção de populações do parasito é de 80% de similaridade. Este resultado sugere uma policlonalidade das populações do parasito destes isolados.

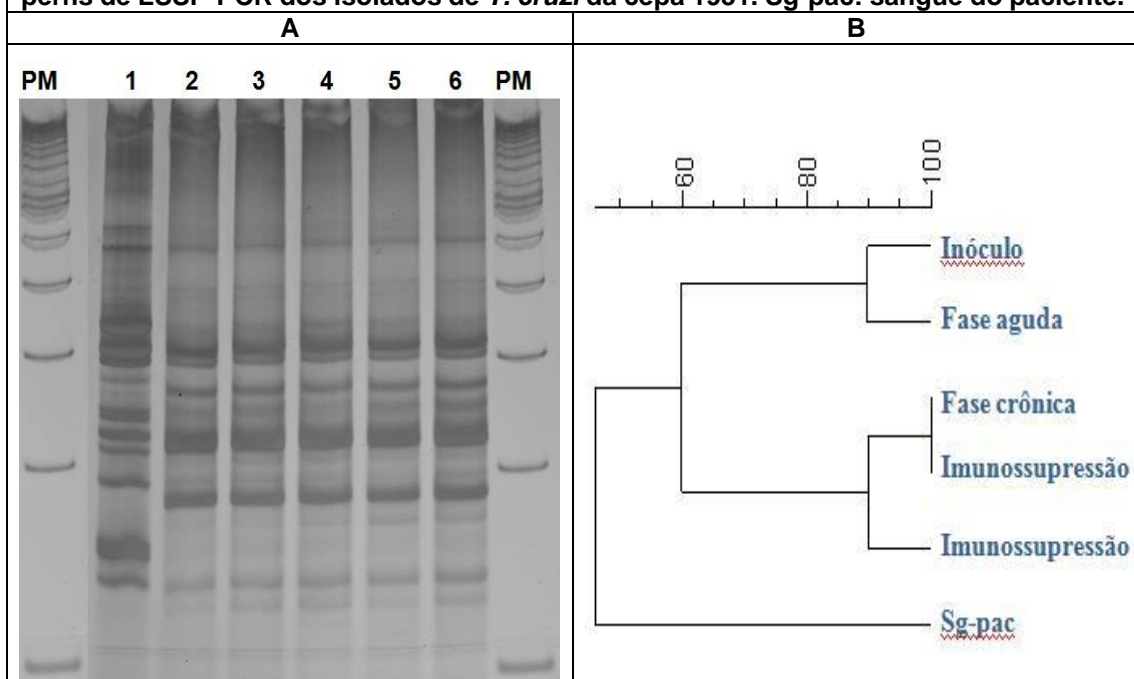
A Figura 12A representa os perfis genéticos do *T. cruzi* no sangue do paciente (canaleta 1), no cultivo celular usado para o inóculo (canaleta 2), no sangue dos

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

camundongos na fase aguda (canaletas 3) e na fase crônica dos animais não imunossuprimidos (canaleta 4) e imunossuprimidos (canaletas 5 e 6).

Observando-se o fenograma correspondente aos perfis de LSSP-PCR das amostras (Figura 12B; Anexo - Tabela A-2), verificamos que aqueles obtidos do sangue do paciente (Sg-pac) e dos tripomastigotas de cultivo celular utilizados para o inóculo (IN-TCC) apresentaram 62,8%% de similaridade, ou seja, houve seleção de populações do parasito em cultura.

Figura 12. A - Gel de poliacrilamida mostrando os perfis de LSSP-PCR dos isolados de *T. cruzi* da cepa 1931. PM - marcador molecular. 1 - Sangue do paciente. 2 - Cultivo celular utilizado para inóculo. 3 - Sangue de camundongos na fase aguda. 4 - Sangue de camundongos não imunossuprimidos na fase crônica. 5 e 6 - Sangue de camundongo imunossuprimidos na fase crônica. B - Fenograma correspondente aos perfis de LSSP-PCR dos isolados de *T. cruzi* da cepa 1931. Sg-pac: sangue do paciente.



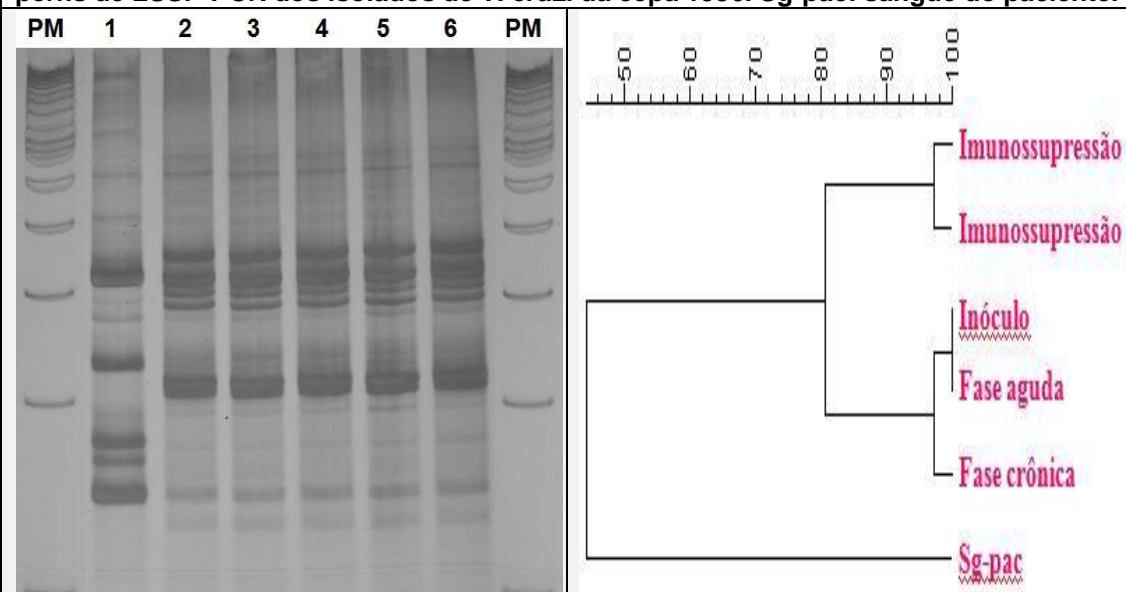
Fonte: Os autores.

As populações do *T. cruzi* isoladas na fase aguda apresentaram 89,7% de identidade com o inóculo. Um quadro semelhante foi observado para os animais não imunossuprimidos, onde a similaridade com o inóculo foi de 82,8%. Entre os animais imunossuprimidos a média de bandas compartilhadas com o inóculo foi

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

de 34,5%, sugerindo uma seleção de populações após o tratamento com a ciclofosfamida (Figura 12B; Anexo - Tabela A-2).

Figura 13. A - Gel de poliacrilamida mostrando os perfis de LSSP-PCR dos isolados de *T. cruzi* da cepa 1956. PM - marcador molecular. 1 - Sangue do paciente. 2 - Cultivo celular utilizado para inóculo. 3 - Sangue de camundongos na fase aguda. 4 - Sangue de camundongos não imunossuprimidos na fase crônica. 5 e 6 - Sangue de camundongo imunossuprimidos na fase crônica. B - Fenograma correspondente aos perfis de LSSP-PCR dos isolados de *T. cruzi* da cepa 1956. Sg-pac: sangue do paciente.



Fonte: Os autores.

As assinaturas gênicas obtidas do kDNA do *T. cruzi* do sangue do paciente (canaleta 1), do cultivo celular usado para o inóculo (canaleta 2), do sangue dos camundongos na fase aguda (canaletas 3) e na fase crônica dos animais não imunossuprimidos (canaleta 4) e imunossuprimidos (canaletas 5 e 6) são apresentados na Figura 13A.

Comparando-se os perfis de assinatura gênica obtidos do sangue do paciente e do inóculo, observamos somente 41,2% de analogia entre eles (Figura 13B; Anexo - Tabela A-3). A partir deste dado podemos concluir que a cultura selecionou populações do *T. cruzi*, assim como observado para o isolado 1931. As populações do *T. cruzi* circulantes na fase aguda apresentaram uma homologia total com o inóculo (100% de similaridade) (Figura 13B).

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Na fase crônica, para os animais não imunossuprimidos, observamos uma similaridade de 97,1% com o inóculo. Para os animais imunossuprimidos a média 82,3% de bandas compartilhadas com o inóculo (Figura 13B; Anexo - Tabela A-2).

O perfil genético do kDNA após imunossupressão na fase crônica demonstrou não que houve seleção de populações do *T. cruzi*.

5 Discussão

Apesar da resposta imune desenvolvida pelo hospedeiro na Doença de Chagas crônica, o parasito sobrevive em níveis subpatentes e pode ser recuperado do sangue circulante por meio de métodos parasitológicos indiretos, como a hemocultura e o xenodiagnóstico. É bem conhecido o fato de que a imunossupressão pode levar à reativação da infecção nesta fase, tanto em animais como no homem, como consequência de um desequilíbrio imunológico do hospedeiro induzido por ação de drogas imunossupressoras ou por infecções associadas (PRATA, 1990). Os fatores envolvidos neste processo não estão bem esclarecidos e podem estar relacionados à depleção seletiva da resposta imune do hospedeiro, assim como com as características intrínsecas do parasito.

Já foi demonstrado que pacientes portadores de megaesôfago, uma das manifestações da forma digestiva da doença, apresentam uma depleção do número de linfócitos T CD4 no sangue circulante (LEMOS et al., 1998), sugerindo que esta forma clínica também poderia estar relacionada com a depressão da resposta imune. Além disso, outros estudos mostram a importância dos linfócitos T CD4 no controle da Doença de Chagas, possivelmente por meio de sua função auxiliar na produção de anticorpos específicos (RUSSO et al., 1988; KIERSZENBAUM, 1995).

Desse modo, merece destaque a caracterização biológica e genética e a avaliação do potencial para reativação de amostras do *T. cruzi* isoladas de pacientes portadores da forma digestiva da Doença de Chagas. Com isso, novas

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

pesquisas poderão ser desenvolvidas, inclusive no campo da genômica, ampliando-se o conhecimento destas cepas com relação à patogenicidade, permitindo um melhor prognóstico aos pacientes chagásicos que apresentarem quadros de imunodepressão.

Em todo estudo experimental busca-se pré-requisitos que reproduzam a infecção humana. Porém, durante o processo de isolamento do *T. cruzi* alguns clones podem ser selecionados, dificultando a correlação entre as cepas e as características clínicas da doença humana (DEANE et al., 1984; MACEDO; PENA, 1998). Levando-se em conta que essas populações sofrem forte pressão seletiva pelos processos de hemocultura, criopreservação e cultivo em meio LIT, e com menor intensidade pelo cultivo celular em macrófagos, uma vez que estes não exigem penetração ativa por parte do parasito (BURLEIGH; ANDREWS, 1995), a comparação dos perfis genéticos das populações do parasito presentes no sangue do paciente e no inóculo dos animais é de extrema importância para avaliar se as populações do *T. cruzi* que serão utilizadas realmente representam aquelas presentes no paciente. Sobretudo se consideramos que as cepas utilizadas neste trabalho foram isoladas dos pacientes na fase crônica da Doença de Chagas por meio da hemocultura, e que esse reisolamento pode variar de acordo com o clone e suas associações (LANA et al., 2000).

Neste estudo, a seleção de populações após a passagem por cultivos em meio LIT e celular foi detectada pela caracterização genética do kDNA por meio da técnica de LSSP-PCR para os dois isolados avaliados. Estes apresentaram apenas 52%, em média, de bandas compartilhadas entre o sangue do paciente e o inóculo, porém, não foi possível definir qual foi o fator determinante dessa seleção. Este dado concorda com a afirmação de que a manutenção do *T. cruzi* *in vitro* pode promover a perda de alguns clones incapazes de adaptação nesse ambiente (DEANE et al., 1984; OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999), e sugere a policlonalidade destes isolados, fato evidenciado na literatura entre os isolados de fase aguda e crônica da infecção humana e de animais, como

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

também em vetores pela análise de microssatélites (OLIVEIRA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 1999).

Contudo, nossos dados divergem daqueles apresentados por outros autores. Lages-Silva e colaboradores (2001) mostraram que a hemocultura foi representativa das populações sanguíneas em 78,6% de pacientes chagásicos portadores de megaesôfago. Outros autores observaram uma estabilidade dos padrões do kDNA em parasitos mantidos por longo tempo em cultura, mostrando a ausência de seleção de populações do parasito em cultura (MOREL et al., 1980; GOMES et al., 1991).

Portanto, os dados obtidos neste estudo devem ser tomados com cautela para uma extrapolação para a doença humana, já que o inóculo não foi representativo das populações do *T. cruzi* presentes no sangue dos pacientes.

O camundongo tem sido muito utilizado para o estudo de várias características da Doença de Chagas, apesar de não reproduzir fielmente a infecção humana. Dados da literatura mostram que existem linhagens isogênicas susceptíveis (C3H, BALB/c) ou resistentes (C57BL/6) à infecção pelo *T. cruzi*. No entanto, o uso de animais não isogênicos (Swiss), em avaliações experimentais, representa uma boa ferramenta uma vez que estes são constituídos por um grupo heterogêneo a exemplo do que ocorre com a população humana de áreas endêmicas (LANA, 1981; ANDRADE et al., 2002; DEVERA et al., 2003).

No estudo de amostras do *T. cruzi* em condições de laboratório faz-se necessário definir critérios que possibilitem o agrupamento destas em tipos e padrões, tais como virulência, patogenicidade, curvas de parasitemia, morfologia, tropismo tecidual e alterações histopatológicas (ANDRADE, 1976), aspectos esses que podem ser avaliados ao se estudar o comportamento biológico do parasito em animais experimentais.

A virulência e a patogenicidade das cepas do *T. cruzi* caracterizam o comportamento biológico das mesmas e, conjuntamente, podem ser

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

consideradas como os principais fatores ligados ao parasito, que determinariam o curso da infecção no modelo experimental. Segundo Andrade (1985), o conceito de virulência está relacionado à capacidade de multiplicação do parasito em seu hospedeiro, e a patogenicidade se refere às características mais intrínsecas e constantes do *T. cruzi* e relacionadas à sua capacidade de produzir lesões teciduais e mortalidade.

A partir destas definições, avaliamos a virulência, em função da infectividade e da parasitemia induzidas pelas cepas no modelo murino, a mortalidade e a patogenicidade, relacionada ao tropismo tecidual e alterações histopatológicas.

A virulência dos isolados de *T. cruzi* foi avaliada pela capacidade infectante das mesmas e pelos dados da parasitemia que incluem períodos pré-patente (PPP) e patente (PP) e o pico máximo de parasitemia. A avaliação desses parâmetros mostrou que os isolados do parasito avaliados neste estudo apresentaram baixa virulência, permitindo a classificação dos mesmos no biotipo III de Andrade (1985), que inclui cepas com picos de parasitemia após 25 a 30 dias da infecção e baixa mortalidade dentro de 30 dias.

Um parâmetro utilizado em estudos do comportamento biológico *in vivo* é a infectividade das cepas do *T. cruzi* para camundongos, que é detectada por exame a fresco, microhematócrito, hemocultura, entre outros (LUQUETTI; RASSI, 2000). A infectividade das formas de cultura do *T. cruzi* é controversa sendo que alguns autores relatam a perda de infectividade para cepas mantidas por períodos prolongados em meio de cultura e outros observam seu aumento (BRENER et al., 1974).

As populações do *T. cruzi* podem perder a capacidade infectiva para camundongos, após cultivo prolongado em cultivo celular (LANA et al., 2000). Em nosso trabalho a manutenção do parasito em meios de cultivos acelular e celular por um período máximo de 60 dias não alterou a capacidade infectante das mesmas, contudo, a análise dessas populações mostrou que as formas

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

tripomastigotas utilizadas no inóculo não foram semelhantes às encontradas na infecção humana.

A infectividade é considerada uma importante variável da virulência e dados na literatura mostram que 80% das cepas que circulam na natureza apresentam baixa ou média virulência para camundongos (ANDRADE et al., 1985; DEVERA et al., 2002; TOLEDO et al., 2002). Neste estudo, ambos os isolados apresentaram 100% de infectividade para os camundongos, fato que pode estar relacionado à origem destes isolamentos, provenientes de pacientes portadores da forma digestiva que podem apresentar baixos níveis de linfócitos T CD4 circulantes (LEMOS et al., 1998). Bértoli e colaboradores (2006) mostraram diferenças na infectividade das cepas de *T. cruzi* relacionadas à origem do isolado, onde uma maior infectividade foi detectada em animais infectados pelas populações do *T. cruzi* isoladas de animais silvestres em relação às isoladas de humanos e triatomíneos.

De acordo com Fernandes e colaboradores (1997), PPP é um indicador de virulência das cepas do *T. cruzi*, sendo considerada alta virulência quando menor que oito dias e de baixa maior que 12 dias. Para as cepas do biotipo III os valores médios do PPP variam de cinco a 12 dias (CAMANDAROBA et al., 2001; DEVERA et al., 2002) e corroboram com os dados obtidos neste estudo, onde o PPP médio foi de 12 dias.

A avaliação do PP da parasitemia do *T. cruzi* nas infecções experimentais em camundongos, determinado pela positividade do exame de sangue a fresco, mostram que este parâmetro não é bem definido para as cepas do biotipo III, fato também evidenciado neste estudo. A maioria destas cepas mantém uma parasitemia baixa e patente até os 60 dias de observação (DEVERA et al., 2002).

O pico máximo de parasitemia encontrado neste estudo ($1,15 \times 10^4$ parasitos/mL de sangue) não foi suficiente para classificar as populações estudadas em alta, média ou baixa virulência, já que a literatura disponível utiliza índices de

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) LIPH Science, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

parasitemia bastante variáveis para esta classificação. Para Fernandes e colaboradores (1997), cepas de alta virulência alcançaram picos parasitêmicos de $13,1 \times 10^3$ parasitos/5 mm³ de sangue e as de baixa, 900 parasitos/5 mm³ de sangue. Devera e colaboradores (2002) classificaram como cepas de alta, média e baixa parasitemia respectivamente para aquelas com picos médios maiores que 1500, entre 500 e 1499 e inferiores a 500 parasitos/5µL de sangue. Gomes e colaboradores (2003) consideraram as cepas que apresentam parasitemia sub-patente ou patente até 10^3 parasitos/mL de sangue como sendo de baixa parasitemia, média quando os picos parasitêmicos variam de 10^4 a 10^5 parasitos/mL de sangue e alta para aquelas com picos maiores que 10^6 parasitos/mL de sangue.

A taxa de mortalidade foi de 15% para os isolados avaliados, valor comparável aos obtidos em outros estudos experimentais com cepas pertencentes ao biotipo III (ANDRADE et al., 1985; CAMANDARROBA et al., 2001; DEVERA et al., 2002).

Apesar das cepas utilizadas terem sido escolhidas sem conhecimento anterior de suas características biológicas, o comportamento destas em camundongos não evidenciou na fase aguda da infecção nenhum padrão que pudesse ser associado a uma maior virulência das populações do *T. cruzi* envolvidas na forma digestiva da Doença de Chagas humana.

As cepas do *T. cruzi* podem apresentar padrões diferenciados associados com alta, média e baixa parasitemia na fase crônica da infecção experimental, comportamento também observado em seres humanos nos quais predominam parasitemia baixa ou ausente (CASTRO et al., 1983; JUNQUEIRA, 1996).

Múltiplos fatores têm sido relacionados à sobrevivência das populações sanguíneas do *T. cruzi*, podendo ser determinados pelo estado imunológico do hospedeiro e por mecanismos de escape do parasito. Entre estes podem ser citados, a susceptibilidade das populações do *T. cruzi* à ação do complemento

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

(KRETLI et al., 1979; BRAGA et al., 1993); capacidade de eliminar as proteínas de superfície (*capping-shedding*) e clivagem da porção Fc dos anticorpos aderidos à sua membrana (KRETLI et al., 1979). Do mesmo modo deve-se levar em consideração a presença de cepas multiclonais com diferentes características biológicas e níveis de resistência à resposta imune do hospedeiro com possível associação ao potencial para reativação (PEREZ-RAMIREZ et al., 1999).

A infecção pelo *T. cruzi* perdura por toda a vida do hospedeiro, em níveis subpatentes, e não ocorrem reagudizações na infecção crônica, a não ser em condições excepcionais relacionadas à indução de imunossupressão (LUQUETTI; RASSI, 2000).

A literatura referente à capacidade de reativação das cepas do *T. cruzi* na fase crônica da infecção não avaliam a parasitemia dos animais antes da imunossupressão. Neste estudo, a parasitemia na fase crônica antes do início da imunossupressão foi avaliada pela técnica do microhematócrito, a fim de se determinar uma comparação com a mesma durante a imunossupressão e assim permitir a caracterização do processo de reativação. A utilização do microhematócrito é uma importante estratégia, já que permite evidenciar o aumento progressivo da parasitemia evidenciado em cruzes mesmo antes da sua detecção pelo exame a fresco, detectado pelo método quantitativo de Brener (1962) ou pela câmara de Neubauer, onde a sensibilidade de detecção é de 1×10^4 parasitos/mL.

No modelo murino foi comprovado que a imunossupressão causada pela ciclofosfamida na fase aguda da infecção pode induzir uma parasitemia até 10 vezes maior quando comparada aos camundongos não imunossuprimidos (TOLEDO et al., 1991). Dados na literatura demonstram que o nível de parasitemia na fase crônica da infecção entre os pacientes HIV+ é muito maior que em HIV- (LAGES-SILVA et al., 1996; PEREZ-RAMIREZ et al., 1999, SARTORI et al., 2002), o que pode ser explicado pela depressão da imunidade

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

celular, entre os pacientes portadores do HIV, que é um fator essencial no controle do *T. cruzi* em todas as fases da doença (CALABRESE, 1999; SARTORI et al., 1999). A elevada parasitemia detectada nos pacientes imunodeprimidos parece desempenhar o principal papel nos casos de reativação da Doença de Chagas (PEREZ-RAMIREZ et al., 1999). Os dados obtidos neste estudo divergem do acima exposto, pois não foi possível estabelecer uma relação entre a parasitemia na fase crônica e a capacidade de reativação dos isolados (Tabela 4; Figura 5).

Os resultados encontrados neste trabalho mostraram que o processo de reativação ocorreu em 88,5% dos animais imunossuprimidos e em todos aqueles não imunossuprimidos, sendo observado nos animais inoculados com os dois isolados de *T. cruzi*, mostrando que este processo não foi cepa-dependente. A literatura apresenta equívocos quando afirma que a reativação do *T. cruzi* na fase crônica da infecção é um fenômeno cepa-dependente: Pereira e colaboradores (1996) observaram que a porcentagem de reativação na fase crônica da infecção experimental pode variar de 10,7% a 90,3%, de acordo com a cepa inoculada, e Brener e Chiari (1971) demonstraram que o processo de reativação foi mais evidente com a cepa CL em relação à cepa Y. A reativação da Doença de Chagas seria um processo cepa-dependente se fosse observado para algumas cepas e não em outras.

Os animais imunossuprimidos apresentaram uma maior sensibilidade à ação da ciclofosfamida, evidenciada por uma maior porcentagem de animais reativados entre o primeiro e o segundo ciclo de tratamento e taxa de mortalidade de aproximadamente 77% após o segundo ciclo, demonstrando que para esses parâmetros houve uma correlação com o tratamento imunossupressor.

O exame de sangue a fresco durante o tratamento com ciclofosfamida foi realizado, devido a sua baixa sensibilidade (1×10^4 parasitos/mL), somente naqueles animais que apresentaram microhematócrito altamente positivos (+++ ou ++++), e observamos a positividade deste teste somente entre animais que

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

receberam o tratamento com a ciclofosfamida. Este dado também sugere que houve uma maior intensidade do processo de reativação associada ao tratamento imunossupressor.

Estudos experimentais têm evidenciado diferenças no comportamento biológico das cepas do *T. cruzi*, as quais podem estar relacionadas à variedade de manifestações histopatológicas e clínicas encontradas na infecção humana (ANDRADE, 1974; MELO; BRENER, 1978). Infecções experimentais agudas em camundongos com diferentes cepas do *T. cruzi* mostram uma grande diferença na distribuição e intensidade de lesões teciduais (MELO; BRENER, 1978) e na fase crônica os parasitos são escassos e dificilmente evidenciados pelas técnicas de rotina histopatológica, e as lesões podem ser focais ou difusas principalmente no coração, e apenas focais nos demais órgãos (ANDRADE, 1999).

Neste estudo, o parasitismo tecidual foi avaliado por meio da coloração pela HE, que é classicamente empregada tanto em tecidos humanos como de modelos experimentais, e que nos casos de reativação poderia dar uma imagem mais sensível do aumento do parasitismo tecidual induzido pela reativação.

Na fase aguda da infecção 20% dos camundongos apresentaram parasitismo tecidual do tecido cardíaco e da bexiga, concordando com a maioria dos relatos que mostram que o coração é o órgão mais parasitado (CARNEIRO et al., 1991; DEVERA et al., 2002; SILVA et al., 2006), além de ser o segundo principal alvo do parasito em pacientes imunodeprimidos.

Na fase crônica da Doença de Chagas, a literatura mostra que o parasitismo tecidual apresenta uma marcante redução em função do desenvolvimento de mecanismos imunes eficientes no controle do parasitismo (TEIXEIRA et al., 1991; OLIVEIRA et al., 1993; DEVERA et al., 2002). Contudo, nossos dados são divergentes e mostram que os animais imunossuprimidos mostraram um parasitismo igual e os não imunossuprimidos mostraram um parasitismo mais

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

elevado que o observado na fase aguda. Entre os animais imunossuprimidos foi encontrado parasitismo apenas do músculo esquelético. Já entre os animais não imunossuprimidos observamos parasitos no coração e na musculatura lisa da junção esôfago-gástrica. Esses dados divergem do que seria esperado devido à origem destes isolados e depleção da resposta imune gerada pelo tratamento imunossupressor.

Os trabalhos disponíveis na literatura em geral avaliam o efeito de agentes imunossupressores apenas na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, tornando difícil a comparação com nossos dados. A exceção é um trabalho que utilizou como modelo experimental o roedor silvestre *Calomys callosus*, tratado com ciclofosfamida seis meses após a infecção, onde os autores encontraram um aumento no parasitismo do músculo cardíaco (TANIWAKI et al., 2005).

O *T. cruzi* é um protozoário que tem a habilidade de infectar diferentes tipos de células no hospedeiro mamífero, nas quais ocorre a multiplicação das formas parasitárias que levam a sua ruptura, com liberação de parasitos e organelas. Esses induzem uma reação imune rápida, parasito-específica e mediada por células e em consequência, processos inflamatórios ao redor de áreas de necrose (ANDRADE, 1999; TAFURI, 1999). As lesões produzidas pela infecção com o *T. cruzi* são causadas, direta ou indiretamente, por diversos fatores relacionados tanto ao parasito (tropismo, virulência, cepa, constituição antigênica, características genéticas, etc.) quanto ao hospedeiro (genética, sexo, idade, estado nutricional, resposta imune, etc.) (TAFURI, 1999).

Na fase aguda da doença o parasito é facilmente encontrado nos tecidos, contudo não existe em todos os casos uma correlação entre a presença do parasito e a intensidade das lesões, principalmente pela destruição de células não parasitadas (RIBEIRO DOS SANTOS; HUDSON, 1980). Neste estudo o coração foi o órgão mais afetado por lesões inflamatórias, seguido pela musculatura lisa das junções gastrintestinais, apresentando lesões inflamatórias mesmo na ausência de parasitismo tecidual, corroborando com os achados de

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Silva e colaboradores (2006), que observaram o mesmo comportamento experimental em 75% das cepas estudadas. Na fase crônica da infecção ocorreu uma redução do processo inflamatório entre os animais tratados com ciclofosfamida apenas na musculatura lisa das junções gastrintestinais. No coração e no músculo esquelético o tratamento imunossupressor levou a um aumento no número de animais com lesões inflamatórias destes tecidos. Estes resultados corroboram com o que é apresentado na literatura quando a imunossupressão realizada na fase crônica induziu um aumento dos processos inflamatórios no coração, músculo esquelético e cérebro de modelos experimentais (ANDRADE et al., 1997; TANIWAKI et al., 2005). Contudo existem evidências de que a imunossupressão exerça um papel na diminuição e modificação da reação inflamatória induzida pelo *T. cruzi* (TARLETON, 1988). Guerra e colaboradores (2001) mostraram que o tratamento de ratos com ciclofosfamida, cinco dias após a infecção pelo *T. cruzi*, impediu o desenvolvimento de miocardite aguda, fato também evidenciado por Calabrese e colaboradores (1996; 2000; 2003), no entanto, quando o tratamento foi realizado dois dias antes da infecção, ocorreu aumento no processo inflamatório. Estes dados sugerem que o desenvolvimento destes processos inflamatórios é dependente do tempo e da dose de ciclofosfamida administrada.

Hoje em dia, a propagação da infecção pelo HIV tem possibilitado a ocorrência da coinfeção com a Doença de Chagas, que, no decorrer da imunodepressão, pode levar a quadros graves de reativação da Doença de Chagas. Essa manifestação clínica da Doença de Chagas é pouco estudada e não se sabe se existem populações do parasito associadas à maior potencial para reativação.

Em áreas endêmicas, os pacientes podem se infectar por múltiplos contatos com diferentes vetores triatomíneos que, por sua vez, podem alimentar-se em diferentes indivíduos infectados favorecendo a formação de populações policlonais nos vetores e hospedeiros. Porém, com o desenvolvimento da

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

doença humana, alguns clones podem ser eliminados por sua incapacidade de propagação ou pela ação de mecanismos de defesa do hospedeiro vertebrado, que atua como um filtro biológico, reduzindo a complexidade da linhagem infectante (MACEDO; PENA, 1998; OLIVEIRA et al., 1998; MACEDO et al., 2004). Deste modo, as cepas obtidas de pacientes na fase crônica da infecção tendem a ser geneticamente menos complexas, apresentando menor virulência quando comparadas àquelas isoladas na fase aguda (FERNANDES et al., 1997; MACEDO; PENA, 1998; DEVERA et al., 2002).

A comparação da variabilidade genética do kDNA das populações do *T. cruzi* presentes no sangue dos pacientes no momento do isolamento demonstrou que as amostras do *T. cruzi* constituem dois grupos genéticos bem definidos e polimórficos entre si, porém unidos no mesmo braço do fenograma.

Há a hipótese de que a imunossupressão poderia possibilitar a exacerbação de subpopulações do *T. cruzi* controladas pelos mecanismos imunes do hospedeiro, uma vez que o parasito é constituído por uma mistura de populações com diferentes perfis genéticos e biológicos. Evidências experimentais demonstram que após imunossupressão do hospedeiro podem surgir polimorfismos na sequência dos minicírculos do *T. cruzi*, gerando o aparecimento de novas populações do parasito associadas à reativação (PACHECO; BRITO, 1999). A semelhança dos perfis genéticos encontrado nas cepas associadas à reativação da doença de Chagas em humanos abre novas perspectivas para a identificação de seqüências de DNA que possam diferenciar essas populações em pacientes chagásicos submetidos à imunodepressão.

Uma seleção de populações do *T. cruzi* foi evidenciada entre os isolados obtidos durante o período de imunossupressão entre os camundongos infectados apenas com isolado 1931. Marques de Brito e colaboradores (2003) recuperaram populações geneticamente divergentes da cepa parental após imunossupressão experimental em camundongos apenas quando a cepa inoculada foi obtida de paciente com reativação.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Para o isolado 1956 houve uma homogeneidade nos padrões genéticos obtidos nas diversas fases do estudo, mostrando ausência de seleção de populações do parasito inoculadas nos animais após a imunossupressão. Perez-Ramirez e colaboradores (1999) afirmam que a imunodepressão não induz o estabelecimento de novos genótipos do *T. cruzi*.

Neste estudo, a variabilidade do kDNA das populações do *T. cruzi* circulantes no sangue do paciente foram comparadas com aquelas presentes no inóculo dos camundongos e aquelas isoladas no decorrer da infecção experimental. Como anteriormente discutido, foi detectada seleção de populações do parasito durante o processo de isolamento, dificultando a validação deste estudo para a extrapolação aos casos humanos, uma vez que as populações do parasito inoculadas nos camundongos não foram totalmente representativas daquelas presentes no sangue do paciente.

6 Conclusões

Os isolados de pacientes com a forma digestiva apresentaram parasitemia patente, porém baixa, durante todo o período de avaliação.

Constatou-se período de ocorrência do pico de parasitemia (média de 33,5 dias) e a baixa taxa de mortalidade (15%), equivalente ao observado para as cepas do biotipo III por Andrade (1985).

O estudo histopatológico na fase aguda mostrou a presença de formas amastigotas somente no coração e na bexiga.

Na fase crônica não houve diferença estatística significativa no número de animais, imunossuprimidos ou não, que apresentaram amastigotas teciduais.

O tropismo tecidual pela musculatura lisa das junções gastrintestinais só foi observado entre os animais não imunossuprimidos.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: Euripedes Humberto Borges **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

Na fase aguda houve um maior processo inflamatório nos tecidos cardíaco e muscular liso das junções.

Na fase crônica do estudo observou-se um maior número de animais com inflamação do tecido cardíaco entre aqueles imunossuprimidos. O inverso ocorreu para as junções gastrintestinais.

Não foi possível estabelecer uma correlação entre a parasitemia na fase crônica e a capacidade de reativação dos isolados.

O processo de reativação da parasitemia na fase crônica da infecção foi observado independentemente do tratamento com a ciclofosfamida. Contudo, pode-se afirmar que ocorreu de forma mais intensa entre os animais imunossuprimidos, pois estes apresentaram parasitemia detectada também pelo exame a fresco.

A análise dos dados da caracterização genética mostra que houve uma tendência à emergência de populações do *T. cruzi* após imunossupressão na fase crônica da infecção, detectada pela técnica de LSSP-PCR, apenas para o isolado 1931, sugerindo um processo de reativação cepa-dependente.

A caracterização genética mostrou que as populações do *T. cruzi* presentes no material inoculado nos camundongos foi divergente daquelas encontradas no sangue dos pacientes, mostrando que os resultados obtidos neste estudo não podem ser extrapolados para os casos humanos da Doença de Chagas.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

7 Bibliografia

ALBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live *Trypanomastigotes*. **Infect. Immun.**, 64:1961-1967,1996.

ANDRADE, C. P. **Estudo clínico-experimental das populações do *Trypanosoma cruzi* associadas à reativação da Doença de Chagas humana.** Dissertação (Mestrado) Uberaba: Universidade Federal do Triângulo Mineiro, 2008.

ANDRADE, L. O. et. al. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp. Parasitol.**, 100:269-275,2002.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev. Pat. Tropical.**, 3:65-121,1974.

ANDRADE, S. G. Cepas do *Trypanosoma cruzi* e sua importância na patologia da Doença de Chagas. **J.B.M.**, 30:22-23, 1976

ANDRADE, S. G. Morphological and behavioral characterization of *T. cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 18 (Supl.): 39-46,1985.

ANDRADE, S. G. et al. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. j. Exp. Path.**, 78:391-399,1997.

ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 8:219-224,1996.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

ANDRADE, Z. A. **Patologia da Doença de Chagas**. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. (orgs). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2 Ed. Rio de Janeiro (RJ): Guanabara-Koogan, p.201-230, 2000. ANDRADE, Z. A. A forma indeterminada da Doença de Chagas em tempos de controle do *Triatoma infestans*. **Rev. Pat. Trop.**, 34(2): 105-111, 2005.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKI, M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am. J. Pathol.**, 127: 467-473, 1987.

ANDRADE, Z. A. A patologia da Doença de Chagas no homem. **Ann Soc. Belg. Med. Trop.**, 65 (Supl I): 15:30, 1985.

ATIAS, A. Enfermedad de Chagas digestive en Chile. **Bol. Chileno Parasitol.**, 24:70-74, 1969.

AVILA, H.A. et al. Polymerase chain reaction amplifications of *trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Mol. Biochem. Parasitol.**, 48:211-221, 1991.

AYRES, M. et al. **Bio Estat 4.0: Aplicações estatísticas nas áreas das ciências bio-médicas**. Belém: Sociedade Civil Mamirauá; Brasília: Ministério da Ciência e Tecnologia; Belém: Imprensa Oficial do Estado do Pará, 324p, 2005.

BARRETO, G. et al. Mitochondrial D-loop "signatures" produced by low-stringency single specific primer PCR constitute a simple comparative human identity test. **Am. J. Hum. Genet.**, 58:609-616, 1996.

BERTOLI, M. et al. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts. **Parasitology Research.**, 99:7-13, 2006

BOCCHI, E.A. et al. Heart transplantation for chronic Chagas heart disease. **Ann. Thorac. Surg.**, 61:1727-1733, 1996.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

BRAGA, E.M. et al. Differences in susceptibility to lysis between clones of the strain of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 88:529-534,1993.

BRENER,Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 4:389-396,1962.

BRENER,Z.; CHIARI, E. The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas's disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 65:629-636,1971.

BRENER,Z.; CHIARI, E.;ALVARENGA,N.J. Observations on *Trypanosoma cruzi* strains maintained over an 8-years period in experimentally inoculated mice. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 16:39-46,1974.

BRITTO,C. et al. A simple protocol for the physical 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**, 88:171-172,1993.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu. Rev. Microbiol.**, 49:175-200,1995.

CALABRESE,K.S. Immunosuppressive drugs as tool to explore immunopathology in experimental Chagas disease. **Mem.Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (Supl.1):273-276,1999.

CALABRESE,K.S.; LAGRANGE, P.H.;GONÇALVES DA COSTA, S. C. Chagas disease enhancement of systemic of inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. **Inst. J. Immunopharmacol.**, 18:505-514,1996.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

CALABRESE, K.S. et al. Study of acute chagasic mice under immunosuppressive therapy by cyclosporine A: modulation and confocal analysis of inflammatory reaction. **Immunopharmacol.** 47:1-11, 2000.

CALABRESE, K.S. et al. T cell subpopulations in myocardial inflammatory infiltrates detected by confocal microscopy: dose dependence in mice treated with cyclophosphamide during acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Pathol. Biol.**, 51:129-134, 2003.

CAMANDAROBA, E.L. et al. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (bioderme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 34(2):151-157, 2001.

CAMARGOS, E.R.S. et al. Infections with different *Trypanosoma cruzi* populations in rats: myocarditis, cardiac sympathetic denervation, and involvement of digestive organs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 62:604-612, 2000.

CARNEIRO, M.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86:387-393, 1991.

CASTRO, C.; ALVES, M.T.; MACEDO, V. Importância da repetição do xenodiagnóstico para avaliação da parasitemia na fase crônica da Doença de Chagas. **Rev. Bras. Med. Trop.**, 16:98-103, 1983.

CASTRO, C. et al. Estudo radiológico longitudinal do esôfago, em área endêmica de Doença de Chagas, em um período de seis anos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 25:225-230, 1992.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotripanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1:159-218, 1909.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

CHAGAS, C. Tripanosomiase americana. Forma aguda da moléstia. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 8:37-60, 1916.

CHIARI, E. et al. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human chronic Chagas' disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 22:19-23, 1989.

CONCETTI, H. et al. Chagas' disease of the cervix uteri in a patient with acquired immunodeficiency syndrome. **Hum. Pathol.**, 31:120-122, 2000.

CONSENSO BRASILEIRO EM DOENÇA DE CHAGAS. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38 (Supl. III):1-29, 2005.

COURA, J.R. Tripanosomose, Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Prog. Cienc.**, 55:30-33, 2003.

COURA, J.R. Chagas disease: what is known and what is needed – A background article. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 102 (Supl. I): 113-122, 2007.

COURA, J.R. et al. Morbidade da Doença de Chagas. IV Estudo Longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 80:73-80, 1985.

COURA, J.R.; ANUZIATO, N.; WILLCOX, H.P.F. Morbidade da Doença de Chagas. I Estudo de casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 78:363-372, 1983.

DE SOUZA, W. A short review on the morphology of *Trypanosoma cruzi*: from 1909 to 1999. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (Supl. I): 17-36, 1999.

DEANE, M.P. et al. Are our laboratory "strains" representative samples of *Trypanosoma cruzi* populations that circulate in nature? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 79 (Supl.):19-24, 1984.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

DEVERA, R. et al. Biodemas de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas de humanos de três áreas endêmicas de Minas Gerais. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 35:323-330, 2002.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called “cruzi” complex? A review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98:1-12, 2003.

DIAS, J.C.P. et al. Cecílio Romaña, o sinal de Romaña e a Doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 30(5):407-413, 1997.

DIAS, J.C.P. et al. Esofagopatia chagásica na área endêmica de Bambuí, MG-Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 16:46-57, 1983.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The Impact of Chagas Disease Control in Latin America – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 97:603-612, 2002.

DIEZ, M. et al. Usefulness of PCR strategies for early diagnosis of Chagas' disease reactivation and treatment follow-up in heart transplantation. **Am. J. Transplant.**, 7:1633-1640, 2007.

FERNANDES, C.D. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic chagasic patients, triatomines and opossums naturally infected from the state of Rio Grande do Sul, Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 92:343-351, 1997.

FERREIRA, M.S. Reativação da Doença de Chagas em pacientes com AIDS. **Infectologia Hoje**, 9:1-2, 2009.

FERREIRA, M.S. Chagas disease and immunosuppression. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (Supl.1):325-327, 1999.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

FERREIRA, M.S. et al. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. **Clin Infect. Dis.**, 25:1397-1400,1997.

FIGUEIRÊDO, S.S. et al. Caracterização radiográfica das manifestações esofagogastrointestinais da Doença de Chagas. **Radiol. Bras.**, 35:293-297, 2002.

FONTES REZENDE, R.E. et al. Reactivation of Chagas' disease in a patient with non-Hodgkin's lymphoma: gastric, oesophageal and laryngeal involvement. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 100:74-78,2006.

FREITAS, J. R, S. V. **Megacólon e megaesofago no Brasil Central**. Resenha Clinico-Científica, 11:411-421, 1950.

GALLERANO,V. et al. Chagas' disease reactivation with skin symptoms in a patient with kidney transplant. **Inst. J. Dermatol.**, 46:607-610,2007.

GALHARDO, M.C. et al. Reativação da infecção por *Trypanosoma cruzi* em paciente com síndrome de imunodeficiência adquirida. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 32:291-294,1999.

GASCÓN, J. et al. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in áreas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. **Rev. Esp. Cardiol.**, 60:285-93,2007.

GOMES, M.L. et al. Stability of isoenzyme and kinetoplast DNA (k-DNA) patterns in successively cloned *Trypanosoma cruzi* populations. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86:379-385,1991.

GOMES, M.L. et al. *Trypanosoma cruzi*: optimization of polymerase chain reaction for detection in human blood. **Exp. Parasitol.**, 88:28-33,1998.

GOMES, M.L. et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic group with peculiar biochemical and biological behavior. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 98:649-654,2003.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

GERRA, L.B. et al. Cyclophosphamide-induced immunosuppression protects cardiac noradrenergic nerve terminals from damage by *Trypanosoma cruzi* infection in adult rats. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, 95:505-509,2001.

HIGUCHI,M.L. et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovasc. Res.**, 60:96-107,2003.

JUNQUEIRA, A.C.V. **Um estudo sobre o xenodiagnóstico, a hemocultura e a reação em cadeia da polimerase na detecção do *Trypanosoma cruzi* Chagas, 1909 em indivíduos na fase crônica da infecção chagásica.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,1996.

KAMIJI, M. M.; OLIVEIRA, R. B. O perfil dos portadores de doença de Chagas, com ênfase na forma digestiva, em hospital terciário de Ribeirão Preto, SP. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38:305-309,2005.

KIERSZENBAUM, F. What are T-cell subpopulations really doing in Chagas disease? **Parasitol. Today**,11:6-7,1995.

KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARRIGTON, P.; NUSSENZWEIG, R.S. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. **Clin. Exp. Immunol.**, 37:416-423,1979.

LAGES-SILVA, E. et al. Avaliação do xenodiagnóstico e da hemocultura realizados simultaneamente em pacientes com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas. XXXII Congresso Brasileiro de Medicina Tropical. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 29 (Supl.):128,1996.

LAGES-SILVA, E. et al. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 65:435-441,2001.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated form patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

LANA, M. **Caracterização do *Trypanosoma cruzi*, cepa Berenice isolada da mesma paciente em diferentes períodos.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia) Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 1981.

LANA, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: infecivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. **Exp. Parasitol.**, 96:61-66,2000.

LEMOS, E. M. et al. Decreased CD4 (+) circulating T lymphocytes in patients with gastrointestinal Chagas disease. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, 88:150-155,1998.

LOPES, E. R. et al. Prevalência de megas em necropsias realizadas no Triângulo Mineiro no período de 1954 a 1988. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 22:211-215,1989.

LUQUETTI, A. O.; RASSI, A. **Diagnóstico laboratorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.** In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. BARRAL-NETO, M. (orgs). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2 ed. Rio de Janeiro (RJ):Guanabara-Koogan, PP.344-351,2000.

MACEDO, A. M.; PENA, S.D. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas disease. **Parasitol. Today**, 14:119-124,1998.

MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R.P.; PENA, S.D.J. Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis. **Expert Rev. Mol. Med.**, 4:1-16,2002.

MACEDO, A. M. et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 99:1-12,2004.

MACEDO, V. Indeterminate form of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94(Supl. I):311-316,1999.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

MARCHIORI, P. E. et al. Late reactivation de Chagas disease presenting in a recipient as an expansive mass lesion in the brain after transplantation of chagasic myocardiopathy. **J. Heart Lung Transplant.**, 26:1091-1096,2007.

MARQUES DE BRITO, C.M.; PIRES, M. Q.; PACHECO, R.S. Chagas disease and HIV co-infection: genetic analyses of two *Trypanosoma cruzi* strains under experimental immunosuppression. **Kinetoplast. Biol. Dis.**, 2:17,2003.

MELO, R. C., BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J. Parasitol.**, 64:475-482,1978.

MENEGHELLI, U.G. Chagasic enteropathy. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 37(3):252-260, 2004.

MENEGHELLI, U. G. et al. Evidências do declínio das ocorrências do megaesôfago e megacólon chagásicos: Estudos epidemiológicos no Hospital de Clínicas de Ribeirão Preto. **Medicina**, Ribeirão Preto, 24:218-224,1991.

MONCAYO, A.; ORTIZ YANINE, M. I. Na update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 100:1-15,2006.

MOREL, C. et al. Strains and *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 77:6810-6814,1980.

NISHIOKA, S. A. Benznidazol na quimioprofilaxia primária da reativação de doença de Chagas em chagásicos crônicos em uso de corticosteróides em doses imunodepressoras: há evidencia suficiente para a recomendação do seu uso? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 33:83-85,2000.

OLIVEIRA, E. C. et al. *Trypanosoma cruzi* and experimental Chagas' disease: characterization of a stock isolated from a patient with associated digestive and cardiac form. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 26:25-33,1993.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

OLIVEIRA, R. P. et al. Probing the genetic population structure of *Trypanosoma cruzi* with polymorphic microsatellites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 95:3776-3780, 1998.

OLIVEIRA, R. P. et al. The population structure of *Trypanosoma cruzi*: expanded analysis of 54 st **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** (Supl. I):65-70, 1999.

PACHECO, R.S.; BRITO, C.M. Reflections on the populations dynamics of *Trypanosoma cruzi*: heterogeneity versus plasticity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (Supl. I): 199-201, 1999.

PELLEGRINO, J; REZENDE, C.L. A doença de Chagas na infância. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 51:545-610, 1953.

PENA, S.D.J. et al. Sequence-specific “gene signatures” can be obtained by PCR with single specific primers at low stringency. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 91:1946-1949, 1994.

PEREIRA, J.B.; WILLCOX, H.P.; COURA, J.R. Morbidade da doença de Chagas. III – Estudo longitudinal de seis anos, em Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brasil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 80:63-71, 1985.

PEREIRA, M. E. S. et al. Recrudescence induced by cyclophosphamide of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice is influenced by the parasite strain. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 91:71-74, 1996.

PEREZ-RAMIREZ, L. et al. Clinical analysis and parasite genetic diversity in human immunodeficiency virus/Chagas’ disease coinfections in Brazil. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 61:198-206, 1999.

PRATA, A. Classificação da Infecção chagásica no homem. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 23:109-113, 1990.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **Lancet Infect. Dis.**, 1:92-100, 2001.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

RASSI, A. et al. Influência de corticóide, na doença de Chagas crônica, administrado em virtude de afecções associadas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 30:93-99,1997.

RASSI, A. et al. Efeito protetor do nifurtimox contra a reativação parasitária em pacientes cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* e tratados com corticóides em virtude de afecções associadas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31:249-255,1998.

RELATÓRIO TÉCNICO, MINISTÉRIO DA SAÚDE (MS). Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento da co-infecção *Trypanosoma cruzi*-vírus da imunodeficiência humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 39:392-415,2006.

REZENDE, J. M. Classificação radiológica do megaesôfago. **Rev. Goiania Med.** 28:187-91,1982.

REZENDE, J. M.; MOREIRA, H. **Forma digestiva da doença de Chagas**. In: BRENER,Z.; ANDRADE,Z.; BARRAL-NETTO,M(orgs). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2ed. Rio de Janeiro (RJ):Guanabara-Koogan, PP.201-230, 2000.

RIBEIRO DOS SANTOS, R.; HUDSON, L. ***Trypanosoma cruzi*: immunolical consequences of parasite modification of host cells**. Clin. Exp. Immunol., 40:36-41,1980.

ROMAÑA, C.; ROMAÑA, M. S. Ivestigaciones sobre el megaesôfago em Cafayate (Salta). **An. Inst.Med. Reg.** (Tucuman), 5:35-40, 1960.

RUSSO, M. et al. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pasteur Immunol.**, 139:225-36,1998.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

SALGADO, P. R. et al. Tumor-like lesion due to Chagas' disease in patient with lymphocytic leukemia. **Rev. Inst. Med. Trop.** São Paulo, 38:285-288,1996.

SARTORI, A. M. C. Acompanhamento clínico e laboratorial de indivíduos com doença de Chagas e infectados pelo vírus da imunodeficiência humana. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 31:587-588, 1998.

SARTORI, A. M. C. et al. Reactivation of Chagas disease in a human immunodeficiency virus infected patient leading to severe heart disease with a late positive direct microscopic examination of the blood. **Am. J.Trop.Med Hyg.**, 59:784-786,1998.

SARTORI, A. M. C. et al. Reactivation of Chagas disease manifested by skin lesions in a patient with Aids. **Trans. R. Soc.Trop. Med. Hyg.**, 93:631-632,1999.

SARTORI, A. M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus(HIV)-positive and (HIV)-negative patients. **J. Infect. Dis.**, 186:872-875,2002.

SARTORI, A. M. et al. Manifestations of Chagas disease (American Trypanosomiasis) in patients with HIV/AIDS. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, 101:31-50, 2007.

SILVA, M. A.; NAI, G. A.; ROSA, J. A. Caracterização biológica e molecular de quatro cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas de pacientes na fase crônica, forma cardíaca da doença de Chagas. **Rev. Pat. Trop.**, 35:213-226, 2006.

TAFURI, W. L. Immunopathology of Chagas disease – a historical overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 94 (Supl.I): 247-248,1999.

TANIWAKI, N. N. et al. Disruption of myofibrillar proteins in cardiac muscle of *Calomys callosus* chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with immunosuppressive agent. **Parasitology Research.**, 97:323-331,2005.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

TANOWITZ, H.B. et al. Chagas disease. **Clin. Microbiol. Rev.**, 5(4):400-19,1992.

TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL-2 production II. Evidence for a role for suppressor cells. **J. Immunol.**, 140:2769-2773,1988.

TARLETON, R. L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends Parasitol.**, 19:447-451, 2003.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. Evolution and pathology in Chagas disease – A Review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 101(5):463-491,2006.

TEIXEIRA, V. P. A. et al. Comparação do parasitismo da veia central da supra-renal como de outros tecidos em chagásicos crônicos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 24:73-78,1991.

TOLEDO, M.J. O. **Influência da resposta imune sobre a quimioterapia específica da doença de Chagas experimental em camundongos.** Dissertação (Mestrado em Parasitologia). Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte,1992.

TOLEDO, M.J. O. et al. Results of specific treatment in immunosuppressed mice inoculated with different *Trypanosoma cruzi* strains. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 86 (Supl I):237,1991.

TOLEDO, M. J. et al. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. **Exp. Parasitol.**, 100:161-172, 2002.

TORRICO, M. C. et al. Estimación de la parasitemia en la infección humana por *Trypanosoma cruzi*: las altas parasitemias están asociadas con La severa y fatal enfermedad de Chagas congênita. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 38 (Supl 2):58-61,2005.

SANTOS, Wanessa Maria dos; SILVA, Eliana Lages; ANDRADE, Cristiane Pontes. Biological characterization and evolution of the potencial for reactivation of *Trypanosoma cruzi* populations isolated from patients with the digestive form of Chagas Disease. Translation by: [Euripedes Humberto Borges](#) **LIPH Science**, v. 3, n. 1, p.1-67, Jan./Mar., 2016. www.liphscience.com

TRIPATHY, S. P.; MACKANES, G.B. The effect of cytotoxic agent on the primary immune response to *Listeria monocytogenes*. *J. Exp. Med.*, 130:1-16,1969.

URBINA, J. A.; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends Parasitol.**, 19:495-501,2003.

VAGO, A.R. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA em oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 348:891-892,1996.

VAGO, A. R. et al. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease. **Am.J. Pathol.**, 156:1805-1809, 2000.

VAIDIAN, A. K.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H. B. Chagas' disease and AIDS. *Kinetoplastid. Biol. Dis.*, 3:2,2004.

VALEZI, A.C. et al. Tratamento do megaesôfago chagásico grau II por laparoscopia: experiência em 12 casos. **Rev. Col. Bras. Cir.**, 31:148-153,2004.

XIMENES, C. A. et al. Técnica simplificada para o diagnóstico radiológico do megacolo chagásico. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 17:23,1984.

WESTENBERGER,S.J. et al. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial maxicircles display species-and strain-specific variation and a conserved element in the non-coding region. **BMC Genomics**, 7:60,2006.

WINCKER, P. et al. 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.**, 51:771-777,1994.

WHO (World Health Organization). Control of Chagas disease. Second report of WHO Expert Committee. **WHO technical Report Series**, 905 p., 2002