

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

HEVILLYN FERNANDA LUCAS DA SILVA

Avaliações parasitológicas, bioquímicas e histopatológicas de camundongos
inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com
benzonidazol

Maringá
2019

HEVILLYN FERNANDA LUCAS DA SILVA

Avaliações parasitológicas, bioquímicas e histopatológicas de camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com benzonidazol

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. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo

Maringá
2019

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
(Biblioteca Central - UEM, Maringá, PR, Brasil)

S586a Silva, Hevillyn Fernanda Lucas da
Avaliações parasitológicas, bioquímicas e histopatológicas de camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com benzonidazol / Hevillyn Fernanda Lucas da Silva. -- Maringá, 2019.
60 f. : il. color., figs., tabs.

Orientador: Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Maringá, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2019.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas oral. 3. Benzonidazol. 4. Aminotransferases. 5. qPCR. 6. Estresse oxidativo. I. Toledo, Max Jean de Ornelas, orient. II. Universidade Estadual de Maringá. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

CDD 21.ed.616.9363

Elaine Cristina Soares Lira - CRB 1202/9

FOLHA DE APROVAÇÃO

HEVILLYN FERNANDA LUCAS DA SILVA

Avaliações parasitológicas, bioquímicas e histopatológicas de camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com benzonidazol

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

Titulares



Prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo

DBS/PCS/Universidade Estadual de Maringá

(Presidente)



Prof. Dr. Jurandir Fernando Comar

DBQ/PBC/Universidade Estadual de Maringá (Participante)



Profª. Drª. Sueli de Oliveira Silva Lautenschlager

DBS/PCF/ Universidade Estadual de Maringá (Participante)

Aprovada em: 26 de março de 2019.

Local de defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

Dedico este trabalho a minha mãe
Luciani, por todo seu amor e
incentivo a minha vida acadêmica.

AGRADECIMENTOS

No decorrer da realização deste trabalho algumas pessoas estiveram ao meu lado e percorreram este caminho comigo estimulando que eu buscasse minha vitória e realizasse meus sonhos.

Quero agradecer, em primeiro lugar, a Deus, por seu maravilhoso amor.

À minha mãe Luciani, que me ensinou a ser uma mulher de força, pelo seu apoio e amor incondicional em todas as etapas da minha vida. Ao meu padrasto Christian, por todos esses anos de cuidado comigo junto com a minha mãe, sendo um grande exemplo de pessoa.

Ao meu pai Carlos, pessoa batalhadora, que apesar de todas as dificuldades sempre me presenteou com seu amor. À minha madrastra Cássia, por todo amor demonstrado por mim.

Aos meus irmãos Gustavo e Giulliani, que não imagino minha vida sem eles.

Ao meu avô e minha avó, José Lucas e Marluce, por todas as orações e mimos que me deram, e que eu sei que têm um orgulho imenso de mim.

Ao Nicolas, meu melhor amigo e namorado, meu companheiro de todas as horas que aguenta sempre todas as minhas crises e reclamações, me dando todo apoio e amor.

Ao meu orientador prof. Dr. Max Jean de Ornelas Toledo, que compartilhou todo seu conhecimento e me guiou rumo à concretização deste trabalho.

Ao prof. Dr. Jurandir Fernando Comar, pela disponibilidade e auxílio nas técnicas de bioquímica, partes essenciais deste trabalho.

À prof. Dr^a. Alice Maria de Souza Kaneshima e a Maristela Gabriel do setor de Patologia pelos ensinamentos e auxílios na realização das técnicas histopatológicas.

À Marcella Sarto, minha amiga e companheira de mestrado, que esteve comigo em todos os momentos dessa caminhada, por todos os fins de semana e feriados que passamos trabalhando, por tudo que aprendemos juntas. Agradeço por aguentar meu mau humor com todo carinho e paciência, sua amizade foi essencial.

À Ana Paula de Abreu, grande amiga, que me incentivou a seguir a carreira acadêmica, me inspirou e esteve comigo desde o início, quando eu era sua estagiária e muito me ensinou.

Aos meus colegas de laboratório, Fernanda, Nilma, Ricardo e David, técnicos do Setor de Parasitologia/DBS, Ely e Sandra e estagiários Giullia e João pelo companheirismo, auxílio e dicas que foram importantes para a realização deste trabalho.

EPÍGRAFE

“Bem-aventurado o homem que acha
sabedoria, e o homem que adquire
conhecimento”

Provérbios 3:13

Avaliações parasitológicas, bioquímicas e histopatológicas de camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com benzonidazol

RESUMO

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado agente etiológico da doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, infecta ~8 milhões de pessoas, principalmente na área endêmica da América Latina. Atualmente, a via oral é a forma de transmissão mais frequente, que pode levar à uma infecção mais severa, afetando o fígado de forma diferenciada. Além das alterações observados no coração, principal alvo da infecção, lesões hepáticas têm sido relacionadas à fase aguda da infecção. Benzonidazol (BZ), único medicamento disponível para o seu tratamento, além da baixa eficácia na fase crônica da infecção, tem potencial para induzir toxicidade hepática. A dosagem sérica das enzimas hepáticas e a avaliação do estresse oxidativo fornecem indicadores sensíveis de lesão e, em alguns casos, podem ser utilizados para monitorar o tratamento e a progressão da doença. Neste contexto, esse trabalho objetivou avaliar as alterações parasitológicas, bioquímicas e histopatológicas em camundongos inoculados por via oral (VO) com *T. cruzi* II e IV e tratados com BZ durante a fase aguda da infecção. Para isto, camundongos swiss foram inoculados por VO e via intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura das cepas Y (TcII, macrofagotrópica) e AM14 (TcIV, não macrofagotrópica) de *T. cruzi*. O tratamento consistiu na administração oral de 100 mg/kg/dia de BZ, a partir do 5º dia de infecção (d.i.), por 20 dias consecutivos. A parasitemia foi avaliada diariamente através do exame de sangue a fresco (ESF) e a carga parasitária determinada pela qPCR. Foram obtidos parâmetros plasmáticos de dano hepático, dosagem das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP) e de estresse oxidativo (EO) do fígado, parâmetros histopatológicos (HE), processo inflamatório, parasitismo e tropismo tecidual. Os níveis de parasitemia foram significativamente mais elevados nos animais infectados com a cepa Y. A análise dos parâmetros parasitológicos derivados da curva de parasitemia mostrou que os animais infectados com a cepa Y por VO apresentaram apenas 1/6 parâmetros com valores maiores que nos animais infectados via IP, indicando maior virulência da infecção por essa via. Nos camundongos infectados com a cepa AM14, a via IP também se mostrou mais virulenta, onde dois parâmetros foram significativamente maiores. A dosagem das enzimas hepáticas AST, ALT e ALP mostrou que os seus níveis, independentemente da via de inoculação, foram mais elevadas na infecção pela cepa Y em relação a cepa AM14. O tratamento com BZ dos animais

controles não infectados causou aumento da atividade das enzimas AST e ALT mostrando que a droga sozinha pode afetar o fígado, isso também foi confirmado pelo aumento do EO no órgão destes animais demonstrado pelo aumento dos grupos carbonila das proteínas. Podemos concluir que as infecções dos camundongos por via IP com as cepas Y e AM14 foram mais virulentas do que as infecções adquiridas por VO. Comparando as cepas vimos que na VO não houveram diferenças significativas, mas na infecção por via IP, a cepa Y se mostrou mais virulenta. As infecções com as cepas Y e AM14 de *T. cruzi* pelas vias oral e IP causaram mais danos hepáticos que o tratamento etiológico. Entretanto, o tratamento com BZ promoveu redução dos parâmetros de EO na cepa Y, propiciando benefícios aos animais tratados.

Palavras-chaves: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas oral, benzonidazol, qPCR, aminotransferases, estresse oxidativo.

Parasitological, biochemical and histopathological evaluations of mice orally inoculated with *Trypanosoma cruzi* II and IV and treated with benznidazole

ABSTRACT

Trypanosoma cruzi, a protozoan hemoflagellate etiologic agent of Chagas disease (CD) or American trypanosomiasis, infects ~ 8 million people, mainly in the endemic area of Latin America. Currently, the oral route is the most frequent form of transmission, which can lead to a more severe infection, affecting the liver in a differentiated way. In addition to the changes observed in the heart, the main target of infection, liver lesions have been related to the acute phase of infection. Benznidazole (BZ), the only drug available for its treatment, besides the low efficacy in the chronic phase of the infection, has the potential to induce hepatic toxicity. Serum hepatic enzyme dosage and oxidative stress assessment provide sensitive indicators of injury and in some cases can be used to monitor treatment and progression of the disease. In this context, this work aimed to evaluate the parasitological and biochemical changes in mice inoculated orally (OR) with *T. cruzi* II and IV and treated with BZ during the acute phase of infection. For this, swiss mice were inoculated by OR and intraperitoneal (IP) routes with 2×10^6 culture derived metacyclic trypomastigotes of *T. cruzi* Y (TcII, macrophagotropic) and AM14 (TcIV, not macrophagotropic) strains. The treatment consisted of oral administration of 100 mg/kg/day of BZ, from the 5th day of infection (d.i.), for 20 consecutive days. Parasitemia was evaluated daily through the fresh blood examination (FBE) and the parasitic load determined by qPCR. Were evaluated plasma parameters of liver damage, aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT) and alkaline phosphatase (ALP) and oxidative stress (OE) in the liver. The levels of parasitemia were significantly higher in the animals infected with the Y strain. The analysis of the parasitological parameters derived from the parasitemia curve showed that the animals infected with the Y strain by OR presented only 1/6 parameters with higher values than in the infected animals via IP, indicating a greater virulence of the infection by this route. In the mice infected with the AM14 strain, the IP route was also more virulent, where two parameters were significantly higher. Dosage of the AST, ALT and ALP liver enzymes showed that their levels, regardless of route of inoculation, were higher in Y strain infection than AM14 strain. BZ treatment of uninfected control animals caused increased activity of AST and ALT enzymes showing that the drug alone affects the liver. This was also confirmed by the increased OE of the liver of these animals demonstrated by the increase in the carbonyl groups of the proteins. We can conclude that the infection of the mice by IP route with the strains Y and AM14 was more virulent than the infection acquired by OR. Comparing the

strains, we found that in the OR there were no differences, but in the IP infection, Y strain was more virulent. Infections with Y and AM14 *T. cruzi* strains by oral and IP routes caused more liver damage than the etiological treatment. However, the treatment with BZ promoted reduction of the OE parameters in the Y strain, giving benefits to the treated animals.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, oral Chagas disease, benznidazole, qPCR, aminotransferases, oxidative stress.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Distribuição mundial dos casos de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* baseado em estimativas oficiais (2006-2010).

Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e vertebrado (homem).

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Nomenclatura para as divisões de *Trypanosoma cruzi* conforme o consenso de 2009.

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e da publicação científica (Capítulo II): *Molecular and Biochemical Parasitology* (artigo 1) disponível em: <https://www.journals.elsevier.com/molecular-and-biochemical-parasitology>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I

1. Doença de Chagas.....	13
2. Ciclo evolutivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3. Manifestações clínicas.....	15
4. Tratamento etiológico.....	16
5. Variabilidade genética do <i>T. cruzi</i>	17
6. Parasitismo e tropismo tecidual.....	18
7. Enzimas hepáticas	
7.1. Aspartato aminotransferase.....	19
7.2. Alanina aminotransferase.....	20
7.3. Fosfatase alcalina.....	20
8. Estresse Oxidativo.....	20
9. Justificativa.....	21
10. Objetivos	
10.1. Geral	23
10.2. Específicos.....	23
11 Referências.....	24

CAPÍTULO II

Artigo 1: “Alterações hepáticas em camundongos inoculados por via oral com <i>Trypanosoma cruzi</i> II e IV e tratados com benzonidazol”	30
---	----

CAPÍTULO III

1. Conclusão.....	59
2. Perspectivas.....	59

CAPÍTULO I

1. DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana possui como agente etiológico o *Trypanosoma cruzi*, um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae* (CHAGAS, 1909). Atualmente, este parasito infecta aproximadamente 8 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente na América Latina (Figura 1) (WHO, 2010; 2018). A presença da DC em países considerados não endêmicos como os Estados Unidos da América, Canadá, países da Europa e em alguns países da Ásia, é devido, principalmente, a migração de latino-americanos para essas regiões (WHO, 2018).

A DC é considerada uma doença tropical negligenciada com tratamento limitado, ausência de vacinas apropriadas, podendo causar consequências crônicas e irreversíveis aos sistemas cardíaco, digestivo e nervoso. Estima-se que cerca de 70 milhões de pessoas nas Américas vivem em áreas de exposição e correm o risco de contrair a doença, sendo considerada um grande problema de saúde pública (OPAS, 2018; WHO, 2018).

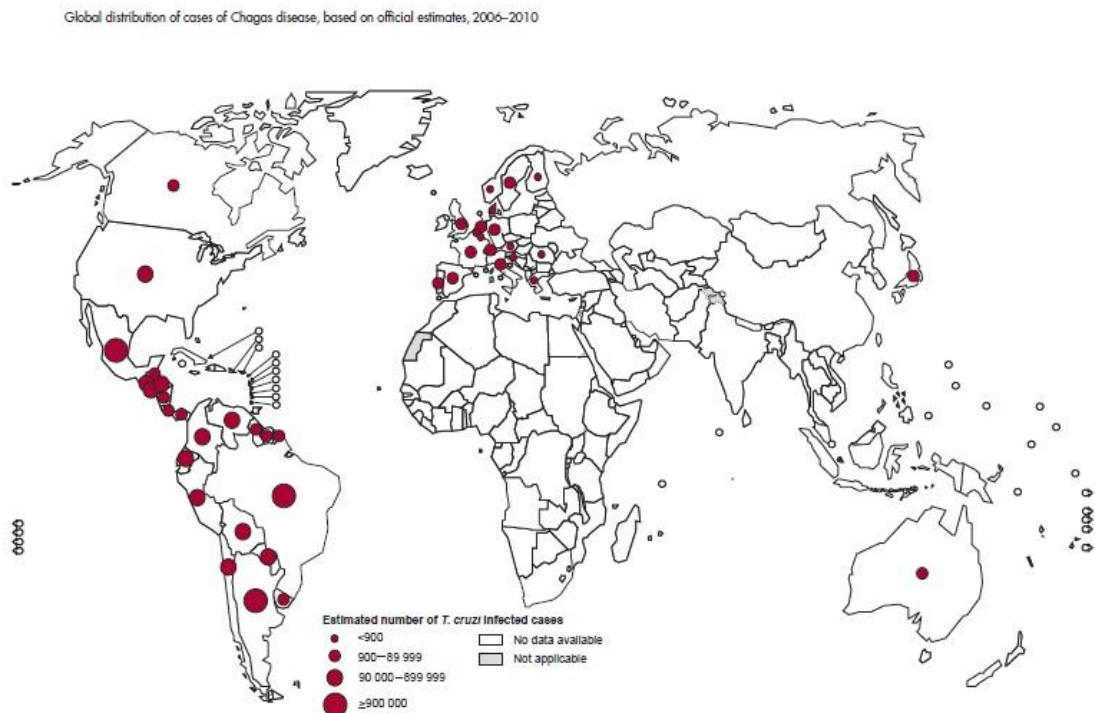


Figura 1. Distribuição mundial dos casos de infecção pelo *Trypanosoma cruzi* baseada em estimativas oficiais (2006-2010).

Por se tratar de uma doença endêmica na América Latina, a prevalência da DC é maior nesses países onde a transmissão de *T. cruzi* ocorre através da via vetorial, seja ela clássica,

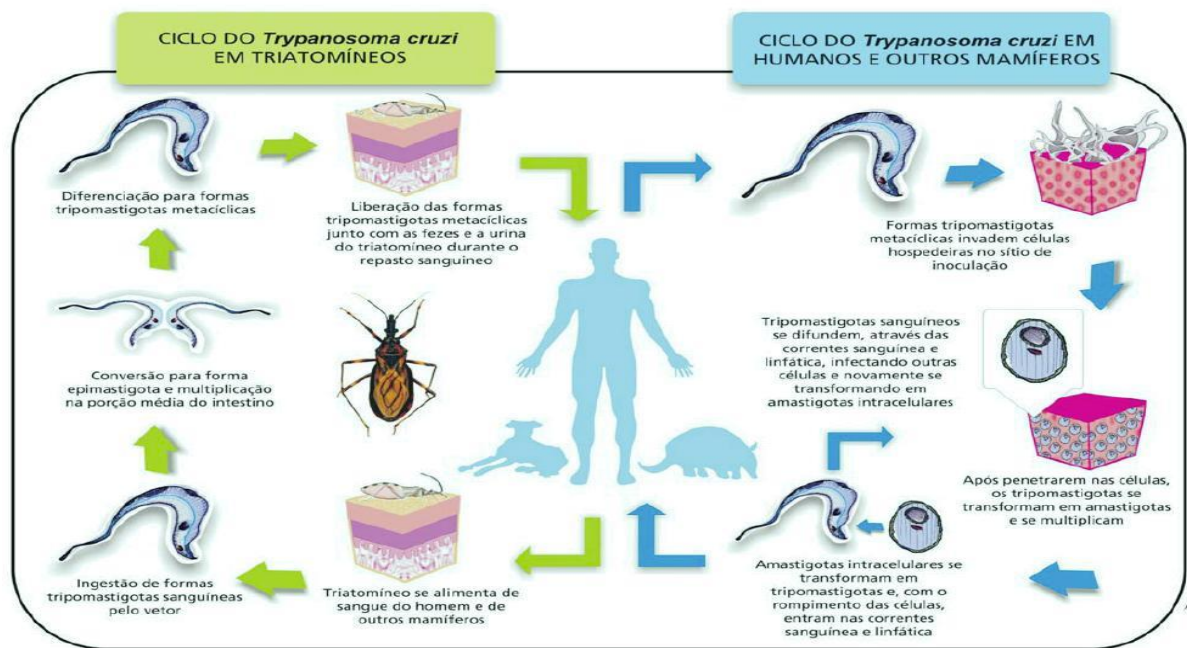
após o repasto sanguíneo dos triatomíneos, ou pela ingestão do vetor e/ou suas excretas, triturados junto com alimentos (ALBUQUERQUE, 2017), sendo esse último atualmente o principal mecanismo para a disseminação da doença. Outras formas de transmissão, consideradas como mecanismos secundários (SILVEIRA & REZENDE, 1994), como infecções causadas por transfusão de sangue, transmissão congênita e transplante de órgãos, além da exposição ocupacional (MAGALHÃES-SANTOS, 2014), dependem do mecanismo primário. A transmissão oral embora accidental, é considerada responsável pelos recentes surtos de DC, sendo esta a principal forma de transmissão atualmente em regiões reemergentes como a Amazônia Ocidental brasileira (BARBOSA, 2006; SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012).

Na última década, o Brasil registrou mais de 1000 casos de DC aguda, 73% deles adquiridos por transmissão oral, particularmente no Estado do Pará, onde foi relatado 89% dos casos. Mesmo em menor proporção, foram registrados casos de transmissão vetorial (8,9%), com um aumento de 2,5% em relação ao período avaliado anteriormente. Esse fato deve ser analisado de forma crítica uma vez que mesmo após avanços relacionados ao controle de transmissão vetorial, atualmente ainda permanece o risco relacionado a essa forma de transmissão devido aos vetores nativos (BRASIL, 2019).

2. CICLO EVOLUTIVO DO *Trypanosoma cruzi*

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve formas proliferativas e formas diferenciadas com capacidade infectante que se alternam entre hospedeiros invertebrados (triatomíneos) e vertebrados, mamíferos incluindo os humanos (CHAGAS, 1909).

Nos hospedeiros invertebrados são encontradas três formas evolutivas: esferomastigotas ou formas de transição; epimastigotas (EP) que são proliferativas; e tripomastigotas metacíclicas (TM) que são eliminadas junto às fezes e urina do vetor, durante ou após o repasto sanguíneo e penetram através da mucosa íntegra ou solução de continuidade da pele causada pela picada. Da corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, os TM chegam ao interior das células onde se transformam em amastigotas (AMA) então se multiplicam por divisão binária simples e, após proliferação, se diferenciam em tripomastigotas sanguíneos (TS). A célula então se rompe e os TS caem na circulação sanguínea, onde podem atingir novas células e tecidos ou serem ingeridos por triatomíneos durante o hematofagismo completando seu ciclo natural (Figura 2) (ARGOLO et al., 2008; BRENER, 1973; BRENER & ANDRADE, 1979).



Ciclo de transmissão do *Trypanosoma cruzi* (simplificado). Infográfico: Venício Ribeiro, ICICT/Fiocruz.

Figura 2. Ciclo biológico de *Trypanosoma cruzi* no hospedeiro invertebrado (triatomíneo) e vertebrado (mamíferos, incluindo o homem). Fonte: Infográfico: VENÍCIO RIBEIRO, ICICT/Fiocruz.

3. MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS

O período de incubação da DC pode variar de acordo com a via de infecção, sendo de 4-15 dias na transmissão vetorial clássica e de 3-22 dias na transmissão por via oral (SHIKANAI-YASUDA & CARVALHO, 2012). A DC apresenta duas fases clínicas, a fase aguda onde são encontrados um elevado número de parasitos na circulação sanguínea e tecidos, e a fase crônica na qual o parasitismo é baixo (HIGUCHI et al., 2003).

A fase aguda inicia-se quando o *T. cruzi* invade o organismo do hospedeiro vertebrado, suas formas sanguíneas se distribuem por diferentes tecidos e órgãos e invadem novas células do sistema mononuclear fagocitário onde se transformam em AMA (MARIN-NETO et al., 2007). Os pacientes na fase aguda apresentam alta parasitemia, e podem apresentar, além de febre prolongada, dores musculares e nas articulações, sonolência, diarreia, linfadenomegalia, hepatoesplenomegalia, edema subcutâneo, distúrbios respiratórios, cianose e coma (RASSI-JR et al., 2010). Quando a infecção ocorre por meio do inseto vetor, observa-se edema após 7-14 dias e também uma reação inflamatória local, conhecida como Chagoma de inoculação ou sinal de Romaña (edema bipalpebral unilateral), quando ocorre a penetração do parasito através da mucosa ocular. Outro sintoma importante da fase aguda é a miocardite provocada pelo

parasitismo intenso das fibras do miocárdio (REY, 2011; TORRES, 1941) que, juntamente com a meningoencefalite, pode levar o indivíduo à morte.

A evolução da fase aguda para a crônica pode variar de acordo com a cepa de *T. cruzi* e também a resistência do hospedeiro. Assim, a doença torna-se assintomática e latente por até 20 anos após a infecção, evoluindo ou não para a fase crônica sintomática (RIBEIRO & ROCHA, 1998). Na fase crônica, até dois terços dos indivíduos são assintomáticos, apresentando a forma indeterminada, caracterizada por baixa parasitemia e pela positividade de anticorpos contra o *T. cruzi*. Nos pacientes sintomáticos, mais de 90% apresentam manifestações cardíacas e os demais apresentam a síndrome dos megas (megaesôfago e megacólon). A cardiomiopatia chagásica crônica é uma das alterações mais importantes da DC e a principal causa de morte nos pacientes (HIGUCHI et al., 2003).

4. TRATAMENTO ETIOLÓGICO

O estudo de compostos para o tratamento da DC teve início na década de 50, mas somente a partir da década de 60 foram descobertos e comercializados dois fármacos efetivos no tratamento dessa patologia: os nitroderivados nifurtimox (NF) e benzonidazol (BZ) (TIMM, 2014).

NF e BZ apresentam cura parasitológica de até 80% em pacientes na fase aguda, contudo, esses fármacos apresentam alta toxicidade e não garantem a cura após dispersão do parasito em órgãos e tecidos dos hospedeiros vertebrados (RASSI-JR et al., 2010). No entanto em consequência das diferenças na suscetibilidade ao fármaco entre diferentes cepas de *T. cruzi*, a sua eficácia pode variar (COURA et al., 1997). Atualmente o NF não é mais comercializado no Brasil devido à alta toxicidade e efeitos colaterais como reações de hipersensibilidade, anorexia, vômitos, polineurite e depressão da produção de células pela medula óssea (URBINA, 2003), tornando o BZ a única droga de escolha para o tratamento dos pacientes (MUÑOZ et al., 2011).

O BZ é um fármaco nitroheterocíclico que atua por meio da formação de radicais livres e/ou metabólitos nucleofílicos pela redução do grupo nitro. Essa droga atua sobre as formas sanguíneas que estão presentes no meio extracelular (DOCAMPO & MORENO, 1984; URBINA & DOCAMPO, 2003). Entretanto, esses radicais também são capazes de interagir com biomoléculas celulares causando a oxidação de lipídios, proteínas e ácidos nucleicos, resultando em lesão ou morte de células do hospedeiro. Todavia, a relação risco benefício ainda se mostra favorável no tratamento da fase aguda da DC, visto que estudos clínicos tem

demonstrado efetividade aceitável do BZ em reduzir a parasitemia sanguínea, o parasitismo tecidual e as lesões em órgãos alvo, mesmo em casos onde a cura não é alcançada (CANÇADO, 2002; MUÑOZ et al., 2011).

5. VARIABILIDADE GENÉTICA DO *T. cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* apresenta populações amplamente heterogêneas, tanto do ponto de vista biológico quanto do ponto de vista genético (ZINGALES et al, 2009). Acredita-se que a reprodução predominantemente clonal seja responsável pela ampla variabilidade intraespecífica observada em *T. cruzi*, levando-o a evoluir de forma independente em áreas geográficas isoladas, acumular mutações e a adquirir características genéticas próprias (TIBAYRENC & AYALA, 1988; 2002). Também podem ocorrer eventos de hibridização ou de troca genética, contribuindo para a diversidade observada nas populações do parasito (CARRASCO et al., 1996; FREITAS et al., 2006).

A variabilidade genética entre as diferentes cepas de *T. cruzi* foi, ao longo dos anos, classificada de acordo com diferentes abordagens e receberam designações distintas, incluindo, os zimodemas (ROMANHA et al., 1979; MILES et al., 1981), biodemas (ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997), *clonets* (TIBAYRENC & AYALA, 1991), linhagens genéticas (SOUTO et al. 1996) e, mais recentemente, unidades de tipagens distintas (*discrete typing units*-DTU) (TIBAYRENC, 1998; ZINGALES et al., 2009), a fim de caracterizar sua estrutura populacional.

Em 2009, após o Consenso em doença de Chagas, com o intuito de padronizar e facilitar a nomenclatura das linhagens genéticas de *T. cruzi*, passaram a ser classificadas dentro de seis DTU, de TcI a TcVI (Tabela 1) (ZINGALES et al., 2009). Recentemente foi descrita uma sétima DTU, o TcBat isolada de morcegos que também é capaz de infectar humanos (ZINGALES et al., 2012).

TcI apresenta ampla distribuição geográfica, sendo isolada desde o Sul dos Estados Unidos até a Argentina. Essa DTU é a mais frequentemente isolada do ciclo de transmissão silvestre do parasito (MARCILI et al., 2009). Já TcII é a principal linhagem genética isolada do sangue de pacientes do Cone Sul da América do Sul e está relacionada ao ciclo doméstico de transmissão. Essa DTU está associada principalmente a manifestações cardíacas, podendo estar presente no megaesôfago e/ou megacólon, concomitantemente (ZINGALES et al., 2012).

TcIII está principalmente associada ao ciclo silvestre no Brasil e países vizinhos, e infecções humanas documentadas são raras. Assim como a TcIII, a DTU TcIV está associada

ao ciclo de transmissão silvestre e é responsável por surtos da DC aguda adquirida pela transmissão oral (MONTEIRO et al., 2013). As DTU TcV e TcVI são consideradas linhagens híbridas, pouco isoladas do ambiente silvestre mas, encontradas geralmente em pacientes ao sul da América do Sul (ZINGALES et al, 2012).

Tabela 1. Nomenclatura para as divisões de *Trypanosoma cruzi* conforme o consenso de 2009.

DTU	Abreviatura	Equivalência
<i>T. cruzi</i> I	TcI	<i>T. cruzi</i> I ^a e DTU I ^b
<i>T. cruzi</i> II	TcII	<i>T. cruzi</i> II ^a e DTU IIb ^b
<i>T. cruzi</i> III	TcIII	Z3/Z1 ASAT ^c , Z3-A ^d , DTU IIc ^b e <i>T. cruzi</i> III ^e
<i>T. cruzi</i> IV	TcIV	Z3 ^c , Z3-B ^d e DTU IIa ^b
<i>T. cruzi</i> V	TcV	Z2 Boliviano ^c , rDNA 1/2 ^f , clonot 39 ^g e DTU IId ^b
<i>T. cruzi</i> VI	TcVI	Z2 Paraguaio ^h e DTU IId ^b

a: Anonymous (1999); *b*: Brisse et al, (2000); *c*: Miles et al, (1981); *d*: Mendonça et al, (2002); *e*: Freitas et al, (2006); *f*: Souto et al, (1996); *g*: Tibayrenc e Ayala (1988); *h*: Chapman et al, (1984). Adaptado de Zingales et al, (2009). Algumas publicações têm sugerido uma subdivisão da DTU TcI em quatro subgrupos (Ia, b, c e d) (Falla et al, 2009).

6. PARASITISMO E TROPISMO TECIDUAL

A diversidade de alterações anatomopatológicas que o *T. cruzi* promove no hospedeiro vertebrado pode estar associada às características morfológicas da cepa, que podem apresentar um tropismo tecidual diferenciado no hospedeiro vertebrado (BRENER, 1979).

A distribuição tecidual preferencial de diferentes cepas do parasito foram estudadas por Brener (1977), e Melo & Brener (1978) em camundongos inoculados com as cepas Y, Berenice e ABC, e verificaram parasitismo preferencial para dois sistemas celulares distintos, o sistema mononuclear fagocitário do baço, fígado e medula óssea (cepas Y e Berenice), sendo essas chamadas de “macrofagotrópicas” e células musculares lisa, esquelética e cardíaca (cepas ABC e Berenice), denominadas “miotrópicas”.

A variação do tropismo tecidual também foi estudada por Andrade (1973) com 16 cepas coletadas no Recôncavo Baiano, e observou-se que essas apresentavam tropismo para o miocárdio, fígado e baço. Nunes et al. (1992), em estudos experimentais em camundongos, observaram intenso parasitismo hepático com a cepa Y (TcII) mas não com a cepa Colombiana

(TcI) de *T. cruzi*. Essas duas cepas analisadas apresentam características morfométricas e filogenéticas distintas.

A partir de análises histológicas de diferentes tecidos obtidos de hospedeiros na fase aguda da DC, foi observado parasitismo tecidual em diferentes órgãos. No entanto, na fase crônica, a lesão tecidual ocorre em órgãos específicos, que geralmente apresentam processo inflamatório intenso e fibrose, sendo a presença de parasitos escassa ou com pequenos ninhos de amastigotas. Os diferentes graus de tropismo nos órgãos podem estar relacionados com a heterogeneidade genética entre os isolados do parasito (TARLETON & ZHANG, 1999; VERA-CRUZ et al., 2003).

7. ENZIMAS HEPÁTICAS

O fígado tem função importante no metabolismo corporal e é responsável pelo processamento de aminoácidos, carboidratos, lipídios e vitaminas. Desse modo, as doenças hepáticas têm consequências graves e o comprometimento da função hepática tem sido relacionado com os sinais e sintomas da fase aguda da DC, em humanos e animais (LARANJA et al., 1948).

A dosagem sérica das enzimas hepáticas fornece indicadores sensíveis de lesão ou proliferação celular. Essas alterações detectadas auxiliam no monitoramento do tratamento e na progressão de doenças (FONSECA, 2006).

7.1. Aspartato aminotransferase

A aspartato aminotransferase (AST) ou transaminase glutâmico-oxalacética (TGO) é uma enzima encontrada em grandes concentrações no músculo cardíaco, no fígado, músculos esqueléticos e em menor concentração nos rins e pâncreas (WILLIAMS et al., 1988). Nas células hepáticas, a AST localiza-se no citoplasma (40%) e na mitocôndria (60%). Por ser uma enzima mitocondrial e citossólica, necessita de uma lesão maior para ser liberada na corrente sanguínea (PEREZ et al., 1996). Sempre que ocorrer uma lesão ao nível hepatocelular haverá uma grande liberação da enzima AST para a corrente sanguínea, elevando seus níveis séricos (BERGMEYER et al., 1978).

Os níveis de AST podem estar aumentados em graus de leve a moderado, provavelmente refletindo a necrose hepática secundária ao suprimento sanguíneo inadequado do fígado. Também pode apresentar pequenos aumentos em enfermidades hemolíticas, distrofia muscular progressiva e infecção por parasitos (COHEN & KAPLAN, 1979).

7.2. Alanina aminotransferase

A alanina aminotransferase (ALT) ou transaminase glutâmico-pirúvica (TGP) é uma enzima encontrada em maiores concentrações no fígado, rim e em pequenas quantidades no coração e na musculatura esquelética. Sua origem é predominantemente citoplasmática, fazendo com que se eleve rapidamente após a lesão hepática, tornando-se um marcador sensível da função do fígado (GELLA, 1994).

A ALT tem como principal característica funcional ser um bom indicador de doenças hepáticas agudas (doenças hepatocelulares, necrose hepática, obstrução biliar, intoxicação e infecções parasitárias) (GONZÁLEZ e SILVA, 2006).

7.3. Fosfatase alcalina

A fosfatase alcalina (ALP) é uma enzima presente em praticamente todos os tecidos do organismo, especialmente nas membranas das células dos túbulos renais, trato intestinal e fígado. Níveis elevados de ALP podem ser encontrados em lesões hepáticas ativas e infiltrativas com níveis moderados de elevação (KRAMER & HOFFMANN, 1997). O aumento dessa enzima é um importante indicativo de colestase hepática. As doenças colestáticas incluem: obstrução parcial dos ductos biliares, cirrose biliar primária, colangite esclerosante e colestase causada por drogas, demonstrando a necessidade de dosar tal enzima (MINCIS & MINCIS, 2006).

8. ESTRESSE OXIDATIVO

Corresponde ao desequilíbrio entre o sistema de defesa antioxidante e a geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) ou de nitrogênio (ERNs). Esse desequilíbrio resulta na oxidação de importantes biomoléculas (lipídios, proteínas, carboidratos e DNA). Substâncias oxidantes e antioxidantes são geradas em um cenário de reações de óxido-redução, onde a oxidação implica em perda de elétrons e a redução em ganho. As espécies reativas, que são geradas tanto por sistemas enzimáticos como não enzimáticos, têm sido envolvidas não apenas em grande número de processos fisiológicos, mas também não fisiológicos durante a iniciação e progressão de doenças (SANTOS et al., 2009).

O excesso de espécies reativas é combatido por antioxidantes produzidos pelo corpo ou absorvidos da dieta. Os antioxidantes são substâncias que, quando em baixas concentrações comparadas ao substrato oxidável, regenera o substrato, ou previne a oxidação do mesmo (HALLIWELL, 2000). Os antioxidantes que são produzidos pelo corpo são os enzimáticos como a glutathione peroxidase, a catalase e a superóxido dismutase e os não enzimáticos como

a glutathione. Além dos antioxidantes produzidos pelo corpo, o organismo utiliza os provenientes da dieta como o α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C) e compostos fenólicos (FRANCISCO, 2011).

O estresse oxidativo (EO) ocorre quando a magnitude da produção de espécies reativas supera a capacidade antioxidante, o que resulta em oxidação de lipídios (lipoperoxidação), proteínas (carbonilação e/ou nitração), carboidratos (carbonilação) e DNA (oxidação de bases nitrogenadas) (FERREIRA et al., 2011). A lesão desses importantes componentes celulares leva à alteração da estrutura química, da função e à morte celular (GUPTA et al., 2009).

O *T. cruzi* está exposto a diferentes EROs geradas pelo metabolismo aeróbico do parasito, diante da resposta imune do hospedeiro e também, em alguns casos, as EROs são liberadas por fármacos usados no tratamento de pacientes com DC (DOCAMPO, 1990; TURRENS, 2004). Assim, durante o curso da infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer o EO, resultante da destruição tecidual pelas secreções tóxicas do parasito, pela resposta imune citotóxica mediada por linfócitos T (MARTINS et al., 1998) ou por danos secundários à mitocôndria (CARDOSO et al., 1999).

Neste contexto, são necessárias investigações mais abrangentes com o intuito de compreender as reações que o tratamento com BZ pode causar no hospedeiro e a influência da via de inoculação no desfecho da infecção por diferentes cepas de *T. cruzi* em camundongos, incluindo a infecciosidade, carga parasitária, tropismo tecidual e comprometimento hepático.

9. JUSTIFICATIVA

Estudos sobre a biologia de *T. cruzi* realizados por diferentes pesquisadores, incluindo a nossa equipe, apontam para uma ampla diversidade comportamental, sendo ela influenciada por diversos fatores do parasito como cepa ou linhagem genética e origem dos tripomastigotas (formas infectantes), associados a outros fatores como via de inoculação, volume e concentração do inóculo, os quais podem influenciar no curso da infecção (DIAS et al., 2013). Sua variabilidade genética pode também influenciar sua virulência, tropismo tecidual e capacidade de dispersão na natureza (MEZA et al. 2014; ABEGG et al. 2017). Trabalho pioneiro de Andrade (1973) analisou diferentes cepas obtidas no Recôncavo Baiano, em área endêmica no Brasil, e mostrou que elas apresentavam tropismos para as células do miocárdio, fígado e baço. No entanto, só é possível visualizar células parasitadas (contendo ninhos de amastigotas) em diferentes órgãos (coração, músculo esquelético e outros) pelos quais o parasito apresenta tropismo, através de análises histológicas (TARLETON & ZHANG, 1999).

Nas infecções experimentais com *T. cruzi*, há relatos de comprometimento hepático e a presença de parasitos viáveis no fígado de camundongos infectados (SARDINHA et al., 2006). Tropismo tecidual diferenciado já foi observado em camundongos inoculados por *T. cruzi* e as cepas Y e Berenice 62 (ambas classificadas como TcII) mostraram elevado tropismo pelo fígado e baço, além do coração (MELO & BRENER, 1978). Comparando a patogenicidade de cepas TcIV do Norte do Brasil (Amazonas) com cepas TcII do Sul (Paraná) para camundongos, parasitismo de intensidade moderada foi observado no cérebro (cepa AM62, TcIV) e coração (BS48, TcII) indicando tropismo preferencial de TcIV para o sistema nervoso central e TcII para o miocárdio. Também foi possível detectar parasitismo, porém de intensidade leve, pela cepa TcIV em todos os tecidos analisados (fígado, músculo esquelético, músculo liso, baço, parede abdominal e coração) e por TcII no músculo cardíaco e esquelético (MEZA et al. 2014) Tendo em vista a relevância do fígado como sítio de migração e controle do parasito, é importante a avaliação da função hepática mediante dosagens laboratoriais do soro desses animais.

Em infecções experimentais de camundongos pela via intraperitoneal (IP), classicamente e majoritariamente a mais utilizada, a resposta ao tratamento etiológico com BZ pode variar de acordo com o genótipo clonal de *T. cruzi* (TOLEDO et al., 2003), bem como com a DTU (TESTON et al., 2012; MONTEIRO et al., 2013; GRUENDLING et al., 2015), além do tratamento com BZ induzir a um aumento do estresse oxidativo no parasito (FRANCISCO, 2011).

Vários estudos têm demonstrado que parcela significativa de pacientes tratados com BZ, apresentaram algum tipo de reação adversa durante o tratamento, sendo verificado prurido, astenia, *rash* cutâneo e descamação da pele, além de alterações hematológicas e enzimáticas (PONTES et al., 2010). Alterações enzimáticas como o aumento nos níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), já foram observadas em camundongos BALB/c, inoculados pela via oral com a cepa Tulahuén (TcVI) e não tratados (ALBUQUERQUE et al., 2015). Estes autores verificaram ainda que quando a infecção ocorre por VO ou intragástrica, ela estimula uma resposta imune que pode levar à uma infecção mais severa quando comparada com a via intraperitoneal (IP), afetando de forma mais intensa, além do coração, o fígado do animal. Embora a via de inoculação IP seja a mais utilizada em estudos experimentais, a forma mais comum de aquisição da infecção pelo *T. cruzi* na natureza é através da transmissão oral. Estas alterações enzimáticas também foram observadas em camundongos Swiss inoculados pela via IP com a cepa Y (TcII) e tratados com BZ por 20 dias (SARTINI, 2015). Portanto, diante do exposto, se faz necessário avaliar o real impacto da infecção oral e

do tratamento com BZ, separadamente ou ao mesmo tempo, nas enzimas hepáticas de camundongos infectados com *T. cruzi*.

São escassos os estudos sobre as dosagens enzimáticas e estresse oxidativo após tratamento da DC. Neste contexto, são necessárias investigações mais abrangentes com o intuito de compreender as reações que o tratamento pode causar no hospedeiro, e a influência da via de inoculação na evolução da infecção e na resposta ao tratamento de camundongos com cepas de *T. cruzi* de diferentes DTU, incluindo a infecciosidade, carga parasitária, tropismo tecidual e comprometimento hepático.

10. OBJETIVOS

10.1. Geral

Realizar avaliações parasitológicas, bioquímicas (dosagem de enzimas hepáticas e estresse oxidativo) e histopatológicas em camundongos inoculados por via oral e intraperitoneal com *T. cruzi* II (TcII) e *T. cruzi* IV (TcIV) submetidos ao tratamento com BZ durante a fase aguda da infecção.

10.2. Específicos

Comparar a evolução da parasitemia (exame de sangue a fresco) e a carga parasitária (qPCR) em camundongos inoculados por diferentes vias e DTU do parasito, tratados e não tratados com BZ.

Avaliar o dano hepático destes animais através de parâmetros plasmáticos (dosagem das enzimas AST, ALT e ALP) e de parâmetros de estresse oxidativo do fígado.

Realizar avaliações histopatológicas desses animais, determinando a intensidade do processo inflamatório, do parasitismo e o tropismo tecidual.

Avaliar a correlação entre tropismo tecidual das cepas e possíveis alterações enzimáticas.

11. REFERÊNCIAS

- ABEGG, CP et al. Polymorphisms of blood forms and in vitro metacyclogenesis of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **Experimental Parasitology**, v. 176, p.8-15, maio 2017.
- ALBUQUERQUE, JB. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice New Disease Form from an Old Infection? **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 6, 2015.
- ALBUQUERQUE, JB. Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* e *Listeria monocytogenes*. 2017. 180 f. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2017. Cap. 1.
- ANDRADE, SG. Caracterização das cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. 1973. Tese (Doutorado) - Universidade da Bahia, Salvador, 1973. p. 123.
- ANDRADE, SG. Caracterização de cepas do *Trypanozoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p.65-121, 1974.
- ANDRADE, SG; MAGALHÃES, JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, p. 27-35, 1997.
- ANONYMOUS. Recommendations from a satellite meeting. **Memórias do Instituto do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 429-432. 1999.
- ARGOLO, AM et al. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil. Fundação Oswaldo Cruz. Programa Integrado de Doença de Chagas (PIDC). Instituto Oswaldo Cruz. Ação comemorativa do centenário de descoberta da doença de Chagas. Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro. Rio de Janeiro, 2008.
- BARBOSA, PRB. The oral transmission of Chagas' disease: An acute form of infection responsible for regional outbreaks. **International Journal of Cardiology**, v. 112, n. 1, p.132-133, set. 2006.
- BERGMEYER, HU; SCHEIBE, P; WAHLEFELD. AW. **Clinical Chemistry**, v.24, p.58, 1978.
- BRASIL. SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE | MINISTÉRIO DA SAÚDE. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, n. 2, p.1-10, jan. 2019. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>>. Acesso em: 01 fev. 2019.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annual Review of Microbiology** v. 27, p. 347-382, 1973.
- BRENER, Z. Variações intraespecíficas do *Trypanosoma cruzi*: dois tipos de populações de parasitas que apresentam características distintas. Doença de Chagas. Organização Pan-Americana da Saúde, Publicações Científicas n. 347, p. 11-21, 1977.

BRENER, Z; ANDRADE, Z. (Org.) - *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.

BRISSE, S; BARNABÉ, C; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. **International Journal for Parasitology**, v. 30, p. 35-44, 2000.

CANÇADO, JR. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 44, n. 1, p.29-37, fev. 2002.

CARDOSO, SM; PEREIRA, C; OLIVEIRA, CR. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 26, n. 1-2, p.3-13, jan. 1999.

CARRASCO, HJ et al. Genetic exchange as a possible source of genomic diversity in sylvatic populations of *Trypanosoma cruzi*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, p.418-424, 1996.

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

CHAPMAN, MD et al. *Trypanosoma cruzi* from the Paraguayan Chaco: isoenzyme profiles of strains isolated at Makthlawaiya. **The Journal of Protozoology**, v. 31, p. 482-486, 1984.

COHEN, JA, KAPLAN, MM The SGOT/SGPT ratio an indicator of alcoholic liver disease. **Digestive Diseases and Sciences**, v.24, p. 835-8, 1979.

COURA, JR et al. Estudo comparativo controlado com emprego de benznidazole, nifurtimox e placebo na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 2, p.139-144, abr. 1997.

DIAS, GBM et al. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. **Experimental Parasitology**, v.135, p. 511-517, 2013.

DOCAMPO, R; MORENO, SNJ. Free Radical Metabolites in the Mode of Action of Chemotherapeutic Agents and Phagocytic Cells on *Trypanosoma cruzi*. **Clinical Infectious Diseases**, v. 6, n. 2, p.223-238, 1 mar. 1984.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-biological Interactions**, v. 73, n. 1, p.1-27, 1990.

FREITAS, JM et al. Ancestral Genomes, Sex, and the Population Structure of *Trypanosoma cruzi*. **Plos Pathogens**, v. 2, n. 3, p.226-235, 2006.

FALLA, A et al. Haplotype identification within *Trypanosoma cruzi* I in Colombian isolates from several reservoirs, vectors and humans. **Acta Tropica**, v. 110, p. 15-21, 2009.

FERREIRA, ALA et al. Síndrome metabólica: atualização de critérios diagnósticos e impacto do estresse oxidativo na patogênese. **Revista Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 9, n. 1, p.54-61, jan. 2011.

FONSECA, C. Estudo Bioquímico, Morfológico e Morfométrico em órgãos de camundongos infectados pela cepa MC de *Trypanosoma cruzi*. 2006. 146 f. Tese (Doutorado) - Curso de Parasitologia, Instituto de Biologia da Unicamp, Campinas, 2006.

FRANCISCO, AF. Estresse Oxidativo, defesas antioxidantes e processo inflamatório na fase aguda da doença de Chagas experimental. 2011. 114 f. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto, Ouro Preto, 2011.

GELLA J. 1994. Enzimologia clínica. In: SASTRE FG. Bioquímica clínica. Barcelona, p. 113-124.

GONZÁLEZ, FHD; SILVA, SC. Introdução à Bioquímica Clínica Veterinária. Porto Alegre: Gráfica da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, 2006, 357p.

GRUENDLING, AP et al. Impact of Benznidazole on Infection Course in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 6, p.1178-1189, 4 mai. 2015.

GUPTA, S; WEN, J; GARG, NJ. Oxidative Stress in Chagas Disease. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, v. 2009, p.1-8, 2009.

HALLIWELL, B. Lipid peroxidation, antioxidants and cardiovascular disease: how should we move forward? **Cardiovascular Research**, v. 47, p.410-418, 2000.

HIGUCHI, ML et al. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. **Cardiovascular Research**, v. 60, n. 1, p.96-107, 15 out. 2003.

KRAMER, JW; HOFFMANN, WE. Clinical Enzymology. In: KANEKO, JJ; HARVEY, JW; BRUSS, ML. **Clinical Biochemistry of Domestic Animals**. 5 ed. London: Academic Press, p.303-325, 1997.

LARANJA, FS; DIAS E; NÓBREGA, G. Clínica e terapêutica da doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.46, p.473-499, 1948.

MAGALHÃES-SANTOS, IF. Transmissão oral da doença de Chagas: breve revisão. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, v. 13, n. 2, p.226-236, 2014.

MARCILI, A et al. *Trypanosoma cruzi* in Brazilian Amazonia: Lineages TcI and TcII a in wild primates, *Rhodnius* spp. and in humans with Chagas disease associated with oral transmission. **International Journal for Parasitology**, v. 39, n. 5, p.615-623, abr. 2009.

MARTINS, G et al. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunology Letters**, v. 63, n. 2, p.113-120, set. 1998.
MARIN-NETO, JA et al. Pathogenesis of Chronic Chagas Heart Disease. **Circulation**, v. 115, n. 9, p.1109-1123, 6 mar. 2007.

MELO, R C; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **Journal of Parasitology**, v. 63, n. 3, p.475-482, jan. 1978.

MENDONÇA, MBA et al. Two main clusters within *Trypanosoma cruzi* zymodeme 3 are defined by distinct regions of the ribosomal RNA cistron. **Parasitology**, v. 124, p. 177-184, 2002.

MEZA, SKL et al. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. **Experimental Parasitology**, v. 146, p.34-42, nov. 2014.

MILES, MA; SOUZA, AA; PÓVOA, MM. Chagas' disease in the Amazon Basin. III. Ecotopes of ten triatomine bug species (Hemiptera, Reduviidae) from the vicinity of Belém, Pará State, **Brazilian Journal of Medicine Entomology**, v. 18, p. 266-78, 1981.

MINCIS, M. MINCIS, R. Enzimas hepáticas: aspectos de interesse prático. **Revista Brasileira de Medicina**, p.56-60, jan. 2006.

MONTEIRO, WM et al. *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon Are Divergent in Terms of Biological and Medical Properties in Mice. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, 2013.

MUÑOZ, MJ; MURCIA, L; SEGOVIA, M. The urgent need to develop new drugs and tools for the treatment of Chagas disease. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 9, p. 5-7, 2011.

NUNES, MP; SOBRAL AC; COUTINHO, SG. Quantification of *Trypanosoma cruzi* in heart, lymph nodes and liver of experimentally infected mice, using limiting diluting analysis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 87, p.503-9, 1992.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE: OPAS. Doença de Chagas nas Américas: uma revisão da situação atual da saúde pública e uma visão para o futuro. Conclusões e Recomendações. **OPAS**, Washington, D.C., p.1-18, maio 2018.

PEREZ, R et al. Actividad física y cambios cardiovasculares e bioquímicos del caballo chileno a la competencia de rodeo. **Archivos de Medicina Veterinária**, v.47, p. 2461-2463, 1996.

PONTES, VMO et al. Reações adversas em pacientes com doença de Chagas tratados com benzonidazol, no Estado do Ceará. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 2, p.182-187, mar. 2010.

RASSI JUNIOR, A; RASSI, A; MARIN-NETO, JA. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p.1388-1402, abr. 2010.

RIBEIRO, ALP; ROCHA, MOC. Forma indeterminada da doença de Chagas: considerações acerca do diagnóstico e do prognóstico. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 31, n. 3, p.301-314, jun. 1998.

REY, L. **Bases da Parasitologia Médica**. 3. ed. Guanabara Koogan, 2011.

ROMANHA, AJ et al. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi* changes after prolonged subculture. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 62, p. 139-42, 1979.

SANTOS, CXC et al. Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport, and NADPH Oxidase. **Antioxidants & Redox Signaling**, v. 11, n. 10, p.2409-2427, out. 2009.

SARDINHA, LR; ELIAS, RM; MARINHO, MRL. Contribution of NK, NK T, T, and $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T Cells to the Gamma Interferon Response Required for Liver Protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v. 74, n. 4, p. 2031-2042, 2006.

SARTINI, MVP. Avaliação pré-clínica da combinação de benznidazol e curcumina no tratamento etiológico da infecção por *T. cruzi*. 57 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biociências Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, 2015.

SHIKANAI-YASUDA, MA; CARVALHO, NB. Oral Transmission of Chagas Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 54, n. 6, p.845-852, 11 jan. 2012.

SILVEIRA, AC; REZENDE, DE. Epidemiologia e controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 27, p.11-22, 1994.

SOUTO, R. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 83, n. 2, p.141-152, 20 dez. 1996.

TARLETON, RL; ZHANG, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? **Parasitology Today**, v. 15, n.3, p. 94-8, 1999.

TESTON, APM et al. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. **Tropical Medicine & International Health**, v. 18, n. 1, p.85-95, 6 nov. 2012.

TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. **International Journal for Parasitology**, v. 28, p.85-104, jan. 1998.

TIBAYRENC, M; AYALA, FJ. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease: genetical, taxonomical, and epidemiological significance. **Evolution**, v.42, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M; AYALA, FJ. Towards a population genetics of microorganisms: The clonal theory of parasitic protozoa. **Parasitology Today**, v. 7, n. 9, p.228-232, jan. 1991.

TIBAYRENC. M; AYALA, FJ. The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. **Trends in Parasitology**, v. 18, p. 405-410, 2002.

TIMM, BL. Avaliação do potencial terapêutico de novos agentes tripanocidas sobre o *Trypanosoma cruzi*. 2014. 85 f. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2014. Cap. 1.

TOLEDO, MJO et al. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v. 47, n. 1, p.223-230, jan. 2003.

TORRES, CM. Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Belo Horizonte, v. 36, n. 3, p.391-404, nov. 1941.

TURRENS, JF. Oxidative stress and antioxidant defenses: a target for the treatment of diseases caused by parasitic protozoa. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 25, n. 1-2, p.211-220, fev. 2004.

URBINA, JA; DOCAMPO, R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p.495-501, nov. 2003.

VERA-CRUZ, JM et al. Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. **Parasitology Research**, v. 89, n. 6, p.480-486, abr. 2003.

WILLIAMS, A; HOOFNAGLE, JH. Ratio of serum aspartate to alanine aminotransferase in chronic hepatitis. **Gastroenterology**, v. 95, p. 734-9, 1988.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet. 2018. Disponível em: <[https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis))>. Acesso em: 01 fev. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION: WHO. Global distribution of cases of Chagas disease, based on official estimates, 2006–2010. 2010. Disponível em: <https://www.who.int/chagas/Global_distribution_Chagas_disease_2006_2010.pdf?ua=1>. Acesso em: 7 fev. 2019.

ZINGALES, B et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 104, n. 7, p.1051-1054, nov. 2009.

ZINGALES, B et al. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. *Evolution, Genetics and Infection?* **Elsevier**, v. 12, p. 240–253. 2012.

CAPÍTULO II

Artigo 1: “Alterações hepáticas em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com benzonidazol”

Alterações hepáticas em camundongos inoculados por via oral com *Trypanosoma cruzi* II e IV e tratados com benzonidazol

Hevillyn Fernanda Lucas da Silva^a; Marcella Paula Mansano Sarto^a; Ana Paula de Abreu^a;
Aline Francieli da Silva^b; Jurandir Fernando Comar^b; Max Jean de Ornelas Toledo^{a,c}

^a Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

^b Departamento de Bioquímica, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Estadual de Maringá.

^c Departamento de Ciências Básicas da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá.

Hevillyn Fernanda Lucas da Silva, hevillyn@gmail.com

Marcella Paula Mansano Sarto, sarto.m@outlook.com

Ana Paula de Abreu, ana.paula.abreu@hotmail.com

Aline Francieli da Silva, alline.francieli@gmail.com

Jurandir Fernando Comar, jfcomar@uem.br

Max Jean de Ornelas Toledo, mjotoledo@uem.br

* Corresponding author: Max Jean de Ornelas Toledo.

Avenida Colombo 5790, Jardim Universitário, 87 020-900, Maringá, Paraná, Brazil. Tel.: +55 xx 44 3011 8991; Fax: +55 xx 28 44 3011 4860; E-mail: mjotoledo@uem.br

Destaques

- As infecções de camundongos pelas cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) de *T. cruzi* pelas vias oral e intraperitoneal causaram mais danos hepáticos que o tratamento etiológico com benzonidazol.
- O benzonidazol causa alterações hepáticas quando administrado em camundongos não infectados, aumentando a atividade das enzimas AST e ALT.
- O tratamento com benzonidazol nos animais infectados pela via oral com a cepa Y (TcII) reverteu para os níveis normais as enzimas AST e ALT.

- O tratamento com benzonidazol reduziu o estresse oxidativo nos camundongos infectados com a cepa Y (TcII), promovendo benefícios aos animais tratados.

Resumo

O *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana, que consiste em um sério problema de saúde pública, principalmente na América Latina. O miocárdio é o principal alvo do parasito, entretanto, lesões no fígado também têm sido relacionadas à fase aguda da infecção. A infecção pela via oral, através da ingestão de alimentos contaminados, tem sido a forma de transmissão mais frequente, levando à uma doença mais severa. O benzonidazol (BZ), utilizado no tratamento da DC, apresenta reações adversas importantes, com potencial de induzir toxicidade hepática. O objetivo deste estudo foi avaliar o impacto de infecção por via oral (VO) e do tratamento com BZ, separadamente e ao mesmo tempo, sobre as alterações hepáticas de camundongos inoculados com *T. cruzi* II e IV. Para isto, grupos de camundongos swiss foram inoculados por via oral (VO) e por via intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura das cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) de *T. cruzi*. O tratamento com BZ 100 mg/Kg/dia foi realizado a partir do 5º dia de infecção, por 20 dias consecutivos. Para se confirmar a infecção e os efeitos do tratamento, os animais foram submetidos ao exame de sangue a fresco (ESF), qPCR qualitativa e quantitativa em sangue e avaliações bioquímicas (dosagens enzimáticas e estresse oxidativo). A análise dos parâmetros parasitológicos derivados da curva de parasitemia mostrou que os animais infectados com a cepa Y por VO apresentaram maior valor apenas 1/6 parâmetros que nos animais IP, indicando maior virulência da infecção por esta última. Naqueles infectados com a cepa AM14, 2/6 parâmetros foram significativamente maiores, indicando maior virulência da via IP também com esta cepa. A dosagem das enzimas hepáticas mostrou que os níveis de aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP), independentemente da via de inoculação, estavam mais elevados na infecção pela cepa Y em relação a cepa AM14. O tratamento com BZ dos animais controles não infectados causou aumento da atividade das enzimas AST e ALT mostrando que a droga sozinha afeta o fígado. O que também também foi confirmado pelo aumento do estresse oxidativo (EO) do fígado destes animais, demonstrado pelo aumento dos grupos carbonila das proteínas. Podemos concluir que as infecções de camundongos pela via IP com as cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) foram mais virulentas do que as infecções adquiridas por VO. Comparando as cepas, vimos que na VO não houveram diferenças significativas, mas na infecção por via IP, a cepa Y se mostrou mais virulenta. As infecções pelas cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) de *T. cruzi* pelas vias oral e

IP causaram mais danos hepáticos que o tratamento etiológico. Entretanto, o tratamento com BZ reduziu os parâmetros de EO para a cepa Y, promovendo benefícios aos animais tratados.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, doença de Chagas oral, benzonidazol, qPCR, aminotransferases, estresse oxidativo.

1. Introdução

O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à ordem *Kinetoplastida* e família *Trypanosomatidae*, agente etiológico da doença de Chagas (DC) ou tripanossomíase americana [1]. Atualmente, este parasito infecta aproximadamente 8 milhões de pessoas em todo o mundo, principalmente em países da América Latina [2]. A prevalência da DC é maior nos países onde a transmissão de *T. cruzi* ocorre através da via vetorial, seja ela clássica após o repasto sanguíneo dos triatomíneos, ou pela ingestão do vetor e/ou suas fezes trituradas em alimentos [3]. A transmissão oral embora acidental, emergiu como a principal forma de transmissão da DC no Brasil, sendo responsável por 73% dos novos casos [4]. A maioria (95 a 98%) dos pacientes na fase aguda da DC é assintomática [5]. No entanto, podem ocorrer miocardite e meningoencefalite, que levam à morte, principalmente de crianças. Além de febre, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia. Durante a fase crônica, 50-70% dos infectados são assintomáticos (forma indeterminada), 25- 30% dos pacientes apresentam a forma cardíaca e 12 a 15% manifestações digestivas [6].

O *T. cruzi* apresenta populações amplamente heterogênicas, composta por uma variedade de cepas que circulam nos ciclos doméstico e silvestre entre insetos vetores, seres humanos e reservatórios animais [7,8]. As linhagens genéticas do parasito são classificadas dentro de seis unidades de tipagens distintas (DTU), de TcI a TcVI [9]. Recentemente foi descrita a sétima DTU, o TcBat isolada de morcegos que também é capaz de infectar humanos. Estas DTU podem apresentar distribuição geográfica diferente e estar associadas a aspectos clínico-epidemiológicos distintos. TcII, por exemplo, é frequentemente isolada do sangue de pacientes crônicos e está associada ao ciclo doméstico de transmissão nos países do Cone Sul da América do Sul, onde predominam manifestações cardíacas da doença, mas também digestivas. Já TcIV está associada ao ciclo de transmissão silvestre e causa surtos agudos de doença de Chagas oral na Região Amazônica, onde a forma digestiva é rara ou ausente [10,11].

A via de transmissão oral (VO) é, provavelmente, a estratégia mais antiga para a dispersão de *T. cruzi* entre os mamíferos. Entretanto, a via de inoculação intraperitoneal (IP) é a mais utilizada na infecção experimental, principalmente de camundongos. Entre os fatores relacionados ao parasito que podem influenciar na evolução da infecção experimental se encontram a origem dos tripomastigotas (formas infectantes), a via de inoculação, volume e concentração do inoculo, a DTU do parasito, dentre outros [12]. As cepas de *T. cruzi* podem apresentar tropismo tecidual diferenciado sendo classificadas como miotrópicas, parasitando preferencialmente tecidos muscular ou, macrofagotrópicas quando parasitam órgãos linfoides [13]. O que é o caso das cepas Y e Berenice 62 de *T. cruzi* que, além do miocárdio, causaram

intenso parasitismo tecidual no fígado e baço de camundongos albinos inoculados pela via IP com 100.000 tripomastigotas sanguíneos (TS).

Por outro lado, foi verificado que durante a fase aguda da infecção experimental de camundongos BALB/c com 1.000 TS da cepa Y de *T. cruzi* (via de inoculação não descrita), embora formas amastigotas tenham sido raramente encontradas no fígado, a inflamação foi comumente observada, indicando que este órgão é também afetado [14]. O parasito está exposto à espécies reativas ao oxigênio tanto geradas pelo seu metabolismo aeróbico, frente à resposta imune do hospedeiro, quanto liberadas por fármacos utilizados no tratamento da DC [15]. Assim, a infecção pelo *T. cruzi* pode cursar com estresse oxidativo (EO) tecidual, que associado às secreções tóxicas dos parasitos e à resposta imune citotóxica, pode contribuir para a destruição tecidual [16, 17].

No tratamento etiológico da DC, é utilizado o benzonidazol (BZ), derivado nitroheterocíclico que apresenta baixa eficácia durante a fase crônica e reações adversas importantes, além de alterações das enzimas hepáticas [18]. Já foi demonstrado, experimentalmente *in vivo*, que a resposta ao tratamento com BZ pode variar de acordo com o genótipo de *T. cruzi* [19, 20] bem como com sua DTU [11, 21, 22]. Além de alterar os níveis de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), o tratamento com BZ de camundongos inoculados por via IP com inóculo tão baixo quanto 500 TS, também induz um aumento do EO [23]. No sangue de camundongos BALB/c inoculados por VO com a cepa Tulahuén (TcVI), mas não submetidos ao tratamento com BZ, foi observado aumento das enzimas AST e ALT [24]. Estes autores verificaram ainda que na infecção por VO ou intragástrica, a resposta imune estimulada pode levar à uma infecção mais severa em comparação com a via IP, afetando o coração e, de forma mais intensa, o fígado do animal.

Diante do exposto, nosso objetivo foi investigar o impacto da via de inoculação (VO e IP) e do tratamento com BZ nas alterações parasitológicas e bioquímicas de camundongos inoculados com *T. cruzi* II (cepa Y, macrofagotrópica) e IV (cepa AM14, não macrofagotrópica) durante a fase aguda da infecção.

2. Materiais e métodos

2.1. Aspectos éticos

O uso, manutenção e cuidados com os camundongos seguiram as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e a pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentação (CEUA) da UEM (parecer número 9659251017/2017). Os animais eram mantidos em gaiolas de polietileno (dimensões

de 20x32x21 cm) em estantes microambientadas (AL20 - Alesco®) com água e ração *ad libitum* e ciclo de claro e escuro (12/12h). Para a coleta dos órgãos (coração, fígado e baço) os animais foram submetidos a eutanásia por aprofundamento anestésico com administração intraperitoneal de ketamina (Fagra®, Rhobipharma, Brasil) (50 mg/kg) associado a xilazina (Anasedan, CEVA, Brasil) (10 mg/kg).

2.2. Cepas de *T. cruzi*

Foram utilizadas duas cepas de *T. cruzi* que apresentam propriedades biológicas distintas, principalmente em relação ao tropismo tecidual e linhagem genética. A cepa Y apresenta tropismo por órgãos linfóides parasitando, preferencialmente, fígado e baço, além do coração [13] e foi genotipada como TcII [9]. Esta cepa, altamente virulenta para camundongo albino, foi considerada parcialmente resistente a droga (BZ e nifurtimox) em animais inoculados por via IP com formas TS [25, 26] e resistente ao BZ em camundongos inoculados por VO com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura (TMC)/animal [27]. A cepa AM14, proveniente de paciente em fase aguda de um surto de doença de Chagas oral no Amazonas, foi classificada como TcIV [11]. Seu tropismo tecidual não foi estabelecido, uma vez que nos camundongos inoculados, não foram detectadas amastigotas nos órgãos examinados. Entretanto, em 3/10 cepas TcIV avaliadas, incluindo a AM14, parasitismo tecidual foi observado principalmente no coração e cérebro [22, 28]. A cepa AM14, considerada de baixa virulência para camundongo [22, 29], foi resistente ao BZ na infecção com inóculo de 2×10^6 TMC/animal, tanto por via IP quanto na por VO [30]. Ambas as cepas se encontram criopreservadas em nitrogênio líquido na Coleção de Tripanosomatídeos do Laboratório de doença de Chagas da Universidade Estadual de Maringá (UEM).

2.3. Inoculação dos animais

Foram utilizados 60 camundongos swiss, machos, de 21 e 28 dias, provenientes do Biotério Central da UEM. Vinte animais foram inoculados por VO e 20 por via IP, com 2×10^6 TMC em 1,0 mL de meio LIT, com cada uma das cepas [12]. Os animais VO eram deixados em jejum por cerca de 12h antes de serem inoculados. Os 20 animais restantes, não foram inoculados e serviram como controles não infectados.

2.4. Grupos experimentais

Os animais foram distribuídos em seis subgrupos de 10 animais cada, como a seguir: 1) Controle não infectado e não tratado (CNI); 2) Controle não infectado e tratado (NI+BZ); 3)

Infectado por VO e não tratado (VONT); 4) Infectado por VO e tratado (VO+BZ); 5) Infectado por via IP e não tratado (IPNT); e 6) Infectado por via IP e tratado (IP+BZ).

2.5. Tratamento etiológico

O tratamento etiológico ou específico consistiu na administração da dose de 100 mg/kg/dia de BZ (LAFEPE®, Pernambuco, Brasil) por gavagem, durante 20 dias consecutivos, iniciando-se o tratamento no 5º dia de infecção (d.i.). Todos os grupos infectados, ~ 48h após o término do tratamento com BZ, foram submetidos a imunossupressão com ciclofosfamida (Cy, Genuxal, Baxter, Brasil) na dose de 50 mg/kg/dia, por 4 dias consecutivos na primeira semana e por 3 dias alternados nas duas semanas seguintes [31].

2.6. Avaliações parasitológicas

2.6.1. Exame de sangue a fresco (ESF): Este teste foi realizado em todos os animais inoculados antes, durante e após o tratamento com BZ para se confirmar a infecção e traçar a curva de parasitemia. Esta foi avaliada diariamente a partir do 3º d.i. até a negatificação por 3 dias consecutivos [32]. A parasitemia também foi avaliada, em dias alternados, durante e após a administração do agente imunossupressor (Cy) para se verificar a reativação da infecção, caracterizada pela volta da parasitemia patente e aumento da mortalidade. A partir de curva de parasitemia média, foram obtidos os seguintes parâmetros: período pré-patente (PPP), primeiro dia que o ESF positivo foi detectado; período patente médio (PP), média dos períodos em que cada animal teve a parasitemia detectada pelo ESF; pico máximo de parasitemia (Pmax), média obtida a partir do pico de parasitemia detectada para cada animal; e dia do pico máximo (Dpmax), média dos dias em que cada animal teve a o pico de parasitemia detectada. Com os resultados deste teste foi obtido a porcentagem de animais com o ESF positivo (%ESF+).

2.6.2. Reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR): A qPCR foi realizada para detecção de DNA de *T. cruzi* e quantificação da carga parasitária sanguínea. O DNA foi extraído pelo método fenol/clorofórmio, como descrito por Caldas et al. [33] e modificado por Gruendling et al. [22]. O DNA obtido foi analisado através do kit QuantiNova SYBR Green PCR (Quiagen) com 100 ng de DNA genômico total, utilizando os iniciadores TCZ-F (5' – GCTCTTGCCACAMGGGTGC–3') e TCZ-R (5' –CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG–3') [32]. As amostras foram amplificadas em LightCycler® 480 mediante desnaturação a 95 °C durante 2 minutos, 35 ciclos de amplificação a 95 °C durante 15 segundos, e 60 °C durante 10

segundos. Para monitorar os dímeros de iniciadores ou a formação de produtos não específicos, foi realizada a análise da curva de fusão de 65 °C a 97 °C ao final de cada ensaio.

Foi estabelecida uma curva padrão usando DNA purificado de *T. cruzi*; diluições em série variando de 100 a 0,001 ng de DNA, foram adicionadas nos poços da placa de reação em triplicata. A curva padrão foi gerada pelo *software* LightCycler® 96 e utilizada para calcular a relação parasita equivalente em cada amostra. Os parasitas equivalentes foram baseados na quantidade de DNA por célula epimastigota, onde foram considerados 200 fg / parasita [34]. Com esses resultados obteve-se a percentagem de camundongos com qPCR positiva (%qPCR+) e a média da carga parasitária (CP) para cada grupo experimental.

2.6.3. Infeciosidade e taxa de sobrevivência: Os animais que apresentaram ESF e/ou qPCR positivos foram considerados infectados. A taxa de infeciosidade foi obtida pela razão entre o número de animais inoculados e o número de animais infectados vezes 100. As mortes foram registradas ao longo dos experimentos e as taxas de sobrevivência dos diferentes grupos foram comparadas utilizando-se o gráfico da Kaplan-Meyer.

2.7. Avaliações bioquímicas

Foram avaliados os seguintes parâmetros plasmáticos de dano hepático: dosagens das enzimas aspartato aminotransferase (AST), alanina aminotransferase (ALT) e fosfatase alcalina (ALP); e parâmetros de estresse oxidativo (EO): dosagem de glutatona reduzida (GSH), catalase e grupamentos carbonila de proteínas.

2.7.1. Dosagem das enzimas hepáticas plasmáticas: As enzimas AST, ALT e ALP foram dosadas em plasma sanguíneo por espectrofotometria (espectrofotômetro Hitachi U-3000) com kits comerciais da Gold Analisa Diagnóstica Ltda (Belo Horizonte, MG, Brasil). O sangue dos animais foi coletado por punção cardíaca, 48h após o final do tratamento com BZ e 48h após o término da imunossupressão, utilizando-se anticoagulante (heparina sódica), e centrifugado a 1.500 rpm durante 20 minutos para a separação do plasma. Posteriormente, as amostras de plasma foram transferidas para microtubos eppendorf e congeladas a -4 °C, até o uso.

2.7.2. EO hepático: Após a eutanásia (item 2.1.) o fígado foi clampeado e mantido em nitrogênio líquido. Para a preparação do homogenado do órgão foi utilizado o homogenizador de Van Potter-Elvehjem com 10 volumes de tampão fosfato de potássio 0,1 M (pH 7,4) em banho de gelo e uma alíquota foi separada para uso como homogenado total. O homogenado

restante foi centrifugado a 11.000 g por 15 minutos e o sobrenadante separado como uma fração solúvel do homogenado. A GSH foi medida espectrofluorimetricamente (excitação a 350 nm e emissão a 420 nm) por meio do ensaio de o-ftaloaldeído como descrito anteriormente [35]. A atividade da catalase foi estimada medindo a alteração na absorbância a 240 nm usando H_2O_2 como substrato e os resultados foram calculados usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $9,6 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$. Os grupamentos carbonila das proteínas foram medidos por espectrofotometria usando 2,4-dinitrofenilhidrazina [36] e seus níveis foram calculados usando o coeficiente de extinção molar (ϵ) de $2,20 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$.

2.8. Avaliações histopatológicas

Foram avaliados 3-5 animais por grupo experimental para cada uma das cepas estudadas. Os animais foram submetidos à eutanásia e tiveram o coração, fígado e baço coletados 48h após o término da imunossupressão.

Fragmentos destes órgãos foram, primeiramente, fixados em formalina 10% e após 24h preservados em álcool 70%. Após desidratação e diafanização, os tecidos foram embebidos em parafina. Posteriormente foram cortados em secções de 5 μm de espessura, separadas por intervalos de 25 μm e colocadas em lâminas de microscopia (4 secções por lâmina) e então coradas com hematoxilina-eosina (HE). As secções foram examinadas em microscópio óptico em objetiva de 40X.

Os parâmetros histopatológicos analisados incluíram: presença e intensidade do processo inflamatório (PI) e da necrose tecidual (NT); presença e ausência de tecido conjuntivo, hemorragia e congestão do vaso sanguíneo. A intensidade do PI e da NT foi classificada como ausente (-), leve (+) (1 foco/secção), moderado (++) (2-5 focos/secção), intenso (+++) (>5 focos/secção). Outros parâmetros histopatológicos avaliados foram: presença e intensidade do parasitismo e tropismo tecidual.

2.9. Análises estatísticas

A análise estatística dos parâmetros parasitológicos foi feita da seguinte forma: PPP, PP, Pmax, Dpmax e CP, foram comparados com os testes não paramétricos de Mann-Whitney ou Kruskal-Wallis (KW), utilizando-se o *software* Biostat, versão 5.3 (Belém, Pará, Brasil). Os parâmetros, %ESF+, %qPCR+ e %INF, foram comparados pelo teste qui-quadrado (χ^2). Os dados histopatológicos (PI e PT) foram analisados com o teste de KW. Nas análises dos parâmetros bioquímicos foram utilizadas a média e o erro padrão. Na comparação da taxa de sobrevivência foi utilizado gráfico de Kaplan-Meier do *software* GraphPad Prism 5.0.

Comparações estatísticas foram realizadas entre as vias de inoculação (VO x IP), entre as cepas (Y x AM14) e entre animais tratados com BZ e não tratados (BZ x NT).

3. Resultados

A %INF foi de 100% nos camundongos inoculados com ambas as cepas de *T. cruzi*, tanto por via VO quanto por via IP (dados não mostrados). Ao longo de 30 dias de experimento, o tratamento com BZ evitou a letalidade dos animais tratados, e a taxa de sobrevivência dos animais infectados com a cepa Y e não tratados com BZ, tanto por VO quanto por via IP, foi de 50%. Entretanto, as mortes dos animais inoculados pela via IP ocorreram mais precocemente como pode ser visualizado no gráfico de Kaplan-Meier da figura 1. Para os infectados com a cepa AM14 a taxa de sobrevivência foi de 100% para todos os grupos.

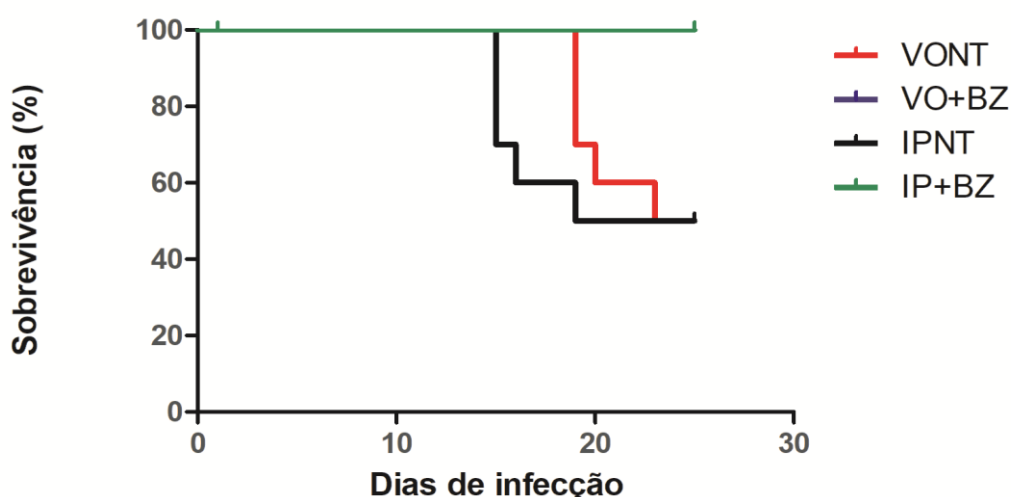


Figura 1. Curvas de sobrevivência de camundongos infectados por via oral (VO) e por via intraperitoneal (IP) com a cepa Y (TcII) de *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol (100 mg/kg/dia, 20X) (BZ) e em controles não tratados (NT). Os grupos VO+BZ e IP+BZ se apresentam sobrepostos no gráfico.

3.1. Comparação dos parâmetros parasitológicos entre as duas vias de inoculação (VO x IP)

As curvas de parasitemia média dos animais inoculados com as cepas Y e AM14, por ambas as vias (VO e IP) são mostradas na figura 2. Os animais NT, inoculados com TMC da cepa Y por VO, apresentaram níveis de parasitemia 3 vezes menores do que aqueles inoculados

por via IP (Figura 2a). Os animais NT inoculados por VO com a cepa AM14 apresentaram nível de parasitemia de até 2,5 vezes superiores aos inoculados por via IP (Figura 2b).

Quanto aos sete parâmetros parasitológicos, derivados da curva de parasitemia (PPP, PP, Pmax e Dpmax) ou não (%ESF+), e moleculares (%qPCR+ e CP), em animais NT, observamos que, na infecção com a cepa Y houveram diferenças significativas em 3 deles enquanto que na infecção com AM14, apenas em 2 parâmetros (Tabela 1 e figuras 2a e 2b). Nos animais infectados com a cepa Y por VO apenas o PPP foi maior que nos animais IP, indicando maior virulência da infecção por via IP nestes animais. Uma vez que quanto maior o PPP, menor é a virulência da cepa. Naqueles infectados com a AM14, o PPP e Dpmax apresentaram valores maiores nos animais VO, indicando maior virulência da via IP também com esta cepa (Tabela 1 e figura 2b).

A %ESF+ e %qPCR+ variaram de 90 a 100%, para os animais infectados com ambas as cepas e por ambas as vias de inoculação, sem diferenças significativas (Tabela 1). A CP dos animais inoculados com a cepa Y e NT foi de 2,3 parasitas equivalentes $\cdot 100 \text{ ng}^{-1}$ enquanto que nos animais VO ela foi de 0,6 parasitas equivalentes $\cdot 100 \text{ ng}^{-1}$, sem diferença estatística (Figura 3a). Nos animais inoculados com cepa AM14, a CP também não apresentou diferença entre as vias de inoculação (Figura 3b).

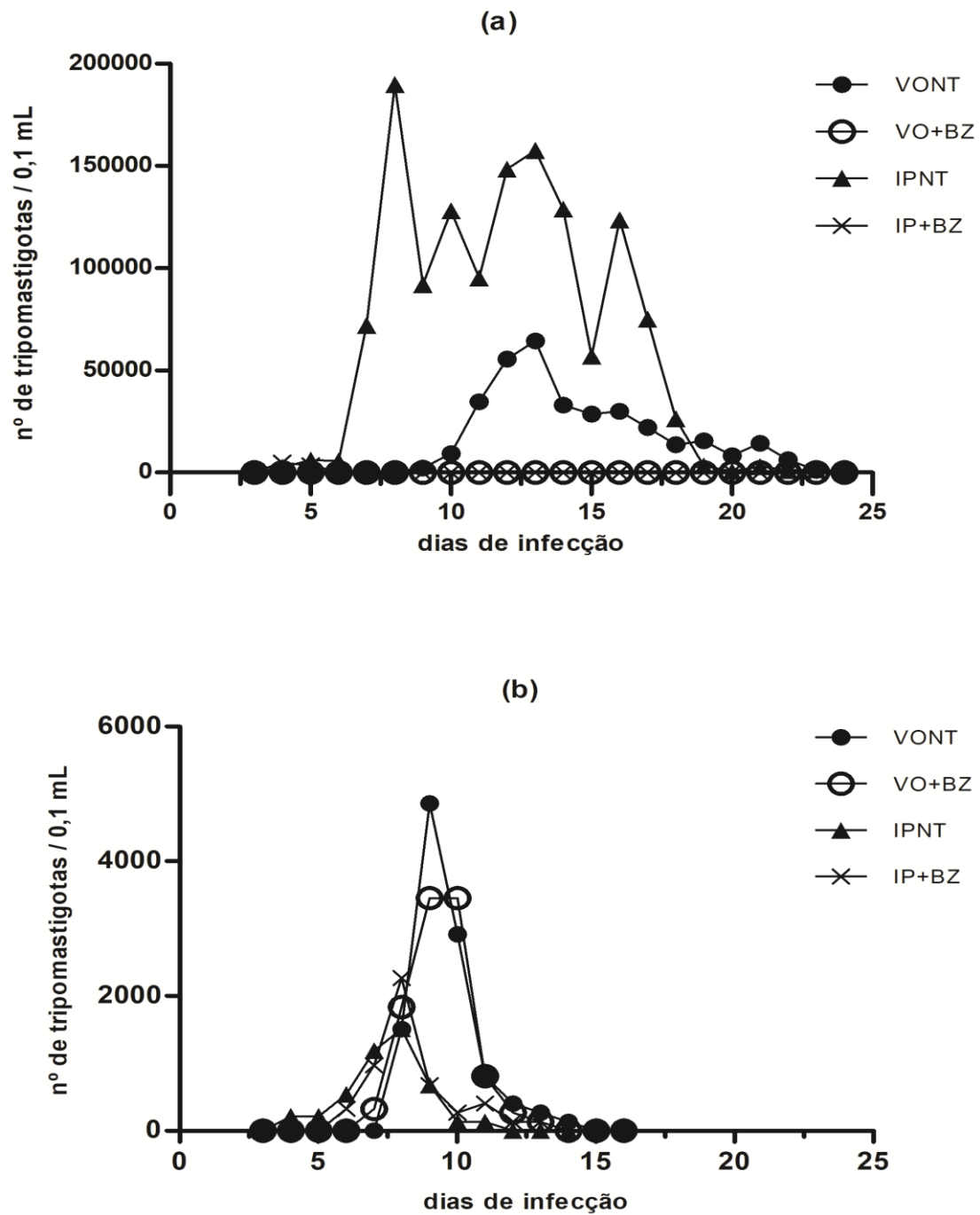


Figura 2. Curvas de parasitemia média em camundongos inoculados por via oral (VO) e por via intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura das cepas Y (TcII) (2a) e AM14 (TcIV) (2b) de *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol (BZ) (100 mg/kg/dia, 20X), à partir do 5º dia de infecção, e em controles não tratados (NT).

Tabela 1. Comparações estatísticas (média e desvio padrão) dos parâmetros parasitológicos e moleculares de camundongos inoculados pelas vias oral (VO) e intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura das cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) de *Trypanosoma cruzi*.

Parâmetro	Y			AM14		
	VO	IP	Valor de <i>p</i>	VO	IP	Valor de <i>p</i>
PPP (dias)	9,5 ± 1,4*	4,1 ± 0,6 [#]	< 0,001	8,2 ± 0,6*	7,2 ± 1,4 [#]	0,025
PP (dias)	11,6 ± 2,0 [#]	14,3 ± 3,3 [#]	0,049	3,5 ± 1,7 [#]	2,6 ± 1,5 [#]	NS
Pmax (x10 ³)	75,7 ± 26,4 [#]	250,9 ± 154,7 [#]	< 0,001	5,4 ± 3,7 [#]	3,0 ± 1,2 [#]	NS
Dpmax	13,2 ± 2,3 [#]	10,3 ± 3,1*	NS	8,9 ± 0,6 [#]	7,8 ± 1,6*	0,002
%ESF+	100,0 (10/10)	100,0 (10/10)	NS	100,0 (10/10)	90,0 (9/10)	NS
%qPCR+	100,0 (5/5)	100,0 (3/3)	NS	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)	NS

PPP: período pré-patente; PP: período patente; Pmax: número de tripomastigotas / 0,1 mL de sangue no pico da parasitemia; Dpmax: dia do pico máximo; NS: não significativo; Na comparação dentro da mesma via de inoculação e na mesma linha, valores com símbolos iguais são significativamente diferentes (* $p \leq 0,05$; [#] $p < 0,001$).

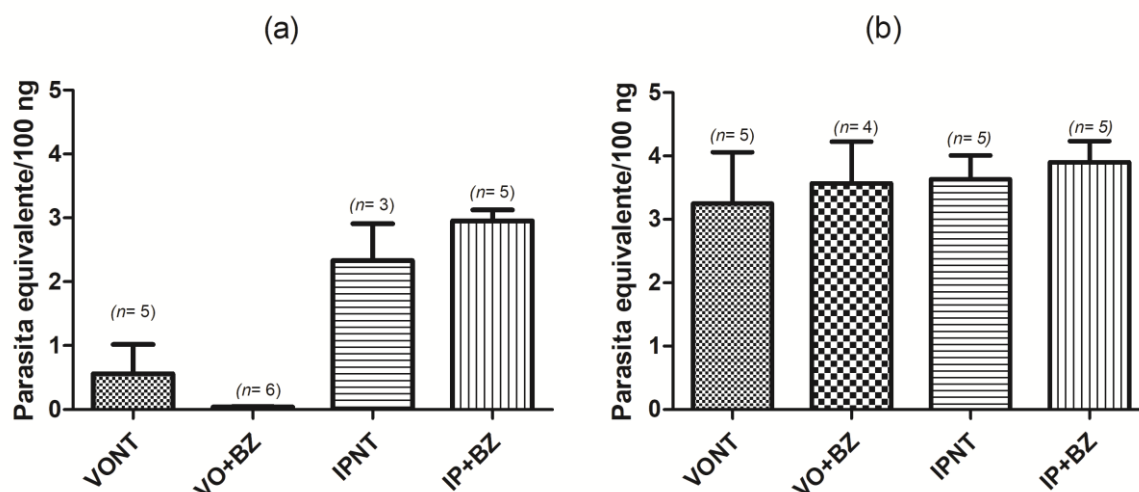


Figura 3. Carga parasitária média detectada pela reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR) em camundongos inoculados pelas vias oral (VO) e intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura / animal das cepas Y (TcII) (3a) e AM14 (TcIV) (3b) de *Trypanosoma cruzi*, tratados com benznidazol (BZ) (100 mg/kg/dia, 20X), e em controles não tratados (NT).

3.2. Comparação dos parâmetros bioquímicos entre as duas vias de inoculação (VO x IP)

Os resultados da dosagem das enzimas hepáticas no plasma dos diferentes grupos experimentais são mostrados na figura 4. Nos animais NT infectados com a cepa Y, as enzimas AST e ALT, mas não a ALP, apresentaram valores significativamente superiores ($p < 0,05$) somente nos infectados por VO em comparação aos animais não infectados (CNI) (Figura 4a). Aqueles animais infectados por VO com a cepa AM14 apresentaram diferença significativa apenas para a ALT em relação aos CNI (Figura 4b).

Nos parâmetros de EO do fígado dos animais NT, infectados com a cepa Y, apenas a infecção por VO diminuiu os níveis de glutathiona reduzida (GSH), o que significa um aumento de EO tecidual nesta condição (Tabela 2). Tanto a infecção por VO quanto à por via IP causaram aumentos de grupos carbonila de proteínas, o que mostra um aumento da injúria tecidual. Embora nenhum parâmetro de EO tenha sido significativamente alterado, a infecção por VO apresentou diminuição dos níveis de GSH e aumento dos grupos carbonila de proteínas, sendo estes indicativos de lesão tecidual. (Tabela 2).

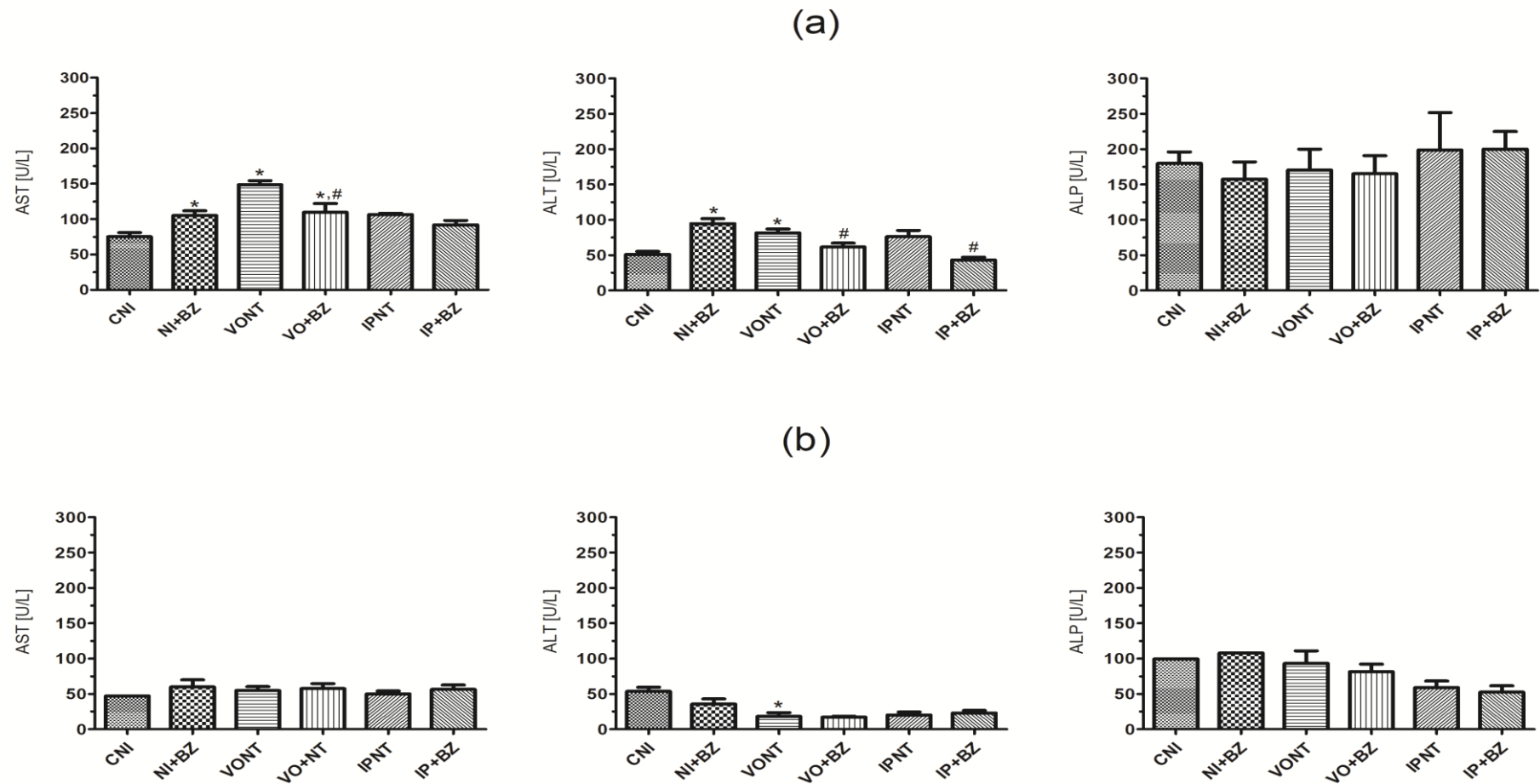


Figura 4. Níveis plasmáticos das enzimas de função hepática em camundongos infectados pelas vias oral (VO) e intraperitoneal (IP) com 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura / animal das cepas Y (TcII) (4a) e AM14 (TcIV) (4b) de *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol (BZ) (100 mg/kg/dia, 20X), e em controles não tratados (NT). AST: aspartato aminotransferase; ALT: alanina aminotransferase; ALP: fosfatase alcalina; *: valores diferentes do CNI; #: diferença após tratamento com BZ ($p \leq 0,05$).

Tabela 2. Parâmetros de estresse oxidativo (média $\pm$ erro padrão) do fígado de camundongos (n = 3 - 6 animais) controles não infectados (CNI), controles não infectados e tratados com benzonidazol (NI+BZ), inoculados por via oral (VO) e tratados (VO+BZ), inoculados por via intraperitoneal (IP) e tratados (IP+BZ). Inóculo: 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura / animal da cepa Y (TcII) e AM14 de *Trypanosoma cruzi*, em 1,0 mL de meio de cultura LIT.

Parâmetros	Grupos experimentais Cepa Y					
	CNI	NI+BZ	VONT	VO+BZ	IPNT	IP+BZ
Glutathiona (nmol.mg ⁻¹)	8,24 $\pm$ 0,11 ^a	6,02 $\pm$ 0,65 ^a	3,47 $\pm$ 0,35 ^b	6,19 $\pm$ 0,72 ^a	6,12 $\pm$ 0,21 ^a	7,80 $\pm$ 0,63 ^a
Catalase (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	0,26 $\pm$ 0,03 ^a	0,43 $\pm$ 0,04 ^a	0,39 $\pm$ 0,04 ^a	0,34 $\pm$ 0,05 ^a	0,33 $\pm$ 0,03 ^a	0,29 $\pm$ 0,05 ^a
Grupos carbonílicos (nmol.mg ⁻¹)	2,60 $\pm$ 0,14 ^a	3,87 $\pm$ 0,20 ^b	3,46 $\pm$ 0,28 ^b	3,95 $\pm$ 0,1 ^b	3,98 $\pm$ 0,12 ^b	3,21 $\pm$ 0,09 ^{ab}
Parâmetros	Grupos experimentais Cepa AM14					
	CNI	NI+BZ	VONT	VO+BZ	IPNT	IP+BZ
Glutathiona (nmol.mg ⁻¹)	10.24 $\pm$ 0.82	11.41 $\pm$ 0.44	8.82 $\pm$ 1.09	9.69 $\pm$ 0.88	11.90 $\pm$ 0.78	10.27 $\pm$ 0.38
Catalase (nmol.min ⁻¹ .mg ⁻¹)	0.31 $\pm$ 0.03	0.30 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.02	0.29 $\pm$ 0.02	0.27 $\pm$ 0.02	0.25 $\pm$ 0.01
Grupos carbonílicos (nmol.mg ⁻¹)	3.00 $\pm$ 0.40	3.41 $\pm$ 0.32	4.45 $\pm$ 0.35	4.44 $\pm$ 0.41	3.75 $\pm$ 0.13	3.55 $\pm$ 0.18

Valores com letras diferentes (^a e ^b) na mesma linha são diferentes ($p \leq 0,05$).

3.3.Comparação entre as cepas e dentro da mesma via de inoculação (Y x AM14)

Nas infecções pelas vias VO e IP dos animais NT, em 4/6 parâmetros parasitológicos (PPP, PP, Pmax e Dpmax) avaliados, foram observadas diferenças significativas para ambas as cepas dentro da mesma via (Tabela 1). Na infecção VO, a cepa Y apresentou valores maiores do que a cepa AM14 para PPP e Dpmax, sugestivos de menor virulência, e também para PP e Pmax, os quais sugerem maior virulência. Na infecção por via IP, embora tenham sido observadas diferenças significativas em 4/6 parâmetros, os valores de 3 deles (PPP, PP e Pmax) sugerem maior virulência da cepa Y quando inoculada por essa via, em comparação à cepa AM14 (Tabela 1).

Para a CP detectada pela qPCR, não foram observadas diferenças estatísticas (utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney) entre as cepas Y e AM14, dentro da mesma via de

inoculação (Figura 3). Os animais VO da cepa AM14 apresentaram uma CP de 3,2 parasitas equivalentes / 100 ng de DNA enquanto que os infectados com a cepa Y, 0,6 parasitas equivalentes / 100 ng, entretanto, sem diferença significativa.

A dosagem das enzimas hepáticas no plasma mostrou que os níveis de AST, ALT e ALP, independentemente da via de inoculação, estavam mais elevadas em até 4,5 X na infecção pela cepa Y em relação a cepa AM14 (Figura 4). Com destaque para a ALT que apresentou maiores diferenças nos animais infectados por VO seguidos pelos da via IP.

Os resultados de EO (Tabela 2) mostraram que as diferenças entre as cepas foram maiores apenas para GSH para as duas vias de infecção, onde a cepa Y obteve menores valores comparados a cepa AM14.

3.4. Efeitos do tratamento com BZ nos parâmetros estudados

Os animais VO e IP tiveram a parasitemia suprimida pelo BZ a partir do primeiro dia de tratamento, para aqueles inoculados com a cepa Y (Figura 2a), e a partir do 9º dia para os infectados com a cepa AM14 (Figura 2b).

Nos animais inoculados com a cepa Y, tanto por VO quanto por via IP, quando submetidos ao tratamento com BZ, apresentaram redução significativa em 4/6 parâmetros parasitológicos (PP, Pmax, Dpmax e %ESF+) (Tabela 3). Já aqueles inoculados com a cepa AM14, redução significativa foi observada em 2/6 para a via IP (Dpmax e %ESF+) e 1/6 para a VO (%ESF+). O parâmetro molecular (%qPCR+) não mostrou redução após tratamento com BZ, para nenhum grupo experimental. Ou seja, a qPCR foi positiva em todos os animais avaliados (Tabela 3). O tratamento com BZ não promoveu redução significativa da CP dos animais infectados com as duas cepas avaliadas, inoculadas tanto por VO quanto por via IP (Figura 3).

O tratamento com BZ dos animais controles não infectados (NI+BZ) causou aumento significativo da atividade das enzimas AST ($p = 0,020$) e ALT ($p = 0,021$), mostrando que a droga por si só, afeta o fígado (Figura 3). Já para os animais infectados com a cepa Y, o BZ promoveu redução ($p = 0,05$) da AST nos infectados VO e da ALT tanto nos infectados por VO ($p = 0,043$) quanto nos IP ($p = 0,021$), mostrando que o tratamento reverteu esta situação. Para a enzima ALP, alteração significativa pela droga não foi registrada. Tanto nos animais CNI quanto nos infectados com a cepa AM14, o tratamento não alterou de forma significativa a atividade das 3 enzimas avaliadas (Figura 4).

Na análise dos parâmetros de EO, foi verificado que o BZ provocou aumento significativo, apenas dos grupos carbonila das proteínas, para os animais do grupo NI (Tabela

2). Para os animais infectados com a cepa Y por VO, foi observada aumento significativo da GSH nos animais tratados em comparação aos NT (Tabela 2). Naqueles infectados por via IP, embora o BZ tenha promovido redução significativa dos grupos carboníla, os valores deste parâmetro não retornaram ao nível dos animais NI. Para a cepa AM14 não foram observadas diferenças significativas entre os grupos tratados e NT em ambas as vias de infecção (Tabela 2).

3.5.Comparações dos parâmetros histopatológicos

As análises histopatológicas dos animais infectados com a cepa Y se encontram em andamento. Para os infectados com a cepa AM14, o material coletado ainda será processado para obtenção dos cortes histológicos.

Tabela 3. Comparações estatísticas (média e desvio padrão) dos parâmetros parasitológicos e moleculares de camundongos inoculados pelas vias oral (VO) e intraperitoneal (IP) com as cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) de *Trypanosoma cruzi*, tratados com benzonidazol (BZ 100 mg/kg/dia, 20X) e em controles não tratados (NT). Inóculo: 2×10^6 tripomastigotas metacíclicos de cultura / animal. Início do tratamento: 5º dia de infecção.

Parâmetros	Y				AM14			
	VO		IP		VO		IP	
	NT	BZ	NT	BZ	NT	BZ	NT	BZ
PP (dias)	11,6 ± 2,0	PA*	14,3 ± 3,3	2,6 ± 0,5*	3,5 ± 1,7	3,4 ± 1,3	2,6 ± 1,8	3,3 ± 1,5
Pmax ($\times 10^3$)	75,7 ± 26,4	PA*	250,9 ± 154,7	5,7 ± 1,3*	5,4 ± 3,7	5,3 ± 2,2	3,0 ± 2,1	2,2 ± 1,2
Dpmax	13,2 ± 2,3	PA*	10,3 ± 3,1	4,6 ± 0,5*	8,9 ± 0,6	9,4 ± 1,0	7,8 ± 0,4	6,5 ± 1,6*
%ESF+	100,0 (10/10)	PA*	100,0 (10/10)	20,0 (2/10)*	100,0 (10/10)	0,0 (0/10)*	90,0 (9/10)	0,0 (0/10)*
%qPCR+	100,0 (5/5)	100,0 (6/6)	100,0 (3/3)	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)	100,0 (4/4)	100,0 (5/5)	100,0 (5/5)

PA: parasitemia ausente; *: diferença significativa entre tratados e não tratados ($p \leq 0.05$)

4. Discussão

O impacto da infecção tanto por VO quanto por via IP, e do tratamento com BZ, nas alterações hepáticas de camundongos infectados com duas cepas de *T. cruzi* pertencentes a DTU distintas (TcII e TcIV), ainda não foi avaliado histopatologicamente no estudo atual, pretendemos realizar em breve.

A infecção de camundongos *swiss* com TMC da cepa Y (TcII) tanto pela VO quanto pela via IP, causou uma taxa de mortalidade de 50% nos animais infectados. Entretanto as mortes ocorreram mais precocemente naqueles inoculados pela via IP, sugerindo maior letalidade desta via para essa cepa. Esses resultados concordam com Dias et al. [12] que não verificaram diferenças na taxa de mortalidade entre as vias VO e IP, no entanto esses autores observaram taxas de mortalidade superiores (de 90-100%) as do presente estudo utilizando tripomastigotas da mesma origem na infecção dos animais. Mesmo os camundongos não respondendo ao tratamento com BZ quando inoculados pela cepa Y por VO em termos de cura parasitológica [27], a droga evitou a letalidade na infecção pelas duas vias. Nos animais infectados com a cepa AM14 não ocorreram mortes, o que mostra maior letalidade da cepa Y, tanto na infecção VO quanto na por via IP.

Na comparação dos parâmetros parasitológicos entre as vias (VO x IP) para os animais infectados com a cepa Y, os níveis de parasitemia foram cerca de 3X menores na VO em comparação a via IP, sugerindo maior virulência da via IP. Esses animais também apresentaram menor PPP e maior CP em relação aos inoculados por VO. Embora a diferença na CP não tenha sido significativa devido ao baixo número de animais no grupo em consequência da alta mortalidade [12]. Dias et al. [12] também observaram maior virulência para a infecção de camundongos com TMC da cepa Y por via IP, quando considera-se os parâmetros PPP, PP e pico máximo de parasitemia.

Nos animais infectados com a AM14 embora os níveis de parasitemia tenham sido cerca de 2,5X menores nos animais IP, não houve diferenças na CP detectada pela qPCR. Os animais infectados VO com essa cepa apresentaram maior PPP e o Dpmax mais tardio, sugerindo maior virulência da via IP também para essa cepa [30].

Embora não tenha sido demonstrada relação direta entre genótipo ou DTU de *T. cruzi* e manifestações clínicas da DC, a diversidade genética das cepas pode ter impacto importante nas propriedades biológicas e médicas do parasito tais como virulência, patogenicidade, tropismo tecidual e resistência a droga [19, 21, 22, 28, 30, 37, 38]. Na comparação das infecções pela cepa Y (TcII) e AM14 (TcIV), foram observadas diferenças significativas para quatro parâmetros derivados da curva de parasitemia. Entretanto, na infecção VO pela cepa Y

observou-se maior PP e Pmax, que indica maior virulência, e maior PPP e Dpmax, menor virulência. Na infecção por via IP, a cepa Y foi mais virulenta considerando três parâmetros (menor PPP e maiores PP e Pmax) enquanto que para a AM14 apenas o parâmetro de virulência Dpmax apresentou menor valor. Pode-se concluir que, para esses parâmetros, na infecção por VO não houve diferenças entre as cepas quanto a virulência, mas na infecção por via IP sim, sendo a cepa Y mais virulenta.

Em relação a CP, também não foram observadas diferenças significativas entre as cepas para nenhuma das vias de inoculação, embora os valores para todos os grupos infectados com a cepa AM14 tenham sido numericamente superiores por um lado, e os níveis de parasitemia inferiores aos da cepa Y, por outro lado. As amostras de sangue utilizadas para determinar a CP pela qPCR foram coletadas no 27º d.i., que corresponde ao início de fase crônica.

Já têm sido relatado na literatura importantes reações adversas causadas pelos antiparasitários nifurtimox (NX) e BZ utilizados no tratamento da DC, entre elas alterações hepáticas [18]. Também tem sido observado na região amazônica microepidemias familiares de DC aguda, adquirida por transmissão oral, pela ingestão de alimentos contaminados principalmente por frutos de palmeiras como açaí. Esses casos apresentam quadros mais severos do que os adquiridos pela via vetorial clássica (contaminação pelas excretas de triatomíneos) podendo apresentar maior letalidade [39, 40, 41]. Medicamentos administrados por VO assim como patógenos adquiridos por essa via, após serem absorvidos pela mucosa gástrica intestinal, são transportados para o sistema porta hepático [24]. Além disso, o fígado é afetado na infecção aguda pelo *T. cruzi* e tem função de depurar os tripomastigotas sanguíneos [14].

No presente estudo com análises de enzimas no plasma, foi observado que as dosagens AST, ALT e ALP estavam até 4,5X mais elevadas na infecção pela cepa Y (TcII) em relação a cepa AM14 (TcIV). Esses dados sugerem, então, que a infecção pela VO, principalmente com a cepa Y, provoca lesão ao nível hepatocelular provocando a liberação dessas enzimas na corrente sanguínea e aumentando seus níveis séricos [42]. O aumento dos níveis de AST indicam necrose hepática e podem ocorrer em infecções por parasitos. A ALT apresentou maior aumento na infecção por VO pela cepa Y em relação a AM14. Como a origem dessa enzima é predominantemente citoplasmática, ela é encontrada em grandes concentrações no fígado, sendo ela é um marcador sensível de lesão hepática, sugerindo que a cepa Y inoculada por VO levou a uma infecção foi mais severa. Esses dados corroboram com Albuquerque et al., [24] que verificaram que camundongos BALB/c inoculados por VO com a cepa Tulahuén (TcVI) apresentaram dano hepático, dado ao aumento dos níveis séricos de ALT e AST e confirmados

com histologia.

Diante dos resultados obtidos com a avaliação do EO, foi possível mostrar que a infecção pela cepa Y (TcII) causa maior dano hepático que a cepa AM14 (TcIV), visto que a cepa AM14 não alterou nenhum dos parâmetros de EO. Francisco et al. [23] em seu trabalho também relata o aumento dos parâmetros hepáticos de EO para a cepa Y.

O BZ suprimiu totalmente a parasitemia dos animais infectados pela cepa Y com as duas vias avaliadas (VO e IP) durante todo o curso do tratamento, mas não para a cepa AM14 cujos animais tratados apresentaram parasitemia patente por quase metade do tempo de tratamento (~9 dias). Esse dado sugere maior resistência da cepa AM14 nos animais inoculados tanto por VO quanto por via IP em comparação com a cepa Y, concordando com a literatura que mostra que AM14 é resistente ao BZ quando inoculada pela via IP [21, 22] e também pela VO [30] e que a cepa Y é parcialmente resistente tanto ao BZ quanto ao NX [25, 26] em animais inoculados por via IP e resistente ao BZ somente na infecção por VO [27].

Na avaliação do impacto do tratamento com BZ nos parâmetros parasitológicos derivados da curva (PPP, PP, Pmax e Dpmax), na %ESF+ e na %qPCR+, foi observado redução significativa em 4/6 parâmetros, tanto na VO quanto na via IP para a cepa Y, mas apenas 1/6 (VO) e 2/6 (IP) parâmetros para a cepa AM14. Esses dados sugerem mais uma vez melhor resposta ao tratamento nos animais inoculados com a cepa Y que naqueles inoculados pela cepa AM14. Entretanto para a CP não foram observadas diferenças significativas para nenhuma das duas cepas e vias estudadas.

O BZ administrado em camundongos CNI provocou um aumento significativo nas enzimas AST e ALT, confirmando que esta droga causa lesões hepáticas em animais não infectados [43, 44]. Isso também foi confirmado pelo aumento do estresse oxidativo do fígado nos animais CNI demonstrado pelo aumento dos grupos carbonila das proteínas. Por outro lado nos animais inoculados com a cepa Y pela VO, o tratamento etiológico promoveu redução nas dosagens das duas enzimas, enquanto que na infecção IP apenas para a ALT, mostrando uma reversão do quadro pelo BZ. Esse resultado sugere maior benefício do tratamento etiológico na infecção por VO. Para a cepa AM14, o BZ não alterou a atividade das três enzimas, sugerindo, pela análise desses parâmetros, ausência de benefícios do tratamento.

O aumento de GSH nos animais infectados por VO com a cepa Y e tratados com BZ sugere uma redução do EO e mostra mais um benefício do tratamento na infecção por essa via com esta cepa. Níveis discretamente elevados de GSH também foram encontrados na cepa AM14 pela VO nos animais tratados, porém estes valores não foram estatisticamente significativos. Na infecção por via IP com a cepa Y o BZ também promoveu benefícios,

demonstrado pela diminuição dos grupamentos carbonila. Isso corrobora com a literatura que mostra que camundongos suíços infectados por via IP com inóculo de 2.000 TS da cepa Y de *T. cruzi* submetidos ao tratamento etiológico tiveram redução do EO [43].

5. Conclusão

A infecção de camundongos swiss com as cepas Y (TcII) a via IP se mostrou mais virulenta do que a infecção adquirida por VO. Entretanto, na infecção com a cepa AM14, não houve diferenças entre as vias de inoculação para os parâmetros avaliados.

Nos animais infectados com a cepa Y, tanto pela VO quanto pela via IP, a taxa de mortalidade foi de 50%, no entanto, as mortes ocorreram mais precocemente naqueles inoculados pela via IP, sugerindo também maior letalidade desta via para essa cepa. Para a cepa AM14 não ocorreram mortes, o que mostra menor letalidade em relação a cepa Y (TcII), tanto na infecção por VO quanto na por via IP.

Neste estudo, o BZ administrado em camundongos CNI provocou um aumento das enzimas AST e ALT, confirmando que este fármaco causa lesões hepáticas em animais não infectados. Esse dado também foi confirmado pelo aumento do EO do fígado nos animais CNI demonstrado pelo aumento dos grupos carbonila das proteínas.

O tratamento com BZ dos animais infectados com a cepa Y promoveu redução da enzima AST para a VO e da ALT tanto nos infectados VO como por via IP, mostrando que o tratamento reverteu essa situação. O aumento de GSH nos animais infectados por VO com a cepa Y e tratados com BZ sugere uma redução do EO e mostra mais um benefício do tratamento.

Os resultados deste estudo mostraram que as infecções pelas cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) de *T. cruzi* pelas vias oral e IP causam mais danos hepático que o tratamento etiológico. Entretanto o tratamento com BZ promoveu redução dos parâmetros de EO na infecção com a cepa Y, propiciando benefícios aos animais tratados.

Referências

- [1] C. Chagas. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 1 (1909) 159-218.
- [2] WHO: World Health Organization. Chagas disease (American trypanosomiasis). Fact Sheet. 2018. [Citado em 01. Fev. 2019]. Disponível em: [https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-\(american-trypanosomiasis\)](https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/chagas-disease-(american-trypanosomiasis)).
- [3] J.B. Albuquerque. Análise da resposta imune nos modelos murinos de infecção oral pelo *Trypanosoma cruzi* e *Listeria monocytogenes*. Tese (Doutorado) - Curso de Biologia Celular e Molecular, Instituto Oswaldo Cruz, Cap. 1. (2017) 180 f.
- [4] BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde | Ministério da Saúde. Doença de Chagas Aguda e distribuição espacial dos triatomíneos de importância epidemiológica, Brasil 2012 a 2016. Boletim Epidemiológico. 50 (2019) 1-10. [Citado em 01. Fev. 2019]. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos>.
- [5] M.V. Simões, M.M.D. Romano, A. Schmidt, K.S.M. Martins, J.A. Marin-Neto. Chagas Disease Cardiomyopathy. International Journal Of Cardiovascular Sciences. 31(12) (2018) 173-189.
- [6] J.C.P. Dias, A.N. Ramos Jr. E.D. Gontijo, A. Luquetti, M.A. Shikanai-Yasuda, J.R. Coura, R.M. Torres, J.R.C. Melo, E.A. Almeida, W. Oliveira Jr. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. Epidemiologia e Serviços de Saúde. 25 (21) (2016) 1-21.
- [7] J.R. Coura. Tripanosomose, doença de Chagas. Ciência e Cultura. 55 (2003) 30-33.
- [8] J.C.P. Dias. Notas sobre o *Trypanosoma cruzi* e suas características bio-ecológicas, como agente de enfermidades transmitidas por alimentos. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 39 (2006) 370-375.
- [9] B. Zingales, S.G. Andrade, M.R.S. Briones, D.A. Campbell, E. Chiari, O. Fernandes, F. Guhl, E. Lages-Silva, A.M. Macedo, C.R. Machado, M.A. Miles, A.J. Romanha, N.R. Sturm, M. Tibayrenc, A.G. Schijman. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz. 104 (2009) 1051-1054.
- [10] B. Zingales, M.A. Miles, D.A. Campbell, M. Tibayrenc, A.M. Macedo, M.M.G. Teixeira, A.G. Schijman, M.S. Llewellyn, E. Lages-Silva, C.R. Machado, S.G. Andrade, N.R. Sturm. The revised *Trypanosoma cruzi* subspecific nomenclature: Rationale, epidemiological relevance and research applications. Infection, Genetics and Evolution. 12 (2012) 240–253.

- [11] W.M. Monteiro, A.P.M. Teston, A.P. Gruendling, D. Reis, M.L. Gomes, S.M. Araújo, M.T. Bahia, L.K.C. Magalhães, J.A.O. Guerra, H. Silveira, M.J.O. Toledo, M.G.V. Barbosa. *Trypanosoma cruzi* I and IV Stocks from Brazilian Amazon Are Divergent in Terms of Biological and Medical Properties in Mice. PLOS Neglected Tropical Diseases. 7 (2013) e2069.
- [12] G.B.M. Dias, A.P. Gruendling, S.M. Araújo M.L. Gomes, M.J.O. Toledo. Evolution of infection in mice inoculated by the oral route with different developmental forms of *Trypanosoma cruzi* I and II. Experimental Parasitology. 135 (2013) 511-517.
- [13] R.C. Melo, Z. Brener. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. Journal of Parasitology. 63 (3) (1978) 475-482.
- [14] L.R. Sardinha, R.M. Elias, M.R.L. Marinho. Contribution of NK, NK T, T, and $\gamma\delta$ T, and $\alpha\beta$ T Cells to the Gamma Interferon Response Required for Liver Protection against *Trypanosoma cruzi*. Infection and Immunity. 74 (2003) 2031-2042.
- [15] R. Docampo, Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. Chemico-biological Interactions. 73 (1990) 1-27.
- [16] G. Martins, M.A.G. Cardoso, J.C.S. Aliberti, J.S. Silva. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Immunology Letters. 63 (1998) 113-120.
- [17] S.M. Cardoso, C. Pereira, C.R. Oliveira. Mitochondrial function is differentially affected upon oxidative stress. Free Radical Biology and Medicine. 26 (1999) 3-13.
- [18] J.D. Silva-Filho, A.C. Costa, E.C. Freitas, C.E.M. Viana, M.A. Lima, M.C. Andrade, L.S. Pereira, A.S.O.B.V. Fidalgo, M. F. Oliveira. Perfil hematológico e bioquímico de pacientes com doença de Chagas atendidos por um serviço de atenção farmacêutica no estado do Ceará. Journal of Health & Biological Science. 5 (2) (2017) 130-136.
- [19] M.J.O Toledo, M.T. Bahia, C.M. Carneiro, O.A. Martins-Filho , M. Tibayrenc , C. Barnabé, W.L. Tafuri, M. Lana. Chemotherapy with benznidazole and itraconazole for mice infected with different *Trypanosoma cruzi* clonal genotypes. Antimicrobial Agents Chemotherapy. 47 (2003) 223-230.
- [20] S. Caldas, F.M. Santos, M. de Lana, L.F. Diniz, G.L. Machado-Coelho, V.M. Veloso, M.T. Bahia. *Trypanosoma cruzi*: Acute and long-term infection in the vertebrate host can modify the response to benznidazole. Experimental Parasitology. 118 (2008) 315-323.
- [21] A.P.M. Teston, W.M. Monteiro, D. Reis, G.D.P. Bossolani, M.L. Gomes, S.M. Araújo M.T. Bahia, M.G.V. Barbosa, M.J.O. Toledo. *In vivo* susceptibility to benznidazole of *Trypanosoma cruzi* strains from the western Brazilian Amazon. Tropical Medicine & International Health. 18 (2012) 85-95.

- [22] A.P. Gruendling, M. Massago, A.P.M. Teston, W.M. Monteiro, E.N. Kaneshima, S.M. Araújo, M.L. Gomes, M.G.V. Barbosa, M.J.O. Toledo. Impact of Benznidazole on Infection Course in Mice Experimentally Infected with *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene. 92 (2015) 1178-1189.
- [23] A.F. Francisco. Estresse Oxidativo, defesas antioxidantes e processo inflamatório na fase aguda da doença de Chagas experimental. Tese (Doutorado) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto. (2011) 114f.
- [24] J.B. Albuquerque, D.S. Santos, A.R. Pérez, L.R. Berbert, E. Santana-van-Vliet, D.A. Farias-de-Oliveira, O.C. Moreira, E. Roggero, C.E. Carvalho-Pinto, J. Jurberg, V. Cotta-de-Almeida, O. Bottasso, W. Savino, J. Meis. *Trypanosoma cruzi* Infection through the Oral Route Promotes a Severe Infection in Mice: New Disease Form from an Old Infection? PLOS Neglected Tropical Disease. 9 (2015) e0003849.
- [25] S.G. Andrade. Caracterização morfológica e comportamental de cepas de *Trypanosoma cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 18 (1985) 39-46.
- [26] L.S. Filardi, Z. Brener. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene. 81 (1987) 755-759.
- [27] G. Zanusso Junior, M. Massago, A.P.M. Teston, A.T. Morey, M.J.O. Toledo. Efficacy of some essential oils in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Tropical Journal of Pharmaceutical Research. 16 (6) (2017) 1307-1316.
- [28] S.K.L. MEZA, E.N. Kaneshima, S.O. Silva, M. Gabriel, S.M. Araújo, M.L. Gomes, W.M. Monteiro, M.G.V. Barbosa, M.J.O. Toledo. Comparative pathogenicity in Swiss mice of *Trypanosoma cruzi* IV from northern Brazil and *Trypanosoma cruzi* II from southern Brazil. Experimental Parasitology. 146 (2014) 34-42.
- [29] A.P.M. Teston, A.P. Abreu, C.P. Abegg, M.L. Gomes, M.J.O. Toledo. Outcome of oral infection in mice inoculated with *Trypanosoma cruzi* IV of the Western Brazilian Amazon. Acta Tropica. 166 (2017) 212-217.
- [30] A.P.M. Teston. Mice orally infected with *Trypanosoma cruzi* IV from Western Brazilian Amazon present more intense infection and worse response to benznidazole. (2019) (No prelo).
- [31] M. Bértoli, M.H. Andó, M.J.O. Toledo, S.M. Araújo, M.L. Gomes. Infectivity for mice of *Trypanosoma cruzi* I and II strains isolated from different hosts. Parasitol Reserch. 99 (2006) 7-13.

- [32] Z. Brener. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. 4 (6) (1962) 389-396.
- [33] S. Caldas, I.S. Caldas, L.F. Diniz, W.G. Lima, R.P. Oliveira, A.B. Cecílio, I. Ribeiro, A. Talvani, M.T. Bahia. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta tropica*. 123 (3) (2012) 170-177.
- [34] T. Duffy, M. Bisio, J. Altcheh, J.M. Burgos, M. Diez, M.J. Levin, R.R. Favaloro, H. Freilij, A.G. Schijman. Accurate real-time PCR strategy for monitoring bloodstream parasitic loads in Chagas disease patients. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 3 (2009) e419.
- [35] P.J. Hissin, R. Hilf. Fluorimetric method for determination of oxidized and reduced glutathione in tissues. *Analytical biochemistry*. 74 (1976) 214–226.
- [36] R.L. Levine, D. Garland, C.N. Oliver, A. Amici, I. Climent, A.G. Lenz, B.W. Ahn, S. Shaltiel, E.R. Stadtman. Determination of carbonyl content in oxidatively modified proteins. *Methods in Enzymology* 186 (1990) 464–478.
- [37] M.J.O. Toledo, M. Lana, C.M. Carneiro, M.T. Bahia, M.T., G.L.L.M. Coelho, V.M. Veloso, C. Barnabé, M. Tibayrenc, W.L. Tafuri. Impact of *Trypanosoma cruzi* clonal evolution on its biological properties in mice. *Experimental Parasitology*. 100 (2002) 161–172.
- [38] A.P.M. Teston, A.P. Abreu, A.P. Gruending, M.T. Bahia, M.L. Gomes, S.M. Araújo, M.J.O. Toledo. Differential parasitological, molecular, and serological detection of *Trypanosoma cruzi* I, II, and IV in blood of experimentally infected mice. *Experimental Parasitology*. 166 (2016) 44-50.
- [39] A.Y.N. Pinto, S.A. ValenteI, V.C. ValenteI, A. G. Ferreira Junior, J.R. Coura. Acute phase of Chagas disease in the Brazilian Amazon region. Study of 233 cases from Pará, Amapá and Maranhão observed between 1988 and 2005. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 41 (6) (2008) 602-614.
- [40] D.V. Andrade, J.K. Gollob, O.W. Dutra. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. *PLoS Neglected Tropical Diseases*. 8 (2014) e3010.
- [41] R.L. Barbosa, V.L. Dias, E.S. Lorosa, E.G. Costa, K.S. Pereira, R. Gilioli, A.M.A. Guaraldo, L.A, Passos. Virulence of *Trypanosoma cruzi* from vector and reservoir in in natura açaí pulp resulting in food-borne acute Chagas disease at Pará State, Brazil. *Experimental Parasitology*. 197 (2019) 86-75.
- [42] H.U. Bergmeyer, P. Scheibe, A.W. Wahlefeld. Optimization of methods for aspartate aminotransferase and alanine aminotransferase. *Clinical Chemistry*. 58 (1) (1978) 58-73.

- [43] M.V.B. Sartini. Avaliação pré-clínica da combinação de benznidazol e curcumina no tratamento etiológico da infecção por *T. cruzi*. Dissertação (Mestrado) – Curso de Biociências Aplicada à Saúde, Universidade Federal de Alfenas. (2015) 57 f.
- [44] C.J.G. Moreno. Estabelecimento do modelo murino para a modulação de toxicidade do Benzonidazol durante a terapêutica da Doença de Chagas (*Trypanosoma cruzi*). Dissertação (Mestrado) – Curso de Saúde Tropical, Universidade Nova de Lisboa Instituto de Higiene e Medicina Tropical. (2015) 86 f.

CAPÍTULO III

1. CONCLUSÕES

Este estudo experimental, parasitológico e bioquímico, em camundongos inoculados por via oral e intraperitoneal com *T. cruzi* II (TcII) e *T. cruzi* IV (TcIV) mostrou que:

- 1) As infecções de camundongos por via IP com as cepas em cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) foram mais virulentas do que as infecções adquiridas por VO.
- 2) Não houveram diferenças entre as cepas quanto a virulência na infecção por VO, mas na infecção por via IP sim, sendo a cepa Y mais virulenta.
- 3) O BZ causou alterações hepáticas quando administrado em camundongos não infectados, aumentando os níveis na concentração das enzimas AST e ALT. Esse dado também foi confirmado pelo aumento do estresse oxidativo (EO) do fígado nos animais não infectados, demonstrado pelo aumento dos grupos carbonila das proteínas.
- 4) O tratamento com BZ dos animais infectados com a cepa Y (TcII) promoveu a redução na concentração da enzima AST para a VO e da ALT tanto no VO como também no via IP, mostrando que o tratamento reverte essa situação.
- 5) O aumento de GSH nos animais infectados por VO com a cepa Y e tratados com BZ mostrou uma redução do EO, indicando mais um benefício do tratamento.
- 6) As infecções pelas cepas Y (TcII) e AM14 (TcIV) de *T. cruzi* pelas vias oral e IP causaram mais danos hepáticos que o tratamento etiológico. Entretanto, o tratamento com BZ reduziu os parâmetros de EO na cepa Y, promovendo benefícios aos animais tratados.
- 7) Os benefícios promovidos pelo tratamento etiológico com BZ depende tanto da cepa (DTU) de *T. cruzi*, quanto da via de inoculação. A infecção por VO apresentou mais benefícios pelo BZ que a via IP, assim como a cepa Y em relação a cepa AM14.

2. PERSPECTIVAS

Os resultados obtidos através dessa pesquisa mostra que a cepa e a via de inoculação podem influenciar a virulência da infecção, levando a um comprometimento hepático diferenciado. O que mostra a necessidade da realização de estudos histopatológicos para relacionar as alterações bioquímicas encontradas indicativas de lesão com as alterações histopatológicas do órgão/tecido. Também com a análise de outros órgãos como o coração e baço, poderemos relacionar o tropismo tecidual das cepas e as vias de inoculação, com as alterações enzimáticas.

Como foi visto, sabe-se que o estresse oxidativo é combatido através de antioxidantes que são produzidos pelo corpo ou absorvidos pela dieta. Assim, como perspectiva de estudo futuro, propõe-se utilizar substancias antioxidantes como α -tocoferol (vitamina E), β -caroteno (pró-vitamina A), ácido ascórbico (vitamina C), entre outras que, associados ao tratamento com BZ, possam atenuar os danos do estresse oxidativo.