

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

GISLAINE JANAINA FALKOWSKI TEMPORINI

Parâmetros para avaliação clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Maringá
2013

GISLAINE JANAINA FALKOWSKI TEMPORINI

Parâmetros para avaliação clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde
Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias.

Orientador: Prof.^a Dr.^a Silvana Marques de Araújo

Maringá
2013

FOLHA DE APROVAÇÃO

GISLAINE JANAINA FALKOWSKI TEMPORINI

Parâmetros para avaliação clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde pela Comissão Julgadora composta pelos membros:

COMISSÃO JULGADORA

Prof^ª. Dr^ª. Silvana Marques de Araújo
Universidade Estadual de Maringá (Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Ciomar Aparecida Bersani Amado
Universidade Estadual de Maringá

Prof. Dr. Haroldo Garcia de Faria
Universidade Estadual de Maringá

Aprovada em: 18 de fevereiro de 2012

Local de defesa: Bloco 126 – Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde (UEM)

DEDICATÓRIAS

Dedico este trabalho a Deus, meu fiel amigo, pois foi ele quem direcionou todos os caminhos para que a realização deste trabalho fosse possível.

AGRADECIMENTOS

Ao DEUS presente em minha vida, ao meu amigo e fiel companheiro, o DEUS DA MINHA SALVAÇÃO, que com grande amor tem cuidado da minha vida, me mostrando o caminho a ser percorrido e por ter colocado pessoas maravilhosas na trajetória desta minha vida.

A meu esposo que com muito carinho, paciência, companheirismo tem me compreendido na falta de tempo e pelo grande apoio que não me tem faltado.

Aos meus pais e irmãos que contribuíram para a minha formação acadêmica, profissional e moral, vibrando de alegria pelas conquistas.

À minha sogra Ivânia e ao meu sogro Luiz que estiveram ao meu lado quando eu precisava de conselhos amigos.

À minha Prof.^a Dr.^a. Silvana Marques de Araújo, minha orientadora, pela oportunidade, confiança, paciência, amizade dedicação, carinho, força e ensinamentos. Sil, você foi muito mais do que uma orientadora, foi uma grande amiga que tem me dado muitos conselhos e me ensinado muito, muito obrigada.

Ao Prof. Ms. Rogério Tiyo que muito me compreendeu e me ajudou desde o início da pós-graduação.

Ao Prof. Dr. Haroldo Garcia de Faria por compartilhar dos seus conhecimentos tão preciosos.

Aos professores do Mestrado e técnicos do laboratório de Parasitologia, compartilhando dos seus intelectuais, indispensáveis para minha formação acadêmica.

Aos colegas de mestrado pelo companheirismo e a todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Bendito seja o Deus e Pai de nosso Senhor Jesus Cristo, que, segundo a sua grande misericórdia, nos gerou de novo para uma viva esperança, pela ressurreição de Jesus Cristo dentre os mortos, para uma herança incorruptível, incontaminável e que se não pode murchar, guardada nos céus para vós que, mediante a fé, estais guardados na virtude de Deus, para a salvação já prestes para se revelar no último tempo”.

Parâmetros para avaliação clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

RESUMO

Analisou-se a eficiência de parâmetros clínicos na avaliação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos suíços, machos de 8 semanas. Dividiu-se animais em dois grupos: GS (sadios não inoculados) e GI (inoculados com 1400 tripomastigotas, intraperitoneal, cepa Y – *T. cruzi*). Avaliou-se parâmetros quantitativos e qualitativos em dias não consecutivos nos períodos, 7^o-11^o e 15^o-18^o dias de infecção. Observou-se diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos, nos dois períodos: consumo de água, circunferência abdominal e peso. Apenas no segundo período: quantidade de excretas, temperatura corporal, movimento-levantar e mortalidade. Não houve diferença ($p > 0.05$) entre os grupos: consumo de ração, exploração de auto-limpeza e coloração da pele. As fezes diferiram entre os grupos no segundo período. A ocorrência de isolamento não se mostrou prática. Diferenças na pelagem foram observadas entre os grupos, embora o parâmetro sofra interferência de brigas entre os animais. O consumo de água, ração, produção de excretas, característica das fezes, temperatura corporal, circunferência abdominal, movimento-levantar, peso e mortalidade, são parâmetros fáceis de serem medidos e eficientes na diferenciação da clínica de camundongos sadios e infectados pelo *T. cruzi*, eleitos para protocolos de estudos clínicos com camundongos, sendo este o primeiro trabalho a reunir informações de parâmetros clínicos qualitativos e quantitativos avaliados nesses animais.

Palavras-chave: análise clínica, doença de Chagas, infecção experimental, camundongos, *Trypanosoma cruzi*.

Parameters for evaluation of clinical trial in mice infected by *Trypanosoma cruzi*

ABSTRACT

The effectiveness of clinical parameters in the evaluation of *Trypanosoma cruzi* infection was analyzed in male Swiss mice of 8 week. Animals were divided into HG (healthy) and IG (1400 trypomastigotes, intraperitoneally, Y strain – *T. cruzi*). Quantitative and qualitative parameters in non-consecutive days was evaluated, 7th-11th and 15th -18th days of infection. There were significant differences ($p < 0.05$) between both groups, in the two periods: water consumption, abdominal circumference and weight. Only the second: amount of excreta, body temperature, move-up and mortality. There was no difference ($p > 0.05$) between the groups in food consumption, exploration of self-cleaning and skin staining. The feature of fecal differed between the groups in the second period. The occurrence of isolation was not practical. Differences were observed in the hair between groups, although the parameter had been interfered by fights between animals. The consumption of water, feed, excreta production, characteristic of the faeces, body temperature, abdominal circumference, move up, weight and mortality parameters are easy to be measured and effective in clinical differentiation of healthy mice and mice infected by *T. cruzi*, elected in protocols for clinical study with mice, which is the first report to gather information of qualitative and quantitative clinical parameters evaluated in these animals.

Keywords: clinical analysis, Chagas disease, experimental infection, mice, *Trypanosoma cruzi*.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 Curva média de parasitemia obtida em camundongos suíços, machos, com 8 semanas de idade infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, por via intraperitoneal. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.....48
- Figura 2 Análise de parâmetros clínicos das médias do volume de água ingerida, peso, circunferência abdominal e consumo de ração de camundongos suíços, machos, sadios (GS) ou infectados (GI) nos dois períodos de avaliação. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.....48
- Tabela 1 Média \pm desvio padrão e significância de parâmetros clínicos quantitativos avaliados e comparados em camundongos suíços, machos, com 8 semanas de idades, sadios ou infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* de acordo com o período. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.....49
- Tabela 2 Aspectos das fezes de camundongos suíços, machos, sadios (GS) ou infectados (GI) com 1400 formas tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* de acordo com o período de avaliação. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.....49
- Tabela 3 Mortalidade apresentada por camundongos suíços, machos, sadios (GS) ou infectados (GI) com 1400 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y de *T. cruzi* de acordo com o dia de infecção. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.....49

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia* (artigo 1) disponível em:

<<http://cpro4576.publiccloud.com.br:8080/editora-consulta/assinante/artigo/filtrar/filtrar.jsp>>

SUMÁRIO

| | | |
|------|--|----|
| 1. | CAPÍTULO I | 12 |
| 1.1 | Histórico | 12 |
| 1.2 | Distribuição geográfica | 13 |
| 1.3 | Epidemiologia | 13 |
| 1.4 | Vetores | 15 |
| 1.5 | Reservatórios | 15 |
| 1.6 | Parasito | 16 |
| 1.7 | Ciclo biológico | 17 |
| 1.8 | Transmissão | 17 |
| 1.9 | Manifestações clínicas | 18 |
| 1.10 | Tratamento | 19 |
| 1.11 | Infecção experimental e modelo animal | 20 |
| 1.13 | Modelo murino | 20 |
| 1.14 | Justificativa | 21 |
| 1.15 | Objetivos | 22 |
| 1.16 | Referências | 22 |
| 2 | CAPÍTULO II | 37 |
| 2.1 | Artigo 1: Parâmetros para avaliação clínica em camundongos infectados por <i>Trypanosoma cruzi</i> | 38 |
| 3 | CAPÍTULO III | 50 |
| 3.1 | Conclusões | 50 |
| 3.2 | Perspectivas futuras | 51 |

CAPÍTULO I

HISTÓRICO

A doença de Chagas (DC) (trypanosomíase americana ou esquizotripanose) é uma infecção causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi*, descoberto pelo médico brasileiro Carlos Justiniano Ribeiro das Chagas em uma de suas viagens para o Estado de Minas Gerais para o controle da malária. A quantidade de insetos hematófagos (*Panstrongylus megistus*) que albergavam grandes quantidades do protozoário no intestino lhe chamou atenção. Chagas inoculou uma amostra deste protozoário em macacos e em outros animais de laboratório e, posteriormente, observou o aparecimento dos mesmos no sangue periférico dos animais. Tempos depois ele descobriu o mesmo protozoário em uma criança de dois anos, Berenice, em 1909, na cidade mineira de Lassance. Após o descobrimento da doença em humanos, ele descreveu sua história natural, a biologia do protozoário em reservatórios silvestres e domésticos, tanto nos vertebrados quanto nos invertebrados. Descreveu também toda sintomatologia clínica e estabeleceu alguns modelos experimentais, tais como cães, cobaias e macacos (*Callitrix penicillata*) (SALGADO, 1980; CHAGAS, 1909; ELIZARI, 1999). Atualmente outros vertebrados, como coelhos, ratos, camundongos têm sido utilizados por diversos pesquisadores, a fim de investigar diferentes aspectos da infecção pelo *T. cruzi* (DE OLIVEIRA *et al.*, 2009; MORENO *et al.*, 2010; LARREA *et al.*, 2011).

Embora a DC tenha sido descrita no século XX, Charles Darwin, em uma das suas viagens na América do Sul, na noite de 25 de março de 1835 relatou a presença do vetor transmissor da DC, chamando-o de “benchuca” (DARWIN, 1979), também conhecido como “chinche”, “vinchuca” e “barbeiro” (PEREIRA *et al.*, 2010). Quando ele voltou para a Inglaterra, após um possível período de incubação, e provável aquisição da DC, começou a ter sintomas digestivos, morrendo de insuficiência cardíaca congestiva (ADLER, 1965).

Existem relatos da infecção humana pelo *T. cruzi* mais antigos. Análises de múmias da região do Vale do Peruaçu, em Minas Gerais, apontam que a infecção pelo parasito já acontecia em terras brasileiras há pelo menos 4.500 anos (FERNANDES *et al.*, 2008). Estudos de paleoparasitologia revelaram a presença de DNA de *T. cruzi* no tecido de múmias de seres humanos, pré-colombianas, que viviam no deserto do Atacama, no Chile e no Peru, datadas com 9.000 anos (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). Embora, evidências demostrem que a DC é uma infecção que está presente em humanos há milhares de anos (ARAÚJO *et al.*,

2009), atualmente, ela continua sendo totalmente negligenciada e considerada como um proplema de saúde pública (DIAS, DESSOY, 2009).

DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA

A DC é uma zoonose que ocorre preferencialmente na América Latina, sendo endêmica em 21 países: Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Uruguai e Venezuela (WHO, 2012).

Através da crescente migração de latino-americanos que não sabem que estão infectados, ocorreu aumento do número de pacientes, em países desenvolvidos não endêmicos, incluindo países do Continente Americano (Canadá e Estados Unidos), Europa (Alemanha, Áustria, Bélgica, Croácia, Dinamarca, Espanha, França, Holanda, Itália, Noruega, Portugal, Reino Unido, Romênia, Suíça e Suécia), assim como em regiões a oeste do pacífico (Austrália e Japão) (DNDi, 2012a; WHO, 2010). Na Itália estima-se que existam aproximadamente 3000 imigrantes infectados (GUERRI-GUTTENBERG *et al.*, 2009).

Em países com ausência do vetor, ocorre com menor frequência a transmissão vertical (de mãe infectada para o filho), transfusão sanguínea e transplante de órgãos (WHO, 2012). A doença que antes era considerada restrita das Américas, hoje tornou-se mundial (SCHMUNIS, YADON, 2010).

EPIDEMIOLOGIA

Estudos transversais apontam que aproximadamente 10 milhões de pessoas estão infectadas pela DC em todo mundo, e 25-90 milhões de pessoas estão em risco de contraí-la. Na década de 80, foram registrados cerca de 45.000 óbitos pela DC. Em 2012 esse número reduziu para 12.000, correspondendo a 11% das mortes e representando 0,5% da mortalidade geral no Brasil nos últimos 10 anos (WHO, 2012; DNDi, 2012b; WORLD BANK, 2006). Dados do Ministério da Saúde mostram que, entre 2000 e 2011, foram registrados no Brasil 1.252 casos de doença de Chagas aguda, sendo a maior parte dos casos registrados na região norte do país, nos estados do Pará e do Amazonas. No entanto, as notificações são apenas de novos casos, como os dos surtos decorrentes da ingestão de alimentos contaminados (caldo de cana, açaí, bacaba, entre outros) representando 70% (877/1.252) deles e 7% por transmissão vetorial (92/1.252). Em 22% dos casos (276/1.252) não foi identificada a forma de transmissão (BRASIL, 2012a). Quanto ao chagásico crônico, não é obrigatório a notificação, cabendo ao gestor municipal assegurar a assistência e o acompanhamento dos tratamentos, de

acordo com a forma clínica apresentada (BRASIL, 2009a; BRASIL, 2009b). Isto leva a subnotificação de casos da DC existentes no Brasil e consequentes óbitos. Estima-se que de 1% a 10% dos indivíduos com a forma crônica da DC evolua para óbito (BRASIL, 2011).

No dia 09 de junho de 2006, o Brasil recebeu a certificação da Organização Pan-Americana da Saúde de interrupção da transmissão vetorial pelo *Triatoma infestans* (BRASIL, 2006). Mas isso não significa que houve erradicação da transmissão vetorial, devido ao fato de existir aproximadamente 141 espécies transmissoras da doença (BALCZUN *et al.*, 2012). Para ser considerada erradicada uma doença, deve existir uma forma radical de controle do agente etiológico ou de seu vetor, extinguindo-o, não havendo novas incidências nem a necessidade de prevenção (EVANS, 1985). Essa não é a realidade encontrada em nosso país para a DC, onde ainda novos casos são diagnosticados. Em cinco de março de 2012 foi notificada a morte de uma criança na cidade de Guarapari, confirmada pela Secretaria da Saúde do Estado do Espírito Santo (BRASIL, 2012b) em nove de abril de 2012. Uma equipe da SESA/ES enviada para as proximidades da residência da criança constatou a presença do vetor (*Triatoma brasiliensis*) infectado pelo parasito (*Trypanosoma cruzi*).

Em um estudo realizado na Espanha com 489 imigrantes adultos de 14 países da América Latina atendidos em dois serviços médicos destinados a esta população, 202 participantes (41%) estavam infectados pelo *T. cruzi*, sendo que 14 (7%) tinham antecedentes de terem recebido transfusão de sangue. Dentre os imigrantes infectados, a Bolívia foi o país de origem mais frequente (65%), seguido pela Argentina (56%), Chile (50%), Paraguai (33%) e Venezuela (20%) (MUÑOZ *et al.*, 2009).

Nos dias atuais, milhares de indivíduos encontram-se infectados cronicamente pela DC, sem acesso ao diagnóstico e tratamento. Apesar do Ministério da Saúde propor algumas ações para melhorias no atendimento (BRASIL, 2009c), o acesso do paciente crônico ao sistema de saúde raramente é observado, sendo um desafio diagnosticar esses pacientes pelo fato de sua maioria apresentar quadros assintomáticos ou sintomas semelhantes a diversas patologias, dificultando o seu tratamento. Apenas após longos períodos de infecção a DC é descoberta, situação que acarreta em um número subestimando de pacientes infectados pelo *T. cruzi* (BRASIL, 2005; RASSI *et al.*, 2010).

Passado mais de um século do descobrimento da doença de Chagas, ela continua sendo evidentemente negligenciada. De um total de 1.393 novos fármacos aprovados entre 1975 e 1999, apenas 1% (13 fármacos) era especificamente indicado para doenças tropicais, mas nenhum para a DC, prejudicando o atendimento do paciente chagásico (TROUILLER *et al.*, 2002).

VETORES

Os transmissores da doença de Chagas são insetos hematófagos hemípteros, pertencentes da família *Reduviidae*, agrupados na subfamília *Triatominae* (LENT, WYGODZINSKY, 1979), sendo popularmente conhecidos como: “vinchuca”, “perceveão”, “percevejo-do-sertão”, “percevejo-francês”, “percevejo-gaudério”, “percevejo-grande”, “bicho-de-parede-preto”, “bara-tão”, “bruxa”, “cafote”, “cascudo”, “chupança”, “chupão”, “chupa-pinto”, “fincão”, “bicudo”, “procotó”, “porocotó”, “furão”, “piolho de piaçava”, “quiche do sertão”, “vum-vum”, mas principalmente como “barbeiro” (LENT, 1999; MALAFAIA, RODRIGUES, 2010).

As prováveis denominações para este nome se atribuem a profissão de barbeiro, pelo fato de antigamente esta profissão também exercer a sangria (CHAGAS, 1910) ou por ele picar na região da face, local que se encontra descoberto durante o período que o indivíduo está dormindo (CHAGAS FILHO, 1993).

O motivo mais relevante para a transmissão da doença, não é o fato deles serem apenas hematófagos, mas sim, o ato de defecarem logo após a hematofagia, depositando as fezes contaminadas com o agente etiológico da doença, podendo ser levado aos olhos, nariz, boca ou simplesmente penetrarem na região onde ocorre o repasto sanguíneo, após o indivíduo coçar e/ou esfregar a região, introduzindo o parasito na circulação sanguínea (TARTAROTTI *et al.*, 2004).

Os vetores de maior importância para a transmissão da doença de Chagas pertencem aos gêneros *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*, dentre estes estão o *Triatoma infestans*, *Triatoma brasiliensis*, *Triatoma dimidiata*, *Rhodnius prolixus*, *Triatoma pseudomaculata*, *Triatoma sordida*, e *Panstrongylus megistus* (BUSCAGLIA, DI NOIA, 2003; SILVEIRA, 2011).

O vetor primário de transmissão da doença de Chagas é o *Triatoma infestans*, no entanto, em algumas áreas foram observados a sua substituição por vetores autóctones antes considerados secundários, que se mantinham no ambiente peridomiciliar ou que muito raramente eram capturados no interior de habitação (VINHAES, DIAS, 2000).

RESERVATÓRIOS

O agente etiológico da DC passou por uma longa história de adaptação, habitando em diversos nichos ecológicos, em diferentes ecótopos, parasitando centenas de reservatórios silvestres e domésticos, pertencentes a mais de 100 espécies de mamíferos, de oito diferentes

ordens (*Marsupialia*, *Edentada*, *Rodentia*, *Chiroptera*, *Carnivora*, *Primates*, *Lagomorpha*, *Artiodáctia*) nos quais ocorre transmissão entre eles (BRIONES *et al.*, 1999).

Dentre os reservatórios silvestres mais importantes estão o tatu (*Edentada*) e o gambá (*Marsupialia*), enquanto que entre os reservatórios domésticos, destacam-se o cão, o gato (*Carnivora*) e o rato (*Rodentia*), além do próprio homem (BARRETTO, 1979).

Alguns animais silvestres como os quatis, cachorro-do-mato, tatus e morcegos, aproximam-se de casas, compartilhando ambientes com o homem e animais domésticos, servindo como fonte de infecção aos triatomíneos peridomiciliares e intradomiciliares (BRENER *et al.*, 2000).

PARASITO

O agente etiológico da doença de Chagas, *T. cruzi*, pertence ao reino Protista, filo *Euglenozoa*, classe *Kinetoplastidea*, família *Trypanosomatidae*, ordem *Kinetoplastida*, gênero *Trypanosoma* e espécie *Trypanosoma cruzi*. Morfologicamente caracteriza-se por apresentar núcleo central, um flagelo e mitocôndria única, que está localizada no cinetoplasto, organela especializada que contém ácidos nucleicos (DE SOUZA, 2002).

Os parasitos são encontrados em animais vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos) podendo apresentar-se sob as formas amastigotas, epimastigotas, tripomastigotas e, raramente, promastigotas em seus ciclos de vida (HOARES, 1972).

São protozoários classificados em biodemas do tipo I, II e III, os quais correspondem a três zimodemas: zimodema I (linhagem II) e III que se relacionam ao ciclo de transmissão silvestre, enquanto que o zimodema II relaciona-se ao ciclo de transmissão doméstico (MILES *et al.*, 1977; MILES *et al.*, 1978).

Estes biodemas e zimodemas foram ainda inicialmente relacionados às duas linhagens genéticas principais nas quais o *T. cruzi* foi dividido utilizando diferentes metodologias: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999; FREITAS *et al.*, 2006; ZALLOUM *et al.*, 2011). Uma terceira linhagem, denominada *T. cruzi* III, foi ainda descrita e seria equivalente à sublinhagem chamada TCIIC identificada por BRISSE *et al.* (2001), que propuseram cinco subdivisões para *T. cruzi* II, denominadas IIa-e. Um consenso datado de 2009, refere-se ao *T. cruzi* como contendo seis subdivisões denominadas Discrete Typing Units (DTUs), TcI-VI (ZINGALES *et al.*, 2009; ZINGALES *et al.*, 2012).

Os isolados de um determinado hospedeiro, após serem caracterizados em laboratório recebem o nome de cepas (D'ALESSANDRO, 1976). Existem várias cepas

descritas na literatura e que são utilizadas em estudos experimentais. A cepa Y é talvez a mais estudada.

A cepa Y foi isolada de caso agudo humano e caracterizada por Pereira da Silva & Nussenzweig em 1953. Na infecção murina esta cepa apresenta período pré-patente de 3-5 dias (BRENER, GALVÃO, 1981; BORGES *et al.*, 1983; PINTO *et al.*, 1986; DE SOUZA, 2002). A curva de parasitemia observada em camundongos é característica, com pico máximo de parasitos entre o 7º-12º dias após a infecção (MENEZES, 1966; BORGES *et al.*, 1982; PINTO *et al.*, 1999). Esta cepa foi classificada como pertencente ao biodema I, zimodema Z2 e grupo *T. cruzi* II (ANDRADE, 1985; MARTINS *et al.*, 2003).

CICLO BIOLÓGICO

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* alterna em hospedeiros vertebrados (mamíferos) e invertebrados (triatomíneos), onde assume estágios evolutivos diferentes (HOARE, 1972).

No hospedeiro vertebrado o ciclo inicia-se quando o triatomíneo infectado pica o hospedeiro para se alimentar. Após o repasto sanguíneo o vetor defeca na região e as fezes contêm formas metacíclicas de *T. cruzi*, que podem penetrar na região lesada, ou de ferimento ou podem ser levadas a locais de mucosas (olhos, boca, nariz). Nestes locais invadem as células do hospedeiro, preferencialmente macrófagos, onde perdem o flagelo e se transformam em amastigotas, multiplicando-se por divisão binária. Quando as células estão repletas de parasitos eles se transformam em tripomastigotas, levando à ruptura celular e disseminam-se pela corrente sanguínea, sendo capazes de infectar novos tecidos e órgãos.

Os triatomíneos, hospedeiros invertebrados, se infectam ao ingerir sangue contendo as formas tripomastigotas de *T. cruzi* ao sugar o hospedeiro vertebrado infectado (homem, animal doméstico ou silvestre). Estas formas irão se transformar em esferomastigotas e na sequência em epimastigotas no trato digestivo. Em seguida, os parasitos migram para o intestino se multiplicando intensamente. Após duas semanas se transformarão em tripomastigotas metacíclicos no reto, que serão eliminadas junto com as fezes e urina do inseto (BARRETTO, 1979; CHAGAS, 1911).

TRANSMISSÃO

No Brasil, a principal via de transmissão atualmente é a forma oral, podendo ocorrer através de ingestão de alimentos ou líquidos contaminados (ALARCÓN DE NOYA *et al.*, 2010; SANTALLA *et al.*, 2011; BRASIL, 2012a). Entretanto, em diversos países da América

do Sul, a forma vetorial continua sendo uma preocupação para a saúde pública (SCHOFIELD, DIOTAIUTI *et al.*, 1999; SILVEIRA, DIAS, 2011; SARQUISet *al.*, 2012).

A forma congênita é menos frequente, porém ocorre em alguns países endêmicos (BLANCO *et al.*, 2010; CLAVIJO *et al.*, 2012). A transmissão transfusional tornou-se um grande risco de contaminação em países não endêmicos, atribuindo-se à imigração de população de área endêmica para DC o ônus deste risco (BRENER *et al.*, 2000; ASSAL, CORBI, 2011).

Transplantes de órgãos e acidentes laboratoriais são considerados formas excepcionais de transmissão de *T. cruzi* (STEVENSON, MILLER, 1991; CENTER FOR DISEASE CONTROL, 2006).

MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

As manifestações clínicas são a expressão da grande variedade de comprometimento orgânico que pode ser observado na doença de Chagas. Uma das formas de apresentação clínica da DC é a fase aguda com duração média de dois meses. Em 95% dos casos é assintomática ou inaparente, podendo desenvolver febre, mialgia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, anorexia e vômito. É representada por infecção generalizada do *T. cruzi* com abundante parasitemia e formas amastigotas presentes em quase todos os órgãos, com presença de infiltrado inflamatório, principalmente no miocárdio (RASSI *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2006; DIAS, 1984). Pode ser fatal devido à miocardite grave, entretanto são raros os casos onde isto acontece. Na maior parte dos casos a morte ocorre como consequência da insuficiência cardíaca, ou devido à meningoencefalite, ou ainda, por complicações secundárias tais como broncopneumonia (TARLETON, 2003).

As manifestações crônicas ocorrem em aproximadamente 30 a 40% dos casos, podendo ter curso como forma indeterminada, cardíaca, digestiva ou cardio-digestiva, após 10 a 30 anos da infecção inicial (MACEDO, 1999). É característica a redução de parasitemia (RASSI *et al.*, 2010).

As lesões cardíacas ocorrem em 20 a 30 % dos indivíduos (TEIXEIRA, 2006), podendo levar à insuficiência cardíaca progressiva, aneurismas apicais, tromboembolismo e morte súbita em dois terços de doentes. A morte por insuficiência cardíaca refratária pode ocorrer em 25 a 30 % e tromboembolismo em 10 a 15 % (RASSI, RASSI, 2001; COURA, PEREIRA, 2011).

As manifestações digestivas são caracterizadas por disfunções gastrointestinais, através do desenvolvimento de megaesôfago, megacolon ou ambos, afetando de 10 a 15% dos

pacientes infectados (RASSI *et al.*, 2010), iniciando por incoordenação motora (disperistalse) devido ao comprometimento do sistema nervoso autônomo (plexos mioentéricos), afetando diferentes partes do tubo digestivo com repercussão no esôfago e cólon (MAIFRINO *et al.*, 2005).

Nos neonatos infectados a forma assintomática é a mais frequente, seguido pela hepatoesplenomegalia. No entanto, alguns recém-nascidos podem apresentar calcificações cerebrais em 30% dos casos, hipotonia muscular, anemia, icterícia, hiperbilirrubinemia, febre, insuficiência cardíaca, microcefalia, meningoencefalite, crises convulsivas e morte (PEHRSON *et al.*, 1982; MOYA, MORETTI, 1997; SALEME *et al.*, 1971).

Pacientes transplantados, portadores do vírus da imunodeficiência humana (HIV), submetidos a tratamentos antineoplásicos ou qualquer intervenção que venha a suprimir a imunidade de um indivíduo que tenha anticorpo contra o *T. cruzi*, podem sofrer reativação da DC, provocando aumento de tripomastigotas sanguíneos com novas manifestações clínicas (LAMBERT *et al.*, 2006; RASSI *et al.*, 2012).

TRATAMENTO

Os únicos medicamentos já lançados para tratamento etiológico da DC foram o Nifurtimox e o Benznidazol (BZ). Os estudos terapêuticos com o BZ foram iniciados em 1971, demonstrando diminuição da parasitemia em animais infectados, assim como nifurtimox (COURA, CASTRO, 2002). Possuem eficácia na fase aguda da doença, baixo índice curativo e diversos efeitos colaterais, tais como anorexia, náusea, vômito, dor de cabeça, depressão do sistema nervoso central ou sintomas maníacos, vertigem, parestesias, polineuropatias periféricas e dermatites (FERREIRA, 1990; RASSI *et al.*, 2010). O nifurtimox foi retirado de comercialização no Brasil na década de 80, ficando apenas o BZ (BRASIL, 2005).

O Consenso Brasileiro em doença de Chagas recomenda o tratamento com o BZ para pacientes diagnosticados na fase aguda (acidentes laboratoriais, imunossuprimidos, sujeitos a reativação da infecção, infecção congênita) e crônica recente para prevenir complicações da doença (UMEZAWA *et al.*, 2002; URBINA, DOCAMPO, 2003).

As limitações do uso do BZ se atribuem ao seu uso prolongado, por se tratar de um medicamento com efeito parasiticida e reações adversas dose dependente. Por não ser um medicamento considerado ideal para o tratamento da doença de Chagas, diversos pesquisadores vão a finco na busca de novas drogas tripanocidas (RASSI *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2012).

INFECÇÃO EXPERIMENTALE MODELO ANIMAL

A infecção experimental promove mecanismos para retratar a patologia apresentada pelo homem, permitindo a avaliação de mecanismos biológicos, fisiológicos, bioquímicos, imunológicos ou comportamentais e clínicos. Por este motivo, o estudo experimental tem sido amplamente utilizado nos mais diversos modelos animais como coelhos, cães, macacos e camundongos, objetivando estudar a evolução da patologia com a finalidade curativa, testando novas drogas com atividade tripanocidas, tanto para parasitos circulantes no sangue quanto teciduais, assim como avaliando outras formas de intervenção na busca de uma melhor abordagem de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, tentando melhorar a qualidade de vida dos pacientes (COURA, 2003; FERREIRA, FERREIRA, 2003; FAGUNDES, TAHA, 2004; SOARES *et al.*, 2010; MENDES *et al.*, 2011; RODRIGUES *et al.*, 2012).

O camundongo é o animal mais utilizado na pesquisa da doença de Chagas, podendo ser definido por linhagem e cepa, o qual poderá ser infectado pelas diferentes vias de inoculação (intradérmica, intraperitoneal, intraconjuntival ou oral) (ANDRADE *et al.*, 2002; BÁEZ *et al.*, 2008; COURA, PEREIRA, 2012).

O modelo animal ideal para infecção experimental deve atender à capacidade de sobrevivência após a fase aguda, demonstrando condições similares à infecção humana. Devem ser consideradas a quantidade de tripomastigotas inoculadas, a via de inoculação e o tipo de cepa já que estes parâmetros influenciam na patologia da doença, revelando peculiaridades de tropismo tecidual, grau de infecciosidade, curva de parasitemia, mortalidade entre outras características (PINTO *et al.*, 1986; DA MATA *et al.*, 2000; ANDRADE, 1974).

MODELO MURINO

A facilidade de adaptação, porte, manuseio, tempo de gestação curto, possibilidade de análise da infecção crônica em curto período de tempo, semelhanças clínicas, laboratoriais e anátomo-patológicas com o ser humano são alguns dos fatores cruciais para a utilização do modelo murino na infecção experimental pelo *T. cruzi* (ROSSI, MENGEL, 1992; CHORILLI *et al.*, 2007).

A resistência do camundongo à infecção experimental pelo *T. cruzi* pode variar de acordo com a sua linhagem e cepas inoculadas. De um modo geral, as linhagens CBA e B-10 são mais resistentes (ANDRADE *et al.*, 1985a) e as linhagens A/J e AKR são mais sensíveis (ANDRADE *et al.*, 1985b).

A linhagem de camundongo mais utilizada no mundo é o *Swiss* (Suíço). São camundongos albinos que ao passar do tempo tornaram-se geneticamente não homogêneos

(não isogênicos), contribuindo para estudos experimentais, permitindo medições de variabilidade de diversos parâmetros, assemelhando-se à variação genética dos humanos (ANDRADE, 2002). Nos estudos de genética, estima-se uma homologia do DNA codificador entre o camundongo e o homem de 70% a 90% (LAPCHIK *et al.*, 2010).

Apesar da ampla utilização de camundongos em experimentação, a literatura científica é pobre de estudos que avaliem parâmetros clínicos em camundongos infectados pelo *T. cruzi* imprescindíveis em avaliações de novas intervenções medicamentosas (FALKOWSKI *et al.*, 2012).

JUSTIFICATIVA

A doença de Chagas é um problema de saúde mundial matando cerca de 12.000 pessoas a cada ano, sendo a doença parasitária que mais mata nas Américas (WHO, 2012; DNDi, 2012b). A pesquisa desta doença tem sido o objetivo de muitos pesquisadores, a fim de compreender a relação do parasito *versus* hospedeiro no processo da doença. Para estas pesquisas, o modelo murino tem sido a principal escolha como modelo animal nos experimentos pela facilidade de obtenção, manutenção e pequeno porte. Os camundongos são utilizados para estudos de diversos parâmetros relacionados a esta interação, tais como o comportamento biológico de cepas do *T. cruzi*, eficácia de várias substâncias utilizadas na terapia específica contra o parasito, resposta imunológica, entre outros (ANDRADE *et al.*, 1985c; ROTTENBERG *et al.*, 1988; GAMBINO, OTERO, 2012).

A cepa Y do *T. cruzi* é considerada uma cepa de referência, devido a sua ampla utilização em modelo experimental murino (COURA, 2003). Esta cepa apresenta características bem definidas nos camundongos como, por exemplo, elevado pico de parasitemia dos sete aos doze dias de infecção e taxa de mortalidade de 100% (BRENER, 1962; PINTO *et al.*, 1986).

Em camundongos, a infecção pelo *T. cruzi* desenvolve-se de forma diferente da observada em humanos. Nestes animais, a fase aguda da infecção é caracterizada por alta parasitemia, grande disseminação do parasito e imunossupressão, culminando em morte (MINOPRIO *et al.*, 1989). No entanto permite mecanismos que retratam a patologia apresentada pelo homem, permitindo a avaliação de mecanismos biológicos, fisiológicos, bioquímicos, imunológicos e comportamentais (COURA, 2003).

O meio científico é pobre em estudos padronizando métodos de avaliações clínicas em camundongos infectados pelo *T. cruzi*. Alguns trabalhos existentes possuem metodologias dispersas e muitos ainda possuem falhas metodológicas para validação dos resultados.

Algumas das formas para validar as avaliações experimentais são através da realização de estudos controlados, cegos e randomizados por sorteio, com um número apropriado de animais, de modo que haja diferença estatística entre as análises de animais infectados pelo *T. cruzi* e sadios (FALKOWSKI *et al.*, 2012; SCHNEIDER *et al.*, 2006), justificando assim a realização de um trabalho que reúna metodologias adequadas e execuções práticas durante a rotina laboratorial, e apresentação de um protocolo de estudo de características clínicas de camundongos comparando animais infectados e sadios, permitindo análise de mudanças clínicas sutis em intervenções de substâncias candidatas ao tratamento da infecção por *T. cruzi*.

OBJETIVOS

GERAL

Estabelecer alguns parâmetros clínicos para a diferenciação da clínica entre camundongos sadios e infectados pelo *Trypanosoma cruzi*.

ESPECÍFICOS

Avaliar parâmetros clínicos qualitativos e quantitativos em camundongos infectados pelo *T. cruzi* e sadios;

Apresentar metodologias adequadas para avaliações clínicas;

Apresentar problemáticas dos procedimentos para avaliações clínicas;

Discutir eficiência de parâmetros na diferenciação clínica de camundongos infectados pelo *T. cruzi* e sadios.

REFERÊNCIAS

ADLER S. Darwin's Illness. **British Medical Journal**, v. 1, p.1249-1250, 1965.

ALARCÓN DE NOYA, B.; DÍAZ-BELLO, Z.; COLMENARES, C.; RUIZ-GUEVARA, R.; MAURIELLO, L.; ZAVALA-JASPE, R.; SUÁREZ, J.A.; ABATE, T.; NARANJO, L.; PAIVA, M.; RIVAS, L.; CASTRO, J.; MÁRQUES, J.; MENDOZA, I.; ACQUATELLA, H.; TORRES, J.; NOYA O. Large urban outbreak of orally-acquired acute Chagas disease, at a school in Caracas, Venezuela. **Journal of Infectious Diseases**, v. 201, p.1308-1315, 2010.

ANDRADE, A. **Animais de Laboratório: criação e experimentação**. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2002.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Experimental Parasitology**, v. 100, p.269-275, 2002.

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

ANDRADE, V.; BARRAL-NETTO, M.; ANDRADE, S.G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 18, p.499-506, 1985a.

ANDRADE, V.; ANDRADE, S.G.; BARRAL-NETTO, M.; PONTES, A.L.; CASTRO, R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 18, p.143-154, 1985b.

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

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do recôncavo baiano, **Revista de Patologia Tropical**, v. 3 p.65–121, 1974.

ANONYMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p.429-32, 1999.

ARAÚJO, A.; JANSEN, A.M.; REINHARD, K.; FERREIRA, L.F. Paleoparasitology of Chagas disease - A Review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro**, v. 104, p.9-16, 2009.

ASSAL, A.; CORBI, C. Maladie de Chagas et transfusionsanguine: un problème parasitaire émergent dans les pays non endémiques. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 18, p.286-291, 2011.

AUFDERHEIDE, A.C.; SALO, W.; MADDEN, M.; STREITZ, J.; BUIKSTRA, J.; GUHL, F.; ARRIAZA, B.; RENIER, C.; WITTMERS JR, L.E.; FORNACIARI, G.; ALLISON, M. A 9,000 year record of Chagas' disease. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, p.2034–2039, p.2004.

BÁEZ, A.L.; LO PRESTI, M.S.; RIVAROLA, H.W.; PONS, P.; FRETES, R.; PAGLINI-OLIVA, P. *Trypanosoma cruzi*: Cardiac mitochondrial alterations produced by different strains in the acute phase of the infection. **Experimental Parasitology**, v. 120, p.397-402, 2008.

BALCZUN, C.; MEISER, C.K.; SCHAUB, G.A. Arthropods as Vectors of Emerging Diseases: Triatomines as Vectors of American Trypanosomiasis. **Parasitology Research Monographs**, v.3, p.275, 2012.

BARRETTO, M.P. Epidemiologia. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z (Eds.). *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

BLANCO, S.; SEGURA, E.; CURA, E.; CHUIT, R.; TULIAN, L.; FLORES, I.; GARBARINO, G.; VILLALONGA, F. Y GURTLER, R. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi*: an operational outline for detecting and treating infected infants in North-Western Argentina. **Tropical Medicine & International Health**, v. 5, p.293-301, 2000.

BORGES, M.M.; MELLO, D.A.; TEIXEIRA, M.L. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia, Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 16, p.233-42, 1982.

BORGES, M.M.; MELLO, D.A.; TEIXEIRA, M.L.; DA SILVA, J.D.B. Estudo experimental de *Zygodontomyia miamiensis* (rodentia-cricetidae) com cepas de *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v.17, p.387-393, 1983.

BRASIL. Ministério da Saúde. Doença de Chagas: Situação epidemiológica. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=31454>. Acesso em: 27 set. 2012a.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Saúde do Estado do Espírito Santo. Notícias, 09 abr. 2012. Disponível em: <<http://www.saude.es.gov.br/default.asp>>. Acesso em: 09 out. 2012b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Plano Nacional de Saúde – PNS – 2012-2012. Série B. Textos básicos de Saúde. Brasília-DF, 2011. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_nacional_saude_2012_2015.pdf>. Acesso em: 27 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria da Saúde do Estado de Tocantins. Nota técnica nº 001/2009, de 03 de junho de 2009a. SESAU-TO/SVPS/DVE/CDVZ/GNDC. Aspectos clínicos e epidemiológicos da doença de Chagas. Disponível em: <http://www.saude.to.gov.br/downloads/Seo%20de%20Downloads/Ncleo%20Tcnico%20da%20Doena%20de%20Chagas/Notas%20Tcnicas/nota_tecnica_n001.pdf>. Acesso em: 27 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Vigilância em Saúde: Zoonoses. 2009b. Série B. Textos Básicos de Saúde – Cadernos de Atenção Básica, n.22. Disponível em: <<http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/abcad22.pdf>>. Acesso em: 27 set. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Funasa – Fundação Nacional de Saúde - PORTARIA Nº 202, DE 17 DE FEVEREIRO DE 2009c. Disponível em: <http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/funasa/2009/prt0202_17_02_2009.html>. Acesso em 09 de setembro de 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Notícias: Brasil elimina transmissão da doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, 2006. Disponível em: <http://portal.saude.gov.br/portal/aplicacoes/noticias/noticias_detalhe.cfm?co_seq_noticia=27557>. Acesso em: 10 out. 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brazilian consensus on Chagas disease. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 38, p.7-29, 2005.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. 2. ed. Rio do Janeiro: Guanabara-Koogan; 2000.

BRENER, Z.; GALVÃO, L.M.C. Criopreservação de formas de cultura do *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 76, p.247-257, 1981.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 9, p.233-238, 1962.

BRIONES, M.R.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 104, p. 219-232, 1999.

BRISSE, S.; VERHOEF, J.; TIBAYRENC, M. Characterization of large and small subunit rRNA and mini-exon genes further supports the distinction of six *Trypanosoma cruzi* lineages. **International Journal for Parasitology**, v. 31, p.1218-1226, 2001.

BUSCAGLIA, C.A.; DI NOIA, J.M. *Trypanosoma cruzi* clonal diversity and the epidemiology of Chagas' disease. **Microbes and Infection**, v. 5, p.419-427, 2003.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL. Chagas disease after organ transplantation - Los Angeles, California, 2006. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 55, p.798-800, 2006.

CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem; resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 3, p.219-275, 1911.

CHAGAS, C. Nova entidade morbida do homem. **Brazil Médico**, v. 24, p.423-428, 1910.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., Agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz do Rio de Janeiro**, v.1, p. 159-218, 1909.

CHAGAS FILHO, C. Meu pai. Casa de Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1993, p.82.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D. C.; SALGADO, H. R. N. Animais de laboratório: o camundongo. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.28, p.11-23, 2007.

CLAVIJO, N.A.S.; POSTIGO, J.R.; SCHNEIDER, D.; SANTALLA, J.A.; BRUTUS, L.; CHIPPAUX, J.P. Prevalence of Chagas disease in pregnant women and incidence of congenital transmission in Santa Cruz de la Sierra, Bolivia. **Acta Tropica**, v. 124, p.87- 91, 2012.

COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Chagas disease: What is known and what should be improved: a systemic review. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 45, p.286-296, 2012.

COURA, J.R.; PEREIRA, J.B. Chronic phase of Chagas disease: why should it be treated? A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, p.641-645, 2011.

COURA, J.R. Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**, v.5 5. p.1-7, 2003.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A Critical Review on Chagas Disease Chemotherapy. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, p.324, 2002.

D’ALESSANDRO, A. Biology of *Trypanosoma (Herpetosoma) rangeli* Tejera, 1920. In: LUMSDEN, W.H.R.; EVANS, D.A. (Eds.). *Biology of Kinetoplastida*, Academic Press, London, 1976.vol. 1, p.237-403.

DA MATA, J.R.; CAMARGOS, M.R.; CHIARI, E.; MACHADO, C.R. *Trypanosoma cruzi* infection and the rat central nervous system: Proliferation of parasites in astrocytes and the brain reaction to parasitism, **Brain Research Bulletin**, v. 53, p.153-162, 2000.

DARWIN, C. *The Voyage of the Beagle*. Nova York: Dent-Dutton; 1979, p. 316.

DE OLIVEIRA, J.F.; CASTILHO, B.A.; SFORÇA, M.L.; KRIEGER, M.A.; ZERI, A.C.; GUIMARÃES, B.G.; ZANCHIN, N.I. Characterization of the *Trypanosoma cruzi* ortholog of the SBDS protein reveals an intrinsically disordered extended C-terminal region showing RNA-interacting activity. **Biochimie**, v. 91, p.475-483, 2009.

DE SOUZA, W. Basic cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Current Pharmaceutical Design**, v. 8, p.269–285, 2002.

DIAS, J.C.P. Acute Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p.85-89, 1984.

DIAS, L.C.; DESSOY, M.A. Quimioterapia da doença de Chagas: Estado da arte e perspectivas no desenvolvimento de novos fármacos. **Química Nova**, v. 32, p.2444-2457, 2009.

DNDi. Doenças negligenciadas / Doença de Chagas, 2012. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas/doenca-de-chagas.htm>>. Acesso em: 26 set. 2012a.

DNDi (Drugs for Neglected Diseases *initiative*): DNDi recebe Prêmio de 2 milhões de euros da Wellcome Trust para desenvolver nova droga contra a doença de Chagas. Disponível em: <<http://www.dndi.org.br/pt/centro-de-documentacao/comunicados-de-imprensa/310-12-03-2012-dndi-wellcome-trust.htm>>. Acesso em: 30 de jul. 2012b.

ELIZARI, M.V. La miocardiopatía chagásica perspectiva histórica. In: Simpósio Internacional. Academia Nacional de Medicina. Buenos Aires, 19-20 de abril de 1999. **Medicina (Buenos Aires)**, v. 59, p.25-40, 1999.

EVANS, A.S. The eradication of communicable diseases: myth or reality? **American Journal of Epidemiology. Reviews and Commentary**, v. 122, p.199-207, 1985.

FAGUNDES, D.J.; TAHA, M.O. Modelo animal de doença: critérios de escolha e espécies de animais de uso corrente. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 19, p.59-65, 2004.

FALKOWSKI, G.J.S.; SANDRI, P.F.; TIYO, R.; ALEIXO, D.L.; ARAÚJO, S.M. Parameters for evaluation of clinical trial in mice infected by *Trypanosoma cruzi*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 64, p.1539-1546, 2012.

FERNANDES, A.; IÑIGUEZ, A.M.; LIMA, V.S.; DE SOUZA, S.M.F.M.; FERREIRA, L.F.; VICENTE, A.C.P.; JANSEN, A.M. Pre-Columbian Chagas disease in Brazil: *Trypanosoma cruzi* I in the archaeological remains of a human in Peruaçu Valley, Minas Gerais, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, p.514-516, 2008.

FERREIRA, L.M.; FERREIRA, L.R.K. Experimental model: historic and conceptual revision. **Acta Cirúrgica Brasileira**, v. 18, p.1-3, 2003.

FERREIRA, H.O. Tratamento da forma indeterminada da doença de Chagas com nifurtimox e benznidazol. **Revista de Medicina Tropical**, v. 23, p.209-211, 1990.

FREITAS, J.M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA J.R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONÇALVES, V.F.; TEIXEIRA, S.M.R.; CHIARI, E.; JUNQUEIRA, A.C.V.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M. MACHADO, C.R.; PENA, S.D.J. Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathogens**, v.2, n.3, p.e24, 2006.

GAMBINO, D.; OTERO, L. Perspectives on what ruthenium-based compounds could offer in the development of potential antiparasitic drugs. **Inorganica Chimica Acta**, v. 393, p.103-114, 2012.

GUERRI-GUTTENBERG, R.A.; CIANNAMEO, A.; DI GIROLAMO, C.; MILEI, J.J. Chagas disease: an emerging public health problem in Italy? **Le Infezione in Medicina**, v. 17, p.5-13, 2009.

HOARE, C.A. **The trypanosomes of mammals: a zoological monograph.** Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1972.

LAMBERT, N.; MEHTA, B.; WALTERS, R.; ERON, J.J. Chagasic encephalitis as the initial manifestation of AIDS. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p.941-943, 2006.

LAPCHIK, V.B.V.; MATTARAIA, V.G.M.; KO, G.M. Cuidado e manejo de animais de laboratório. In: KO, MG; DE LUCA, RR. (Eds.). *Camundongo*, Rio de Janeiro: Atheneu, 2010. p.138.

LARREA, S.C.V.; ALONSO, G.D.; SCHLESINGER, M.; TORRES, H.N.; FLAWIÁ, M.M.; FERNÁNDEZ, V.S.H. Poly(ADP-ribose) polymerase plays a differential role in DNA damage-response and cell death pathways in *Trypanosoma cruzi*. **International Journal of Parasitology**, v. 41, p.405-416, 2011.

LENT, H. Evolução dos conhecimentos sobre vetores da doença de Chagas 90 anos após sua descoberta. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p.89-92, 1999.

LENT, H.; WYGODZINSKY, P.W. Revision of the Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), and their significance as vectors of Chagas' disease. **Bulletin of American Museum of Natural History**, v. 163, p.123-520, 1979.

MACEDO, V. Indeterminate form of Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 4, p.311-316, 1999.

MAIFRINO, L.B.M.; AMARAL, S.O.N.; WATANABE, I.; LIBERTI, E.A.; ZOUSA, R.R. *Trypanosoma cruzi*: Preliminary investigation of NADH-positive and somatostatin-immunoreactive neurons in the myenteric plexus of the mouse colon during the infection. **Experimental Parasitology**, v. 111, p.224-229, 2005.

MALAFAIA, G.; RODRIGUES, A.S.L. Centenário do descobrimento da doença de Chagas: desafios e perspectivas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, p.483-485, 2010.

MARTINS, L.P.A.; CASTANHO, R.E.P.; DA ROSA, J.A.; DA SILVA, L.C.; GODOY, C.A.P.; ROSA, R.M. Caracterização biológica, histopatológica e análise de ácido nucléico de uma cepa *Trypanosoma cruzi* da região de Marília, SP. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, p.35-9, 2003.

MENDES, M.F.A.; WANIA, L.; NOGUEIRA, G.A.; WILSON, A.; ARAÚJO, S.M.; GOMES, M.L. Exercício físico aeróbico em mulheres com doença de Chagas. **Fisioterapia em Movimento**, v. 24, p.591-601, 2011.

MENEZES, H. O emprego da 4'-(4-[3-(dimetil amino) propil]-1-piperazinil) acetanilida na fase aguda da moléstia de Chagas experimental do camundongo. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 8, p.299-304, 1966.

MILES, M.A.; TOYÉ, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strains groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Transaction Royal Society Tropical Medicine and Hygiene**, v. 71, p.217-225, 1977.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SAHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P.J. Isoenzymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p.819-821, 1978.

MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunology Review**, v. 112, p.183-207, 1989.

MORENO, E.A.; RAMÍREZ, M.; ALARCÓN, M.E.; LUGO, A.Y.; VILLARREAL, J.; ARAUJO, S.; MOGOLLÓN, N.; GONZÁLEZ, A.; PREMOLI, G. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in second generation Wistar rats. **Boletín de Malariología y Salud Ambiental**, v.50, p.29-38, 2010.

MOYA, P.; MORETTI, E. Doença de Chagas Congênita. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. (Eds). Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico Geral. Rio de Janeiro: Fiocruz. 1997. p.383-410.

MUÑOZ, J.; GÓMEZ, J.P.; GÁLLEGO, M.; GIMENO, F.; TREVIÑO, B.; LÓPEZ-CHEJADE, P.; RIBERA, O.; MOLINA, L.; SANZ, S.; PINAZO, M.J.; RIERA, C.; POSADA, E.J.; SANZ, G.; PORTÚS, M.; GASCON, J. Clinical profile of *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic setting: immigration and Chagas disease in Barcelona (Spain). **Acta Tropica**, v. 111, p.51-55, 2009.

PEREIRA, K.S.; SCHMIDT, F.L.; BARBOSA, R.L.; GUARALDO, A.M.; FRANCO, R.M.; DIAS, V.L.; PASSOS, L.A. Transmission of Chagas Disease (American Trypanosomiasis) by food. **Advances in Food and Nutrition Research**, v. 59, p.63-85, 2010.

PEHRSON, P.; WALHGREN, M.; BENGTSSON, N. Intracranial calcification probably due to congenital Chagas' disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 3; p.449, 1982.

PINTO, F.H.; RIBEIRO, R.D.; BELDA NETO, F.M.; PRADO JR, J.C. Estudo comparativo da infecção de camundongos, através da inoculação subcutânea e intraperitoneal, utilizando-se duas cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Saúde Pública**, v. 20, p.133-40, 1986.

PINTO, P.L.S.; TAKAMI, R.; NUNES, E.V.; GUILHERME, C.S., OLIVEIRA JR, O.C.; GAMA-RODRIGUES, J.; OKUMURA, M. Life cycle of *Trypanosoma cruzi* (y strain) in mice. **Revista do Hospital das Clínicas**, v.54, p.141-46, 1999.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; REZENDE, J.M. American Trypanosomiasis (Chagas Disease). **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, p.275-291, 2012.

RASSI JR, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J.A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p.1388-1402, 2010.

RASSI JR, A.; RASSI, S.G.; RASSI, A. Sudden death in Chagas' disease. **Arquivo Brasileiro de Cardiologia**, v. 76, p.75-96, 2001.

RODRIGUES, R.F.; CASTRO-PINTO, D.; ECHEVARRIA, A.; DOS REIS, C.M.; DEL CISTIA, C.N.; SANT'ANNA, C.M.; TEIXEIRA, F.; CASTRO, H.; CANTO-CAVALHEIRO, M.; LEON, L.L.; TOMÁS, A. Investigation of trypanothione reductase

inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p.1760-1766, 2012.

ROSSI, M.A.; MENGEL, J.O. The pathogenesis of chronic Chagas' myocarditis: the role of autoimmune and vascular factors. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 593-599, 1992.

ROTTENBERG, M.E.; CARDONI, R.L.; TITTO, E.H.; MORENO, M.; SEGURA, E.L. *Trypanosoma cruzi* immune response in mice immunized with parasite antigens. **Experimental Parasitology**, v. 65, p.101-108, 1988.

SALEME, A.; YANICELLI, G.; IÑIGO, L. Enfermedad de Chagas-Mazzaen Tucumán. **Archivos Argentinos de Pediatría**, v. 69, p.162, 1971.

SALGADO, J.A. O cenário de Carlos Chagas e a menina Berenice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 75, p.193-195, 1980.

SANTALLA, V.J.; OPORTO, C.P.; ESPINOZA, E.; RÍOS, T.; BRUTUS, L. Primer brote reportado de la enfermedad de Chagas en la Amazonía Boliviana: reporte de 14 casos agudos por transmisión oral de *Trypanosoma cruzi* en Guayaramerín, Beni-Bolivia. **Biofarbo**, v. 19, p.52-58, 2011.

SARQUIS, O.; CARVALHO-COSTA, F.A.; TOMA, H.K.; GEORG, I.; BURGOA, M.R.; LIMA, M.M. Eco-epidemiology of Chagas disease in northeastern Brazil: *Triatoma brasiliensis*, *T. pseudomaculata* and *Rhodnius nasutus* in theylvatic, peridomestic and domestic environments. **Parasitology Research**, v. 110, p.1481-1485, 2012.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem. **Acta Tropica**, v. 115, p.14-21, 2010.

SCHNEIDER, I.; TIRSCH, W.S.; FAUS-KEBLER, T.; BECKER, L.; KLING, E.; BUSSE, R.L.A.; BENDER, A.; FEDDERSEN, B.; TRITSCHLER, J.; FUCHS, H.; GAILUS-DURNER, V.; ENGLMEIER, K.H.; DE ANGELIS, M.H.; KLOPSTOCK, T. Systematic,

standardized and comprehensive neurological phenotyping of inbred mice strains in the German Mouse Clinic. **Journal of Neuroscience Methods**, v. 157, p.82-90, 2006.

SCHOFIELD, C.J.; DIOTAIUTI, L.; DUJARDIN, J.P. The process of domestication in Triatominae. **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p.375-378, 1999.

SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica Biologia São Paulo**, v. 20, p.191-201, 1953.

SILVEIRA, A.C.; DIAS, J.C. The control of vectorial transmission. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 44, p.52-63, 2011.

SILVEIRA, A.C. Entomological survey (1975–1983). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, vol. 44, p.26-32, 2011.

SOARES, C.S.; OCCHI, R.C.; CARVALHO, L.G.L.; FRANZÓI-DE-MORAES, S.M.; DALALIO, M.O.; ARAUJO, S.M. Produção de fator de necrose tumoral-alfa e peróxido de hidrogênio na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos submetidos ao exercício. **Acta Scientiarum. Health Sciences**, v. 32, p.57-60, 2010.

SOUZA, V.A.; NAKAMURA, C.V.; CORRÊA, A.G. Atividade Antichagásica de Lignanas e Neolignanas. **Revista Virtual de Química**, v.4, p.197-207, 2012.

STEVENSON, L.W.; MILLER, L.W. Cardiac transplantation as therapy for heart failure. **Current Problems in Cardiology**, v. 16, p.217-305, 1991.

TARLETON, R. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends in Parasitology**, v. 19, p.447-451, 2003.

TARTAROTTI, E.; AZEREDO-OLIVEIRA, M.T.V.; CERON, C.R. Problemática vetorial da Doença de Chagas. **Arquivos de Ciências da Saúde**, v. 11, p.44-47, 2004.

TEIXEIRA, A.R.L.; NITZ, N.; GUIMARO, M.C.; GOMES, C.; SANTOS- BUCH, C.A. Chagas disease. **Postgraduate Medical Journal**, v. 82, p.788-798, 2006.

TIBAYRENC, M.; TELLERIA, J. American Trypanosomiasis: Chagas disease one hundred years of research. In: DE LANA, M.; MACHADO, E.M.M. (Coord.). *Biology of Trypanosoma cruzi and Biological diversity*. Elsevier, 2010. p. 339-363.

TROUILLER, P.; OLLIARO, P.; TORREELE, E.; ORBINSKI, J.; LAING, R.; FORD, N. Drug development for neglected diseases: a deficient market and a public-health policy failure. **The Lancet**, v. 359, p.2188-2194, 2002.

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

UMEZAWA, E.S.; STOLF, A.M.S.; CORBETT, C.E.P.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. Chagas' Disease. **The Lancet**, v. 359, p.627, 2002.

VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. Doença de Chagas no Brasil. **Caderno de Saúde Pública**, v.16, p.7-12, 2000.

WHO. World Health Organization. Enfermedad de Chagas (Trypanosomiasis Americana). Disponível em: <http://www.who.int/topics/chagas_disease/en/>. Acesso em: 21 set.2012.

WHO. World Health Organization. Sixty-third World Health Assembly. Chagas disease: control and elimination. 2010. Disponível em: <http://apps.who.int/gb/ebwha/pdf_files/WHA63/A63_17-en.pdf>. Acesso em: 12 set. 2012.

WORLD BANK. Global burden of disease and risk factors. In: LOPEZ, A.D.; MATHERS, C.D.; EZZATI, M.; JAMISON, D.T.; MURRAY, C.J.L. (Eds). The World Bank. Oxford: University Press, 2006. p.144-228.

ZALLOUM, L.; LALA, E.R.P.; MOREIRA, N.M.; SILVEIRA, T.G.V.; DALALIO, M.O.; TOLEDO, M.J.O.; GOMES, M.L.; ARAÚJO, S.M. Induction of phagocytic activity and nitric-oxide production in natural populations of *Trypanosoma cruzi* I and II from the state of

Paraná, Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 53, p.247-253, 2011.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S.G.; BRIONES, M.R.S.; CAMPBELL, D.A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A.M.; MACHADO, C.R.; MILES, M.A.; ROMANHA, A.J.; STURM, N.R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A.G. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclatura: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, p.1051-1054, 2009.

ZINGALES, B.; MILES, M.A.; CAMPBELL, D.A.; TIBAYRENC, M.; MACEDO, A.M.; TEIXEIRA, M.M.; SCHIJMAN, A.G.; LLEWELLYN, M.S.; LAGES-SILVA, E.; MACHADO, C.R.; ANDRADE, S.G.; STURM, N.R. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclatura: rationale, epidemiological relevance and research applications. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 12, p.240-253, 2012.

CAPÍTULO II

Artigo 1: “Parâmetros para avaliação clínica em camundongos infectados por
Trypanosoma cruzi”

Parâmetros para avaliação clínica em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*

Gislaine J. S. Falkowski^{1*}, Patrícia F. Sandri², Rogério Tiyo¹, Denise L. Aleixo², Silvana M. de Araújo²

¹ Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, ² Departamento de Ciências Básicas da Saúde – Parasitologia Universidade Estadual de Maringá, Maringá, PR.

Endereço para correspondência: Universidade Estadual de Maringá. Departamento de Análises Clínicas (DAC) – Av. Colombo 5790 CEP 87020-900, Maringá, Paraná, Brasil

RESUMO

Em camundongos suíços, machos de 8 semanas, infectados ou não pela cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, avaliou-se a eficiência de parâmetros clínicos quantitativos e qualitativos em dias não consecutivos nos períodos 7^o-11^o e 15^o-18^o dias de infecção. Observou-se diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos (infectados ou sadios), nos dois períodos para os parâmetros: consumo de água, circunferência abdominal e peso. Apenas no segundo período: quantidade de excretas, temperatura corporal, movimento-levantar e mortalidade. O consumo de água, ração, produção de excretas, característica das fezes, temperatura corporal, circunferência abdominal, movimento-levantar, peso e mortalidade, são parâmetros fáceis de serem medidos e eficientes na diferenciação da clínica de camundongos sadios e infectados pelo *T. cruzi*.

Palavras-chave: análise clínica, doença de Chagas, infecção experimental, *Trypanosoma cruzi*.

INTRODUÇÃO

A utilização de animais como modelos experimentais para o estudo de infecções é amplamente difundida em todo o mundo nos diversos campos de pesquisa e a qualidade de um modelo animal está ligada à sua capacidade de reproduzir parâmetros que possibilitem uma possível extrapolação dos resultados para a espécie humana (Chorilli et al., 2007). O modelo de infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* utilizando o camundongo suíço, não isogênico, é muito comum e permite o estudo de uma grande variedade de parâmetros que são observados também na infecção humana (Araújo-Jorge, 2000). Este modelo conta com número importante de dados publicados que poderão contribuir sobremaneira para o crescimento e fortalecimento da pesquisa experimental que tenha por objetivo avaliar mecanismos de atuação de novas drogas, fenômenos fisiopatogênicos, entre outros.

Até quanto nos foi possível pesquisar, não existe trabalho que reúna em uma única publicação, a relação e avaliação da qualidade de parâmetros clínicos e metodologia para sua mensuração, em camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

Desta forma, o objetivo deste trabalho é listar, apresentar metodologia de mensuração e avaliar a qualidade de parâmetros utilizados para comparar clinicamente camundongos sadios e infectados pelo *T. cruzi*.

MATERIAIS E MÉTODOS

Animais: Foram utilizados 34 camundongos, suíços, machos, com oito semanas de idade, oriundos do Biotério Central da Universidade Estadual de Maringá (UEM), divididos em dois grupos experimentais: Grupo Infectado (GI) e Grupo Sadio (GS). Em cada grupo foram sorteados 5 animais para a avaliação clínica. Os grupos foram divididos de modo que as médias dos pesos dos camundongos de cada grupo fossem estatisticamente iguais.

O experimento foi conduzido como ensaio cego, controlado e randomizado por sorteio. Os animais foram distribuídos em gaiola convencional de polipropileno com dimensão de 30x20x13cm, com tampa de metal contendo divisórias para ração e água (Modelo GC 111 - Beiramar[®]). O piso da gaiola (forração ou cama) foi coberto por uma camada de esmectita natural (Cat Plus – Distribuidor Embramil), pela sua alta capacidade de adsorção. Foram realizadas duas repetições e apresentado o resultado de uma delas.

Os animais foram mantidos no Biotério Setorial do Laboratório de Parasitologia (UEM), onde permaneceram por 7 dias para período de adaptação antes do início do experimento, em ambiente com temperatura $22 \pm 1^{\circ}\text{C}$, umidade (70%) e iluminação controladas, com ciclo claro e escuro de 12 horas (Canadian Council on Animal Care, 1993).

Durante todo o período foi oferecido ração e água *ad libitum*. A ração, peletizada (Nuvilab CR1®), foi colocada em comedouro convencional, situado na tampa da gaiola, com o cuidado de não colocar *pellets* quebrados, evitando a sua perda. A água foi colocada em bebedouro, encaixado em furo situado na tampa da gaiola. Para evitar o vazamento da água dos bebedouros, foi colocado água em sua capacidade máxima total e a cada dia foi trocado o bebedouro para evitar a contaminação por microorganismo.

Após o período de adaptação, os animais foram inoculados com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, via intraperitoneal. A parasitemia foi determinada com contagem de parasitos diariamente, a partir do 4º dia de infecção utilizando a técnica de Brener (Brener, 1962). A curva de parasitemia foi determinada pela média do número de parasitos em cada animal, para cada dia.

Os animais foram submetidos a avaliações de parâmetros clínicos em cinco e quatro dias consecutivos, em dois períodos distintos, respectivamente: do 7º ao 11º dia após a infecção (referente ao pico de parasitemia), e do 15º ao 18º dia após a infecção (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953), em horário fixo às 09h e 00min (Perez; Lebras; Fidenne, 1995). Foram avaliados parâmetros quantitativos e qualitativos. Entre os parâmetros quantitativos foram avaliados peso (g), consumo de água (mL/animal) e ração (g/animal), eliminação de dejetos (g/grupo), movimentos exploratórios de auto-limpeza e levantar observados durante 3min (Eilam, 2003), temperatura corporal (°C), circunferência abdominal (cm) e mortalidade (%).

Os parâmetros peso, consumo de ração e excreta de fezes com urina foram avaliados pela pesagem em balança eletrônica semi-analítica (BEL engineering – Classe II Mark 500g). A medição do peso de excretas foi feita pela pesagem da forração das gaiolas após o uso, subtraído do peso inicial.

O parâmetro movimentação foi avaliado pela observação do número de movimentos de exploração (levantar e auto-limpeza) que cada animal realizou durante o período de três minutos.

A temperatura foi medida na região anterior da coxa traseira esquerda, utilizando termômetro digital infravermelho (Icel, modelo TD-920.0387) expressa em graus centígrados. A circunferência abdominal foi avaliada com o auxílio de fio medido em régua e expressa em milímetro. O parâmetro mortalidade foi avaliado diariamente e expresso em percentagem cumulativa do período.

Entre os parâmetros qualitativos foram avaliados o aspecto das fezes, do pêlo e da pele, a cor dos olhos e ocorrência de isolamento. A avaliação foi realizada utilizando

categorias definidas numericamente. O aspecto das fezes foi categorizado segundo a consistência em: 1 - formadas/*pellets*, 2 - pastosas e 3 - diarréicas. O parâmetro aspecto do pêlo foi avaliado como: 1 - não eriçado e 2- eriçado. O parâmetro aspecto da pele foi avaliado observando-se a coloração de patas e cauda: 1- rósea 2 - branca pálida e 3 - arroxeadas. O parâmetro aspecto dos olhos foi avaliado segundo os critérios coloração: 1 - vermelho brilhante e 2 - vermelho opaco. O parâmetro ocorrência de isolamento foi avaliado considerando: 1 – ausência de isolamento e 2 - presença de isolamento.

Os dados obtidos pela análise dos parâmetros clínicos foram comparados estatisticamente (*t student* comparação de proporções) utilizando o programa Statistica 7.0 com significância de 5%. O protocolo de experimentação foi submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal (CEEA) sob o parecer nº 030/2008.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A figura 1 mostra a curva de parasitemia obtida para uma das repetições realizadas. O perfil obtido é característico para a cepa Y do *T. cruzi*, com pico de parasitos no oitavo dia de infecção. A variação da parasitemia entre os animais é grande ficando em torno de 30 % da parasitemia média em cada ponto, resultado que é também característico e descrito na literatura (Pereira da Silva & Nussensweig, 1953). Esta cepa é altamente virulenta para a linhagem de camundongos suíços, produzindo comprometimento crescente da saúde dos animais, com mortalidade de todos os animais infectados em até 20 dias após a infecção com o inóculo utilizado (Tibayrenc e Telleria, 2010).

Na análise dos parâmetros quantitativos, foram observadas diferenças significativas entre os grupos, nos dois períodos para consumo de água, circunferência abdominal e peso (tabela 1), mostrando que estes são bons parâmetros na avaliação de animais infectados e saudáveis, confirmados em experimentos de repetições. Vale a pena ressaltar que cinco animais de cada grupo foram escolhidos por sorteio para avaliação clínica. Estes resultados corroboram com as exigências éticas no quesito da diminuição do número de animais por experimento. No consumo de água, os animais saudáveis ($13,3 \pm 0,239$; $12,4 \pm 0,269$) apresentaram um consumo maior e mais homogêneo ao longo dos dois períodos de avaliação, enquanto os animais infectados ($8,5 \pm 0,343$; $4,8 \pm 0,291$) apresentam consumo extremamente variável (figura 2) de acordo com o período da infecção, o que reflete o estado de saúde individual de cada animal, expresso no consumo do grupo. Como foi trabalhada a média, esta oscilação certamente está relacionada à variação no consumo individual dos animais, que adoecem diferentemente ao longo do período de observação (figura 2) (Araújo e Chiari, 1996; Pupulim

et al., 2010). No segundo momento, a medição se faz em um período de alta morbidade, a partir de quando os animais iniciam uma tentativa de reação à infecção (Brenner, 1962; Tibayrenc e Telleria, 2010) que tem como consequência a ingestão de maior volume de água (figura 2) (Richter e Brailey, 1929).

A circunferência abdominal (GS: $11,6 \pm 0,170$; $11,2 \pm 0,238$; GI: $10,7 \pm 0,303$; $10,5 \pm 0,254$) mostrou ser um ótimo parâmetro na diferenciação dos grupos comparados (tabela 1). Com este parâmetro a diferenciação entre os grupos GS e GI ocorre porque em um primeiro momento o processo de infecção é instalado nos camundongos, deixando-os debilitados, caquéticos, apresentando edema generalizado pela ação da regulação da concentração de TNF-alfa entre outros marcadores imunológicos (Yang et al., 2009). Este é um bom parâmetro clínico a ser analisado, mas para não ocorrer erros na avaliação e gerar dados com excelência, o animal deve ser imobilizado e a medição realizada sempre no mesmo local anatômico, por um mesmo experimentador, eliminando as variações de medida devido ao tamanho da mão e à forma com que o camundongo é manipulado, evitando o alongamento demasiado do animal e a compressão da pele (Verçosa et al., 2006).

Na análise do peso houve inicialmente maior homogeneidade, mas com a evolução da fase aguda da infecção, no segundo período de avaliação, houve significativa perda de peso (GS: $50,9 \pm 0,379$; $51,3 \pm 0,267$; GI: $42,3 \pm 0,225$; $42,8 \pm 0,228$) (figura 2), sendo isso já previsto devido à debilidade geral causada pela infecção com a cepa Y de *T. cruzi*, que proporciona morbidade crescente culminando com alta taxa de mortalidade (Pereira da Silva & Nussensweig, 1953).

No 17º dia de infecção, observou-se um falso ganho de peso. Isto acontece porque os dados obtidos foram trabalhados como média, no entanto, os animais adoecem e morrem diferentemente. Assim, após a mortalidade dos camundongos mais debilitados, observa-se um aumento na média, com ascensão da curva que não representa melhora clínica, mas sim individualidade de resposta à infecção, fato observado depois da realização de vários experimentos (Queluz et al., 2002). Para contraprova, os dados individuais proporcionariam melhor visualização da evolução do peso, porém, apresentam pouca praticidade, devido aos grandes números amostrais utilizados em experimentos com camundongos (Ferreira; Hochman; Barbosa, 2005).

A dinâmica da evolução do consumo de ração foi diferente nos grupos estudados, porém a diferença entre os valores não foi significativa (tabela 1). Outros autores encontraram valores de p mais próximos da significância para este parâmetro (Sandri, 2011) na

comparação de intervenções medicamentosas. Esta discussão é relevante uma vez que o consumo de ração é um parâmetro muito importante em avaliações clínicas.

Uma estratégia para melhorar a avaliação do consumo de ração pode ser o aumento da amostra ou utilização de gaiolas metabólicas, guardando a avaliação do custo benefício de uma ou outra estratégia. Enquanto no grupo sadio o consumo médio de ração por animal aumentou em todo período, para os animais infectados houve inicialmente queda de consumo com aumento no final do segundo período (GS: $4,6 \pm 0,238$; $7,0 \pm 0,239$; GI: $5,4 \pm 0,307$; $6,2 \pm 0,280$) (figura 2). Estes dados sugerem mais uma vez que a análise dos dados utilizando as médias pode constituir um viés no experimento, pois certamente está relacionada à variação individual no consumo de ração dos animais que apresentam evolução de morbidade e mortalidade diferentes ao longo do período avaliado da infecção. Assim, a análise individual do consumo de ração pode ser uma forma mais adequada para a abordagem deste parâmetro (Selman et al., 2001).

Outro ponto a ser discutido é a necessidade de um grupo controle, inoculado apenas com salina. Considerando os parâmetros evolução de peso, temperatura, ingesta de água ou alimento ou movimentação, deve ser destacado que dados do nosso laboratório (dados não apresentados) não mostram diferença significativa em relação ao grupo normal quando se realiza inoculação intraperitoneal de salina. Esta comparação, além de nos permitir a decisão de não mais incluir este grupo experimental na nossa rotina, diminui o número de animais a serem utilizados e diminui o trabalho do pesquisador. Ainda nos remete a observação de que estar em experimentação é o fator que mais estressa os animais, já que este grupo com uma única inoculação intraperitoneal, com baixo volume (0,2 mL), tomando todos os cuidados nos procedimentos envolvidos, não mostrou alteração significativa dos parâmetros clínicos quando comparado ao grupo sadio sem inoculação.

A avaliação dos movimentos exploratórios de auto-limpeza não apresentou diferença significativa nos dois períodos avaliados (tabela 1). O parâmetro movimentos exploratórios de levantar, apresentou diferença significativa entre os grupos de animais sadios e doentes somente no segundo período de avaliação (tabela 1). Estes resultados atestam o valor desse parâmetro para medir intervenções bio-fisio-patogênicas em camundongos (Oliveira et al., 2008).

Existem programas de computador para pesquisas comportamentais em camundongos medindo estes parâmetros de movimentos exploratórios (DRAI et al., 2001). No entanto, estes programas são limitados quanto ao número de testes, precisando ser calibrados e realimentados constantemente (Machado et al., 2006). Além disso, a sua utilização pode

causar estresse nos animais, alterando o seu comportamento (Galsworthy et al., 2005) devido aos sinais elétricos emitidos. Assim, o método mais eficaz continua sendo a avaliação visual (Souza et al., 2006).

A avaliação da temperatura corporal dos animais mostrou diferença significativa entre os grupos GS e GI somente no segundo período avaliado (tabela 1). Este parâmetro é importante, principalmente em se tratando de doença infecciosa e pode estar relacionado à mortalidade dos animais (Vlach; Boles; Stiles, 2000). A medição da temperatura corporal pode ser realizada com auxílio de termômetro através da via retal. (Crawley et al., 1993). Entretanto, no presente trabalho foi utilizado um termômetro infravermelho a fim de minimizar o estresse sofrido pelos animais (Warnet et al., 2003) e facilitar a rotina de avaliação clínica com grupos apresentando maior número de animais, quando necessário. A diminuição do estresse é um fator importante, pois estudos mostram que ele pode provocar variações fisiológicas influenciando os resultados obtidos (Kant et al., 1991).

A característica das fezes no segundo período diferenciou os grupos de animais infectados e sadios (figura 2), sendo que os animais infectados apresentaram fezes menos consistentes, caracterizando períodos diarréicos. Esta alteração poderia ser esperada na infecção pelo *T. cruzi*, devido à depleção neuronal. A infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi* diminui o número de neurônios de plexo mientérico o que acarreta alteração fisiológica e funcional do trato gastrointestinal, o que modifica a consistência das fezes (Moreira et al., 2011).

A análise de ocorrência de isolamento não se mostrou prática devido à necessidade de tempo elevado em sua avaliação. Uma possibilidade de otimização para medida deste parâmetro seria utilização de uma câmera filmadora, não somente no período claro de iluminação do biotério, como também no escuro, já que os camundongos são roedores e tem hábitos noturnos (Pistorie Souza, 2010).

Outro parâmetro que não apresentou diferença estatisticamente significativa entre GS e GI foi o aspecto do pelo. Este resultado indica que independente da infecção existe estresse quando se manipula o animal, mostrando que estar em experimentação já é um fator em si estressante. Visualmente foi observada diferença entre a coloração e homogeneidade dos pêlos entre os grupos, no entanto, quando este parâmetro qualitativo foi quantificado numericamente em categorias não foi possível expressar esta diferença estatisticamente. Embora o aspecto da pelagem seja um bom parâmetro para avaliar adoecimento de camundongos, haveria necessidade de mais tempo para sua mensuração devido às

interferências sofridas, principalmente de brigas ocorridas entre os animais do grupo, que podem alterar a saúde do animal, dificultando a avaliação (Fox et al., 2007).

O parâmetro coloração da pele nas patas e cauda, não se mostrou prático, devido ao fato dos camundongos infectados morrerem apresentando as mesmas características de coloração de pele dos camundongos saudáveis, provavelmente pelo curto período entre a infecção e mortalidade. Embora seja descrito na literatura a observação de anemia significativa na fase aguda da infecção murina pelo *T. cruzi* (Ferraz, 2009), esta não se refletiu na alteração da coloração da pele no período estudado. Uma análise que poderia substituir com excelência esta avaliação seria a quantificação de parâmetros hematológicos relacionados à anemia.

As alterações na coloração dos olhos de camundongos podem ser estudadas na infecção por outros parasitos, como o *Toxoplasma gondii* (Braga et al., 2010). Como na infecção murina pelo *T. cruzi*, não são observados acometimentos oculares importantes, em nosso modelo esse parâmetro não mostrou alteração.

A mortalidade foi um bom parâmetro para diferenciar o GS do GI (tabelas 1 e 3), sendo importante destacar que além da taxa de mortalidade acumulada no período avaliado, pode ser comparada a evolução da morbidade. A mortalidade é a maior consequência da evolução progressiva da morbidade expressa pelos diferentes parâmetros clínicos que podem ser estudados. Como em camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi* a mortalidade é muito alta, qualquer intervenção que promova a mínima diminuição deste parâmetro não deverá passar despercebida aos olhos de um pesquisador atento.

CONCLUSÃO

Nas condições em que o experimento foi realizado podemos concluir que o consumo de água, ração, produção de excretas, características das fezes, temperatura corporal, circunferência abdominal, movimento exploratório de levantar, peso e mortalidade, são parâmetros fáceis de serem medidos e eficazes na diferenciação da clínica de camundongos saudáveis e infectados pelo *T. cruzi*.

REFERÊNCIAS

ARAÚJO, S.M.; CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C3H/He mice mothers. *Mem Inst Oswaldo Cruz.*, v.91, p.211-216, 1996.

ARAÚJO-JORGE, T.C. Modelos animais para o estudo *in vivo* da doença de Chagas e de seus aspectos histopatológicos: O camundongo. *In: ARAÚJO-JORGE, T.C e CASTRO*

(org.). *Doença de Chagas: Manual para experimentação animal*. Rio de Janeiro: Fiocruz, 2000. p.133-73.

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

CANADIAN council on animal care. Guide to the care and use of experimental animals. In: Olfert, E.D.; Cross, B.M.; McWilliam, A.A. Eds. Ottawa, Ontario: *Laboratory Animal Care*. 1993. cap.5, p.82-89.

CHORILLI, M.; MICHELIN, D.C.; SALGADO, H.R.N. Animais de laboratório: O camundongo. *Rev. Cienc. Farm. Básica Apl.*, v.28, p.11-23, 2007.

COUVREUR, J.; THULLIEZ, P. Acquired toxoplasmosis of ocular or neurologic site: 49 cases. *Presse Med.*, v.25, p.438-442, 1996.

CRAWLEY, J.N.; CORWIN, R.L.; ROBINSON, J.K. *et al.* Anandamide, an endogenous ligand of the cannabinoid receptor, induces hypomotility and hypothermia *in vivo* in rodents. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, v.46, p.967-972, 1993.

DRAI, D.; KAFKAFI, N.; BENJAMINI, Y. *et al.* Rats and mice share common ethologically relevant parameters of exploratory behavior. *Behav Brain Res.*, v.125, p.133-140, 2001.

EILAM, D. Open-field behavior withstands drastic changes in arena size. *Behav Brain Res.*, v.142, p.53-62, 2003.

FERRAZ, F.N. *Efeito de bioterápicos sobre a infecção experimental em camundongos pelo Trypanosoma cruzi*. 2009.52f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.

FERREIRA, L.M.; HOCHMAN, B.; BARBOSA, M.V.J. Modelos experimentais em pesquisa. *Acta Cir. Bras.*, v.20, p.28-34, 2005.

FOX, J.G. BARTHOLD, S.W.; DAVISSON, M.T. *The Mouse in Biomedical Research: Diseases*. 2nd ed. San Diego: Elsevier, 2007. 75p.

GALSWORTHY, M.J.; AMREIN, I.; KUPTSOV, P.A. *et al.* A comparison of wild-caught wood mice and bank voles in the Intellicage: Assessing exploration, daily activity patterns and place learning paradigms. *Behav. Brain Res.*, v.157, p.211-217, 2005.

KANT, G.J.; BAUMAN, R.A.; PASTEL, R.H. *et al.* Effects of controllable vs. uncontrollable stress on circadian temperature rhythms. *Physiol. Behav.*, v.49, p.625-630, 1991.

MACHADO, B.B.; DE ANDRADE, S.J.; GONÇALVES, W.N. *et al.* Topolino: Software livre para automatização do experimento do campo aberto. In: SEMINÁRIO DE COMPUTAÇÃO, 15., 2006, Blumenau. *Anais...* Blumenau: [s.n.] 2006. p.19-28.

MOREIRA, N.M.; SANT`ANA, D.M.G.; ARAÚJO, E.J.A. *et al.* Neuronal changes caused by *Trypanosoma cruzi*: an experimental model. *An. Acad. Bras. Cienc.*, v.83, p.545-555, 2011.

- OLIVEIRA, R.B.; NASCIMENTO, M.V.M.; VALADARES, M.C. *et al.* Avaliação dos efeitos depressores centrais do extrato etanólico das folhas de *Synadenium bellatum* Pax. e de suas frações em camundongos albinos. *Rev. Bras. Cienc. Farm.*, v.44, p.485-491, 2008.
- PEREZ, J.M.; LEBRAS, F.; FIDENNE, T. European Reference Method for *in vivo* Determination of Diet Digestibility in Rabbits. *World Rabbit Sci.*, v.3, p.41-43, 1995.
- PISTORI, H.; SOUZA, K.P. Tecnologia adaptativa aplicada na biotecnologia: Estudos de caso e oportunidades. In: WORKSHOP DE TECNOLOGIA ADAPTATIVA. Escola Politécnica da USP, 4., 2010, São Paulo. *Anais...* São Paulo: [s.n.] 2010. p.16-21.
- PUPULIM, A.R.T.; ARAUJO, S.M.; TOLEDO, M.J.O. *et al.* Canova medication modifies parasitological parameters in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, v.126, p.435-440, 2010.
- QUELUZ, T.T.; SILVA, M.H.C.; ZANATTI, S.G. *et al.* Estudo do efeito da amiodarona sobre o peso corpóreo e sobre determinantes morfológicos e citopatológicos do pulmão em ratos machos e fêmeas das linhagens Wistar, Wistar-Kyoto e SHR. *J. Pneumol.*, v.28, p.309-316, 2002.
- RICHTER, C.; BRAILEY, M. Water intake and its relation to the surface area of the body. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, v.15, p.570-578, 1929.
- SANDRI, P.F. *Efeitos do bioterápico 17DH na infecção pelo Trypanosoma cruzi em camundongos de diferentes idades.* 2011. 70f. Dissertação (Mestrado em Biociências Aplicadas à Farmácia) - Universidade Estadual de Maringá, Maringá.
- SELMAN, C.; LUMSDEN, S.; BUNGER, L. *et al.* Resting metabolic rate and morphology in mice (*Mus musculus*) selected for high and low food intake. *J. Exp. Biol.*, v.204, p.777-784, 2001.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo albino. *Fol. Clin. Biol.*, v.20, p.191-208, 1953.
- SOUZA, M.M.; GARBELOTO, M.; DENEZ, K. *et al.* Avaliação dos efeitos centrais dos florais de Bach em camundongos através de modelos farmacológicos específicos. *Rev. Bras. Farmacogn.*, v.16, p.365-371, 2006.
- VERÇOSA JÚNIOR, D.; SOUZA-FAGUNDES, E.M.; CASSALI, G.D. *et al.* Efeito do miriadenolideo isolado de *Alomiaamyriadenia* (Asteraceae) sobre o tumor de Ehrlichascítico no camundongo. *Arq.Bras. Med. Vet. Zootec.*, v.58, p.788-798, 2006.
- VLACH, K.D.; BOLES, J.W.; STILES, B.G. Telemetric evaluation of body temperature and physical activity as predictors of mortality in a murine model of staphylococcal enterotoxic shock. *Comp Med.*, v.50, p.160-166, 2000.
- WARN, P.A.; BRAMPTON, M.W.; SHARP, A. *et al.* Infrared body temperature measurement of mice as an early predictor of death in experimental fungal infections. *Lab. Anim.*, v.37, p.126-131, 2003.
- YANG, D., DE LA, R.G., TEWARY, P., OPPENHEIM, J.J. Alarmins link neutrophils and dendritic cells. *Trends Immunol.*, v.30, p.531-537, 2009.

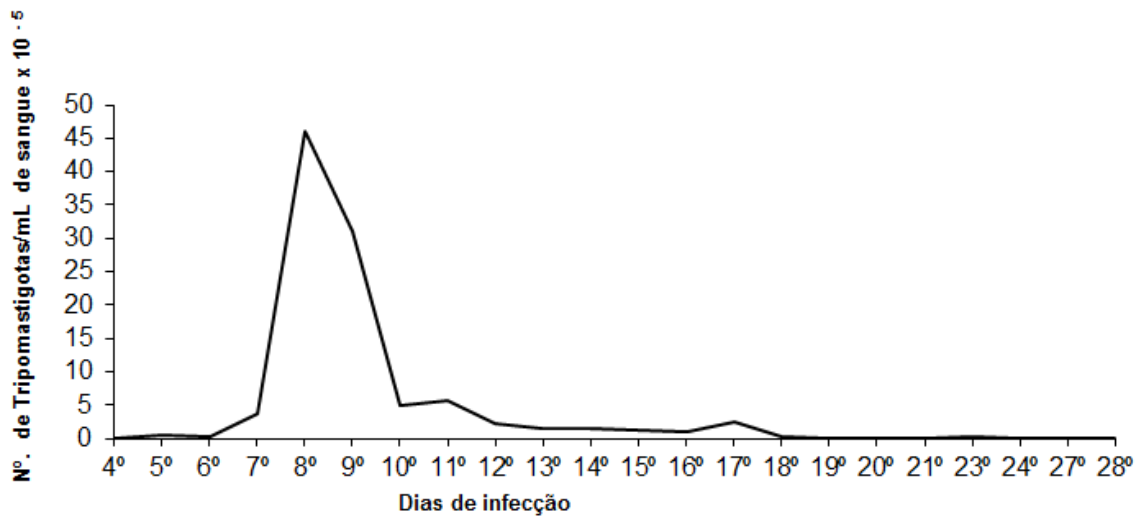


Figura 1 – Curva média de parasitemia obtida em camundongos suíços, machos, com 8 semanas de idade infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, por via intraperitoneal. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.

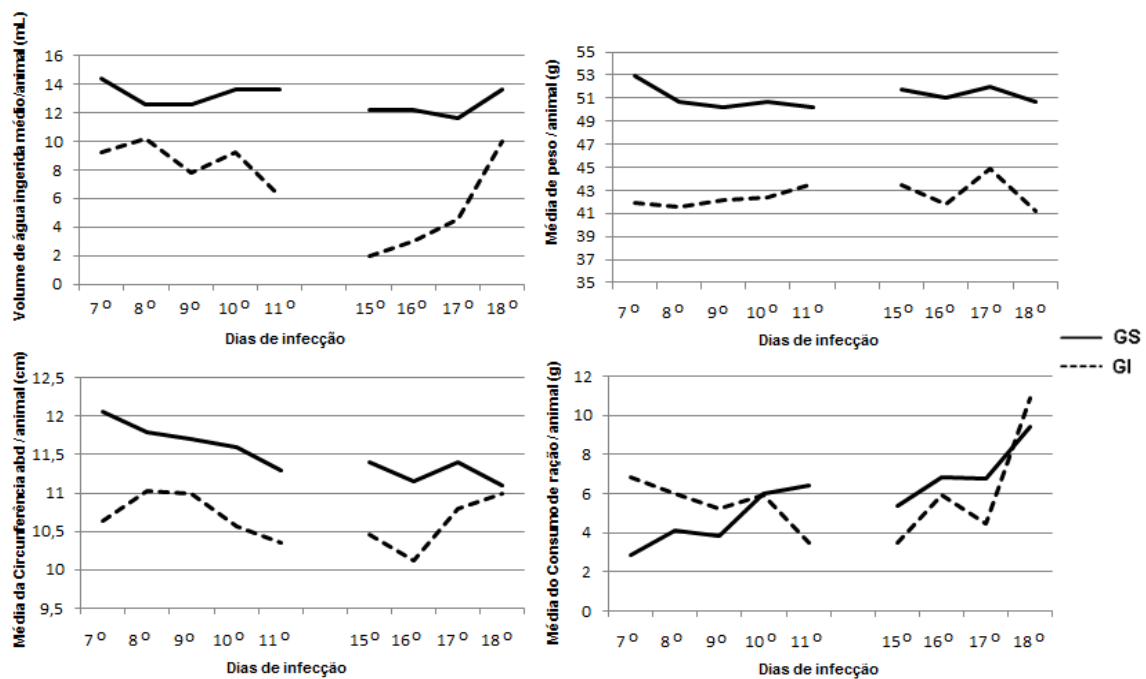


Figura 2 – Análise de parâmetros clínicos das médias do volume de água ingerida, peso, circunferência abdominal e consumo de ração de camundongos suíços, machos, saudáveis (GS) ou infectados (GI) nos dois períodos de avaliação. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.

Tabela 1 – Média \pm desvio padrão e significância de parâmetros clínicos quantitativos avaliados e comparados em camundongos suíços, machos, com 8 semanas de idades, sadios ou infectados com 1400 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* de acordo com o período. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.

| Parâmetros | SADIOS | | INFECTADOS | | p1 | p2 |
|--------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|--------|--------|
| | 1º Período | 2º Período | 1º Período | 2º Período | | |
| Peso | 50,9 \pm 0,37 | 51,3 \pm 0,26 | 42,3 \pm 0,22 | 42,8 \pm 0,22 | 0,0001 | 0,0001 |
| Consumo de água | 13,3 \pm 0,23 | 12,4 \pm 0,26 | 8,5 \pm 0,34 | 4,8 \pm 0,29 | 0,0002 | 0,0262 |
| Consumo de ração | 4,6 \pm 0,23 | 7,0 \pm 0,23 | 5,4 \pm 0,30 | 6,2 \pm 0,28 | NS | NS |
| Quantidade de excretas | 21,5 \pm 4,1 | 27,5 \pm 2,21 | 13,8 \pm 5,8 | 5,6 \pm 4,5 | NS | 0,0138 |
| Temperatura | 34 \pm 0,7 | 33,2 \pm 0,3 | 34,6 \pm 0,4 | 31,7 \pm 0,8 | NS | 0,0399 |
| Circunferência abdominal | 11,6 \pm 0,17 | 11,2 \pm 0,23 | 10,7 \pm 0,30 | 10,5 \pm 2,54 | 0,0006 | 0,0094 |
| Exploração/Levantar | 17 \pm 4,6 | 17 \pm 2,7 | 14 \pm 6,9 | 7 \pm 4,4 | NS | 0,0179 |
| Exploração/Auto-limpeza | 5 \pm 2,9 | 2 \pm 1,0 | 3 \pm 2,1 | 1 \pm 0,3 | NS | NS |

p<0,05

p1 corresponde ao valor de p no primeiro período de avaliação = 7º.- 11º.dia de infecção;

p2 corresponde ao valor de p no segundo período de avaliação = 15º. – 18º. dia de infecção;

NS – não significativo

Tabela 2 – Aspectos das fezes de camundongos suíços, machos, sadios (GS) ou infectados (GI) com 1400 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* de acordo com o período de avaliação. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.

| Grupos | 1º período | | | | | | 2º período | | | | | |
|--------|------------|-----|---------------|----|-----------|----|------------|----|---------------|----|-----------|----|
| | Normal | | Inconsistente | | Diarréica | | Normal | | Inconsistente | | Diarréica | |
| | n.º. | % | n.º. | % | n.º. | % | n.º. | % | n.º. | % | n.º. | % |
| GS | 5 | 100 | 0 | 0 | 0 | 0 | 4 | 80 | 1 | 20 | 0 | 0 |
| GI | 1 | 20 | 3 | 60 | 1 | 20 | 0 | 0 | 3 | 60 | 2 | 40 |

*p<0,05 (p₁=0,3739;p₂=0,0432)

Tabela 3 – Mortalidade apresentada por camundongos suíços, machos, sadios (GS) ou infectados (GI) com 1400 tripomastigotas sanguíneas da cepa Y de *T. cruzi* de acordo com o dia de infecção. Dados experimentais de uma repetição com 5 animais por grupo.

| Grupos | Mortalidade (%) de acordo com o dia de infecção | | | | |
|--------|---|------|------|------|------|
| | 7º.-11º. | 15º. | 16º. | 17º. | 18º. |
| GS | 0 | 0 | 0 | 0 | 0 |
| GI | 0 | 20 | 20 | 60 | 80 |

CAPÍTULO III

CONCLUSÕES

Nas condições em que o experimento foi realizado podemos concluir que os parâmetros para avaliações clínicas em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi* mostrou que:

- 1) Parâmetros quantitativos, tais como o consumo de água, ração, circunferência abdominal, peso e mortalidade são bons parâmetros para diferenciação clínica;
- 2) A temperatura corporal externa e o parâmetro comportamental de movimentação exploratória de levantar do animal se mostraram significativos na diferenciação clínica a partir do 15º dia de infecção;
- 3) Parâmetro qualitativo das características das fezes mostrou-se significativo na diferenciação clínica a partir do 15º dia de infecção;
- 4) As análises de isolamento comportamental como realizada neste trabalho, característica do pêlo, coloração da pele, dos olhos, das patas e cauda não se mostraram ser parâmetros práticos na avaliação clínica de animais infectados pelo *T. cruzi* e sadios.

PERSPECTIVAS FUTURAS

Milhares de pesquisadores utilizam avaliações clínicas em camundongos para diferenciar características que indicam melhora ou piora de um determinado grupo experimental. Os dados obtidos neste trabalho mostraram caminhos para elaboração de um protocolo para avaliar intervenções medicamentosas, no qual qualquer alteração sutil possa ser percebida.

O presente protocolo clínico permitirá homogeneidade nas análises clínicas por pesquisadores, facilitando a comparação de resultados em artigos que avaliam intervenções medicamentosas em qualquer agravo que utilize o camundongo como modelo experimental.

Inúmeros trabalhos poderão se apoiar nesta pesquisa realizada que poderá ser inovada, permitindo sofisticação e mais precisão, introduzindo uso de *softwares* e equipamentos que realizem as medições quantitativas e qualitativas de análise comportamental (Sistema Ethovision Basic System), com parâmetros que possam ser analisados estatisticamente incorporando excelência aos resultados obtidos.

Especificamente passaremos a avaliar o efeito de diversas substâncias ultradiluídas, sobre o curso da infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi*, utilizando os parâmetros descritos neste trabalho.