

Wendel Coura Vital

**Perfil cinético de classes e subclasses de
imunoglobulinas em cães infectados com formas
tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa
Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* submetidos ou não à
imunossupressão**

**Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas
Ouro Preto, MG
2007**

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Wendel Coura Vital

**Perfil cinético de classes e subclasses de
imunoglobulinas em cães infectados com formas
tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa
Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* submetidos ou não à
imunossupressão**

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre.

Orientador: *Professor Dr. Alexandre Barbosa Reis* - Laboratório de Imunopatologia - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas NUPEB/UFOP. Professor de Parasitologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da UFOP.

Co-orientadora: *Professora Dra. Cláudia Martins Carneiro* - Laboratório de Imunopatologia - Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas NUPEB/UFOP. Professora de Citologia Clínica do Departamento de Análises Clínicas da Escola de Farmácia da UFOP.

**Ouro Preto, MG
2007**

V836p Vital, Wendel Coura.

Perfil cinético de classes e subclasses de imunoglobulinas em cães infectados com formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* submetidos ou não à imunossupressão [manuscrito] / Wendel Coura Vital. - 2007.

xviii, 105 f.: il., color; graf., tabs.

Orientador: Prof. Alexandre Barbosa Reis.

Co-orientadora: Profa. Cláudia Martins Carneiro.

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

Área de concentração: Imunobiologia de protozoários.

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

CDU: 616.937

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br

Colaboradores

Dr. Washington Luiz Tafuri^I

Dra. Marta de Lana^{II}

Dra. Maria Terezinha Bahia^{II}

Dra. Vanja Maria Veloso^{II}

Ms. Helen Rodrigues Martins^{II}

I – Laboratório de Imunopatologia do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas –

NUPEB/UFOP

II – Laboratório de Doença de Chagas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas -

NUPEB/UFOP

Suporte Financeiro

FAPEMIG – Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

PAPES IIIB – Programa de Apoio à Pesquisa em Saúde FIOCRUZ/RJ

Ao meu pai,
certo de que não há entre nós mais
do que um véu material que te oculta às minha
vistas, está sempre ao meu lado.

A minha mãe Wander, e irmã Magally, pelo total apoio
em todos momentos e a Júlia que traz mais
alegria à minha vida.

Agradecimentos

Ao orientador e incansável colaborador Alexandre Barbosa Reis, pela magnânima contribuição através da qual pude vislumbrar novos horizontes e segui-los, exercendo a liberdade de expressão, privilegiado por contar com a sabedoria do mestre e a generosidade do homem comum, com quem aprendi que tudo isso é apenas um ponto em meio a uma longa vida.

“(…) A Quem cultiva um precioso fruto, o saber; profissão de quem não esconde o caminho da fonte, paixão de quem compartilha o conhecimento que clareia a noite, antecipa o dia…”

À Professora Cláudia Martins Carneiro, pela oportunidade concedida de estudar a doença de Chagas no modelo cão, por sua paciência infinita, além da dedicação incessante na co-orientação desta Tese, oferecendo, críticas e sugestões fundamentais e iluminando os caminhos a seguir com seu grande conhecimento científico.

À Professora Marta de Lana, minha admiração pela dedicação ao mundo científico, agradeço aos conselhos, ensinamentos e carinho a mim dispensados.

Ao Rodolfo pelo companheirismo e troca de experiências, sugestões que muito enriqueceram este trabalho e preciosa colaboração no artigo.

À Professora Maria Terezinha Bahia, Vanja Maria Veloso e Paulo Guedes, pelo convívio e companheirismo.

Na pessoa do Professor Dr. Deoclécio Alves Chianca Jr agradeço ao Programa de Pós-graduação do NUPEB pelo conhecimento adquirido.

À Helen Rodrigues, pela oportunidade de aprendizado da técnica de ELISA e leitura da Tese, além de valiosas críticas e sugestões.

À Dra. Juliana Assis do CPqRR, Laboratório de Imunologia Celular e Molecular, meu muito obrigado por ceder gentilmente os antígenos empregados nas reações de ELISA.

Ao Dr. Luis Carlos Crocco Afonso e Dra Simone Aparecida Rezende por permitirem gentilmente a utilização dos equipamentos do Laboratório de Imunologia.

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, Rodolfo, Vitor, Jerusa, Amanda, Nádia, Roberta, Juliana, Ana, Rodrigo, Bruno, Fernanda, Henrique, Paula, Raquel, Sheler, Vanessa e Carolina pelo agradável convívio. À Maria, em especial, pelos momentos de alegria.

À Lorena, pelo auxílio na realização das reações de ELISA e agradável convívio.

Ao Girley Francisco, pela amizade desde a graduação seguida dos estudos para a prova de mestrado e companheirismo quando compartilhávamos a Pós-graduação, além do incentivo que resultou neste feito.

Aos amigos e colegas do curso de Pós-graduação do NUPEB/UFOP, em especial, Alekson e Alexandra.

À Cida, secretária do NUPEB pela atenção e habilidade de semear peculiar alegria no curso de Pós-graduação.

À Januária, pela presença em minha vida, incentivo nas dificuldades e partilha das alegrias.

Ao tio Nery, pelo imenso carinho e apoio, estímulo para uma longa caminhada.

Ao Dr. André Pereira Pinto, Superintendente da Atenção Básica, pela significativa colaboração através da flexibilidade em meus horários de trabalho e crédito em meus latentes potenciais.

À minha irmã Magally pela leitura da Tese e correções ortográficas.

Agradecimento Especial

A Dr^a Andréia Teixeira, pelo inegável apoio e grande ajuda na realização das análises estatísticas deste trabalho. Minha imensa admiração pela presteza e inata habilidade de auxiliar incondicionalmente.

Acima da Verdade

“Acima da verdade estão os deuses.
A nossa ciência é uma falhada cópia
Da certeza com que eles
Sabem que há o Universo.
Tudo é tudo, e mais alto estão os deuses,
Não pertence à ciência conhecê-los,
Mas adorar devemos
Seus vultos como às flores
Porque visíveis à nossa alta vista,
São tão reais como reais as flores
E no seu calmo Olimpo
São outra Natureza”.

Por: Ricardo Reis (Fernando Pessoa)

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO.....	1
2 - REVISÃO DA LITERATURA.....	24
2.1 - Modelos experimentais na doença de Chagas	25
2.2 - Imunossupressão.....	27
2.3 - Resposta imune celular e humoral.....	28
3 - OBJETIVOS.....	32
3.1 - Objetivo geral	33
3.2 - Objetivos específicos	33
4 - MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 Atividades previamente realizadas.....	36
4.1.1 - Animais utilizados.....	36
4.1.2 - Infecção dos cães	36
4.1.3 - Imunossupressão celular.....	37
4.1.4 - Exame parasitológico a fresco	37
4.1.5 - Resposta imune celular ex vivo	37
4.2 - Atividades realizadas neste estudo.....	38
4.2.1 - Preparo do material	38
4.2.2 - Antígeno para reação imunoenzimática	38
4.2.3 - Reação imunoenzimática (ELISA).....	38
4.2.4 - Análises estatísticas	40
5 - RESULTADOS	42
5.1 - Análise da cinética da produção de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.	44
5.2 - Análise da cinética da produção de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção. .	47
5.3 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e parasitemia em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.	50
5.4 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e parasitemia em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.	52

5.5 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos T (Thy-1 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	54
5.6 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos T (Thy-1 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	56
5.7 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos T (CD4 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	58
5.8 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos T (CD4 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	60
5.9 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos T (CD8 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	62
5.10 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos T (CD8 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	64
5.11 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos B (CD21 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	66
5.12 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos B (CD21 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	68
5.13 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e monócitos (CD14 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	70
5.14 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e monócitos (CD14 ⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	72
5.15 - Síntese das cinéticas significativas entre o perfil de imunoglobulinas e os fenótipos celulares em animais imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.....	76
6 - DISCUSSÃO.....	78
7 - CONCLUSÕES.....	92
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	95

Lista de abreviaturas

CD- *Cluster differentiation*

CD14- Marcador de superfície de monócitos

CD4- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares/indutores

CD8- Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T citotóxicos/supressores

CD21- Marcador de superfície celular de linfócitos B

DAI - Dias após a infecção

DC -Doença de Chagas

ELISA- *Enzyme linked immunosorbent assay*

GPI- Glicofosfatidilinositol

HIV - Vírus da Imunodeficiência Humana

Ig- Imunoglobulina

IgG- Imunoglobulina da classe G

IgG1- Imunoglobulina da subclasse G1

IgG2- Imunoglobulina da subclasse G2

IgG2a - Imunoglobulina da subclasse G2a de camundongo

IgG2b - Imunoglobulina da subclasse G2b de camundongo

IgG3 - Imunoglobulina da subclasse G3

IgG4 - Imunoglobulina da subclasse G4

IgM- Imunoglobulina da classe M

IgA- Imunoglobulina da classe A

IgE- Imunoglobulina da classe E

INF- γ - Interferon-gama

KO - *Knock-out*

LIT- *Liver infusion tryptose*

LVC - Leishmaniose visceral canina

MHC- Complexo principal de histocompatibilidade (classe I e classe II)

n- número de cães por grupo

NK- células Natural Killer

OMS- Organização Mundial de Saúde

PBS- *Phosphate buffer saline*

PFR - *Paraflagellar rod proteins*

RIFI- Reação de Imunofluorescência Indireta

rpm- Rotação por minuto

SRD - Sem raça definida

SFB- Soro fetal bovino

SIDA - Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

SMF- Sistema fagocitário mononuclear

TDR - *Training in Tropical Diseases*

TH- Células T *helper*

THY-1- Marcador de superfície celular de linfócitos T (pan T) caninos

TH1- Células T CD4+ secretoras de padrão 1 de citocinas (IL-2 e INF- γ)

TM- Tripomastigota metacíclico

TMIMS - Grupo infectado com tripomastigota metacíclico

TNF- α - Fator de Necrose Tumoral tipo α

TS - Tripomastigota sangüíneo

TSIMS - Grupo imunossuprimido infectado com tripomastigota sangüíneo

WHO- Organização Mundial da Saúde

Lista de Tabelas

Tabela 1: Painel de anticorpos empregados nos testes sorológicos para detectar classes e subclasses de imunoglobulinas nos soros dos cães..... 40

Tabela 2: Valores de r (Pearson) e p , encontrados na análise de correlação entre as imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgM e IgA e os fenótipos Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺, nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos..... 75

Lista de Figuras

- Figura 1:* Delineamento experimental, demonstrando as análises previamente realizadas e as análises realizadas neste estudo. 35
- Figura 2:* Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 em cães imunocompetentes e imunossuprimidos experimentalmente infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Be-78 do *T. cruzi*. 46
- Figura 3:* Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em cães imunocompetentes e imunossuprimidos experimentalmente infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas da cepa Be-78 do *T. cruzi*. 49
- Figura 4:* Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação a parasitemia média nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 51
- Figura 5:* Perfil de imunoglobulinas da classe IgM, IgA e IgE em relação a parasitemia média nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 53
- Figura 6:* Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual sistêmico de células T (Thy-1⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 55
- Figura 7:* Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual sistêmico de células T (Thy-1⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 57
- Figura 8:* Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual sistêmico de células T (CD4⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 59
- Figura 9:* Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual sistêmico de células T (CD4⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 61
- Figura 10:* Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual sistêmico de células T (CD8⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 63
- Figura 11:* Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual sistêmico de células T (CD8⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 65
- Figura 12:* Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual sistêmico de células B (CD21⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 67

Figura 13: Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual sistêmico de células B (CD21⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos 69

Figura 14: Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual sistêmico de monócitos (CD14⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos 71

Figura 15: Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual sistêmico de células B (CD14⁺) nos grupos imunocompetentes e imunossuprimidos. 73

Figura 16: Síntese das cinéticas significativas entre o perfil de imunoglobulinas e os fenótipos celulares em animais imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção..... 77

RESUMO

No presente trabalho o perfil cinético das classes de imunoglobulinas anti-*T. cruzi* IgG, IgM, IgA e IgE e subclasses IgG1 e IgG2 foi avaliado em cães infectados com as formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* semanalmente até o 35º dia após a infecção. Foram utilizados 24 cães sem raça definida imunossuprimidos ou não com azatioprina. Estes cães foram subdivididos em seis grupos de quatro animais: controle (C), infectado com formas tripomastigotas sanguíneas (TS), infectado com formas tripomastigotas metacíclicas (TM), controle imunossuprimido (CIMS), imunossuprimido infectados com formas tripomastigotas sanguíneas (TSIMS) e imunossuprimido infectados com formas tripomastigotas metacíclicas (TMIMS). Foi avaliada a cinética dos níveis de imunoglobulinas nos dias zero, sete, 14, 21, 28 e 35 e suas correlações com a curva de parasitemia e os percentuais de células mononucleares do sangue periférico (Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺). Os resultados mostram que a forma infectante interfere na cinética do perfil de resposta humoral em cães imunocompetentes, sendo que animais infectados com as formas TS apresentam maiores níveis de imunoglobulinas em relação aos animais infectados com as formas TM. Cães infectados com as formas TS, tiveram aumento nos níveis de IgG e IgM, manutenção dos níveis basais de IgG1, IgG2 e IgA ao longo do tempo e aumento de IgE seguido de decréscimo. Por outro lado os cães infectados com as formas TM apresentaram aumento nos níveis de IgG, IgG2, IgM e IgA e manutenção dos níveis basais de IgG1 e IgE. A imunossupressão com azatioprina interfere no perfil de resposta humoral reduzindo os níveis de IgG, IgG1, IgG2, IgA e IgE em praticamente todos os animais. Entretanto, IgA e IgE o grupo TMIMS foi significativamente maior que no grupo TM. Por outro lado, os níveis de IgM foram ascendentes a partir do 21º dia após a infecção. Durante a fase aguda da infecção não foi encontrada correlação entre os perfis de classes e subclasses de imunoglobulinas com a parasitemia. Entretanto, a análise de correlação entre os perfis cinéticos de imunoglobulinas e os fenótipos celulares permitiu detectar inúmeras correlações, destacando-se as seguintes: no grupo TS correlações negativas de IgG e IgM com linfócitos T CD4⁺ e positivas com linfócitos T CD8⁺, enquanto em TM destacam-se as correlações positivas de IgG com linfócitos T CD8⁺ e de IgG1 com linfócitos B CD21⁺. Nos animais imunossuprimidos de ambos os grupos destacam-se as correlações

negativas de IgG e IgM com linfócitos B CD21⁺, enquanto as correlações positivas foram de IgG e IgM com linfócitos T CD8⁺ no grupo infectado com TS e com linfócitos T CD4⁺ no grupo infectado com TM. Assim, estes distintos perfis permitem hipotetizar que a infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas é capaz de induzir uma atividade policlonal de linfócitos B mais diversificada que pode ser responsável pelo maior período pré-patente neste grupo sugerindo um equilíbrio na relação parasito/hospedeiro. Além disso, o comprometimento da resposta celular nos cães imunossuprimidos interfere na interação célula T – B prejudicando a síntese de anticorpos em ambos os grupos. Finalmente, a mortalidade de 50% observada apenas no grupo imunossuprimido infectado com as formas tripomastigotas metacíclicas pode ser devido ao somatório destas alterações, mais pronunciadas neste grupo.

Palavras Chave: doença de Chagas, resposta humoral, resposta celular, imunossupressão e *Trypanosoma cruzi*.

ABSTRACT

In the present work a detailed follow-up investigation of the profile of anti- *T. cruzi* immunoglobulins (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA and IgE), was evaluated in dogs infected with metacyclic (MT) and blood (BT) trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* strain Berenice-78, typifying vectorial and transfusional transmission of human Chagas disease, during 35 days of the acute phase of the infection, submitted or not to immunosuppression (Azatioprine). The animals (24) were subdivided in six experimental groups with four animals in each one: uninfected control, infected with blood trypomastigotes, infected with metacyclic trypomastigotes, uninfected immunosuppressed, infected with blood trypomastigotes immunosuppressed and infected with metacyclic trypomastigotes immunosuppressed. The kinetics of immunoglobulin levels was evaluated in zero, seven, 14, 21, 28 and 35 days after infections and their correlations with the parasitemia curve and the percentile of peripheral blood mononuclear cells (Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ and CD14⁺) were performed. The results show that the infective forms interfere in the kinetics of the humoral response profile in immunocompetent dogs, and dogs infected with BT showed higher immunoglobulins levels in relation to MT group. Dogs infected with BT presented an increase of IgG and IgM levels, maintenance of IgG1, IgG2 and IgA levels along the time and an increase of IgE followed by a decrease. On the other hand, dogs infected with forms MT presented an increase of IgG, IgG2, IgM and IgA levels and maintenance of IgG1 and IgE levels. Independent of the infective forms, the profile of humoral response presented reduced levels of IgG, IgG1, IgG2, IgA and IgE levels in practically all animals immunosuppressed. However, in dogs immunosuppressed infected with TM presented an increase of IgA and IgE in relation to immunocompetent. During the acute phase of the infection it was not found a correlation between the profiles of immunoglobulins and parasitemia. However, the correlation analysis between kinetic profiles of immunoglobulin and cellular phenotypes allowed to detect countless correlations, drawing special attention to the following ones: i) in the BT group, negative correlations of IgG and IgM with T CD4⁺ lymphocytes and positive with T CD8⁺ lymphocytes were observed, ii) in MT the positive correlations of IgG with T CD8⁺ lymphocytes and IgG1 with B CD21⁺ lymphocytes were observed. Dogs immunosuppressed of both groups presented negative correlations of IgG and IgM with

B CD21⁺ lymphocytes; positive correlations of IgG and IgM with T CD8⁺ lymphocytes were observed in the group infected with TS and with T CD4⁺ lymphocytes in the group infected with MT. In conclusion, these different profiles raise the hypothesis that the infection using metacyclic trypomastigotes forms of *T. cruzi* is capable to induce a more diversified polyclonal activated B cells that can be responsible for the largest period pre-patent in this group, suggesting a balance in the relationship parasite/host. Besides, the failure of the cellular response in immunosuppressed dogs interferes with the interaction T - B cells, thus damaging the synthesis of antibodies in both groups. At last, the 50% of mortality observed only in the immunosuppressed group infected with metacyclic trypomastigotes forms can be due to the sum of these alterations, more pronounced in this group.

Key Words: Chagas disease, response humoral, response cell, immunosuppressed and *Trypanosoma cruzi*.

1 - INTRODUÇÃO

Desde sua descoberta há aproximadamente um século, a doença de Chagas (DC) permanece como um sério problema de saúde pública, apesar dos inúmeros esforços empregados na redução de sua incidência. Atualmente, estima-se que a prevalência é de 16 a 18 milhões de casos e aproximadamente 120 milhões de pessoas encontram-se em área de risco de infecção na América Latina, sendo que 30 a 36 milhões estão progredindo para a fase crônica sintomática, causando considerável morbidade e mortalidade (WHO, 2005).

Essa moléstia, descoberta por Carlos Chagas em 1909 foi estudada em seus aspectos básicos pelo pesquisador, que desvendou seu agente etiológico, o *Trypanosoma cruzi*, bem como sua biologia nos hospedeiros vertebrados e invertebrados, seus reservatórios e diversos aspectos patológicos e sintomatológicos da doença (CHAGAS, 1909).

A doença de Chagas é uma infecção caracterizada por uma fase aguda, que é sucedida na maioria dos casos, por uma fase crônica. A fase aguda é geralmente assintomática, estando os sinais e sintomas mais freqüentemente relacionados ao estado imunológico do hospedeiro. As taxas de óbito variam entre 2% a 10% nessa fase, ocorrendo principalmente em crianças de até quatro anos de idade (LOPES *et al.*, 1994). A fase aguda se caracteriza por parasitemia elevada, processo inflamatório intenso, quadro toxêmico febril e clínico fugaz. As lesões inflamatórias, nessa fase, comprometem principalmente o tecido cardíaco, cujo quadro histopatológico se caracteriza por reação inflamatória, constituída predominantemente por células mononucleares, parasitadas ou não, produzindo fenômenos degenerativos intensos (PARADA *et al.*, 1997). A gênese das lesões está relacionada à presença do parasito e sua evolução parece estar diretamente associada a fatores como virulência da cepa, carga do inóculo, reinfecções e/ou eficiência do sistema imune do hospedeiro (HIGUCHI, 1995). Essa fase dura aproximadamente dois meses, evoluindo para a fase crônica, que persistirá por toda a vida do hospedeiro. Devido à escassez de sintomas, a infecção passa despercebida e só é verificada tardiamente através de testes sorológicos e/ou parasitológicos.

Durante a fase crônica, a resposta imune do hospedeiro é capaz de controlar a proliferação do parasito, levando a parasitemia a níveis subpatentes. A maioria dos indivíduos (70%) permanece na forma indeterminada caracterizada pela ausência de alterações nos exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen.

Entretanto, vários anos após a infecção, 20% a 35% dos indivíduos desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo do coração, esôfago e/ou cólon (MONCAYO, 2003), caracterizando as formas clínicas sintomáticas da DC. A cardiopatia fibrosante, descompensada ou não, constitui a maior causa de morbidade e mortalidade na fase crônica da doença (TEIXEIRA *et al.*, 1990). Na América Latina, a DC representa a primeira causa de lesão cardíaca em jovens e em adultos em idade economicamente produtiva (MONCAYO, 2003).

O ciclo de vida do *T. cruzi* envolve estágios morfológicos distintos, mas apenas as formas tripomastigotas sanguíneas (TS) e as tripomastigotas metacíclicas (TM) apresentam moléculas necessárias para a interação e/ou invasão das células do hospedeiro (RAMIREZ *et al.*, 1993). Estas formas evolutivas estão presentes no ciclo de vida do *T. cruzi* em momentos distintos. A forma TM é encontrada no intestino posterior do hospedeiro invertebrado, enquanto a TS está presente na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado infectado. Desta forma, a infecção experimental utilizando a forma TM representa a infecção natural pelo vetor e a forma TS a infecção por transfusão de sangue contaminado ou transmissão congênita.

Durante o repasto sanguíneo, o triatomíneo ingere as formas TS presentes na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado e estas, no lúmen do trato digestivo, se transformam em esferomastigotas e epimastigotas. As formas epimastigotas se multiplicam por divisão binária no intestino posterior do triatomíneo originando as formas TM. Quando o triatomíneo infectado realiza o repasto sanguíneo as formas TM são eliminadas junto das fezes e urina penetrando pelo local da picada ou mucosa, infectando as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). Nestas células a tripomastigota diferencia-se em amastigota, iniciando a multiplicação e diferenciação em TS, que após vários ciclos de multiplicação promovem o rompimento das células parasitadas. As formas TS alcançam então a corrente sanguínea, disseminando a infecção para os diferentes tecidos e órgãos (ELKELES, 1951; KOLLIEN & SCHAUB, 2000).

Um dos principais mecanismos de transmissão da DC é através do vetor infectado, sendo o *Rhodnius prolixus* e o *Triatoma infestans* os mais importantes vetores no ciclo doméstico da DC (KOLLIEN & SCHAUB, 2000). A importância da transmissão vetorial se deve ao fato de densidades mínimas do vetor infectado serem suficientes para garantir a proliferação da doença no ambiente humano, visto que os

triatomíneos se adaptam facilmente à vivenda humana. Além disso, diversos países apresentam espécies de triatomíneos cujo potencial de domiciliação ainda permanece desconhecido (DIAS, 2000). Atividades visando o controle da transmissão vetorial tiveram início na década de 40, por meio de medidas como melhorias habitacionais e controle do inseto vetor. Entretanto, os programas de controle somente começaram a ser implantados após a década de 70, impulsionadas por dados científicos que demonstraram o impacto social da doença. Desde então, esses programas conseguiram reduzir substancialmente a transmissão vetorial da doença em grande parte dos países endêmicos (ACHE & MATOS, 2001; DIAS *et al.*, 2002).

Os movimentos migratórios do campo para a cidade, nas décadas de 1970 e 1980 mudaram o padrão epidemiológico de transmissão da doença, que até então ocorria principalmente no meio rural, passa também ao ambiente urbano devido às transfusões sangüíneas com sangue contaminado (MONCAYO, 2003). Nesse contexto, a DC adquirida por transfusão sangüínea tornou-se um sério problema, mesmo em países onde a doença não é endêmica, tais como os EUA e Canadá onde casos da doença aguda foram documentados (KICRCHHOFF *et al.*, 1993; NICKERSON *et al.*, 1989). Em 10 países da América Sul e três da América Central, 100% dos doadores de sangue são monitorados. Taxas de infecção variam de 0.1 a 4.2% na Argentina, Brasil, Chile e Uruguai, podendo chegar a 24,4% na Bolívia (TDR, 2002).

A transmissão congênita é a terceira mais importante via de transmissão do parasito, mas outros mecanismos também são observados, incluindo as transfusionais, as transmitidas por acidentes de laboratórios e por via oral. A transmissão oral com formas TM do *T. cruzi* tem sido registrada em surtos no Pará, Amazônia e Santa Catarina, onde microepidemias de doença aguda, provavelmente devido à contaminação oral foram verificadas (SHIKANAI-YASUDA *et al.*, 1991; BARBOSA, 2006).

Embora já tenha sido demonstrado que a resposta imune do hospedeiro é um importante fator para determinar o curso da infecção e que formas distintas do *T. cruzi* podem ocasionar diferentes perfis de resposta (BRENER & GAZINELLI, 1997), o conhecimento desta nos indivíduos infectados com as formas TS e TM é ainda pouco compreendido. Além disso, com o surgimento da síndrome da imunodeficiência adquirida (SIDA) vários casos de reativação da DC têm sido descritos (DEL CASTILLO *et al.*, 1990; ROSEMBERG *et al.*, 1992; SOLARI *et al.*, 1993) e pouco se sabe sobre o comportamento dos perfis da resposta humoral nestes casos.

Portanto, este trabalho pretende verificar o perfil de imunoglobulinas das classes IgG, IgM, IgA e IgE e subclasses IgG1 e IgG2 em cães infectados com as formas TS ou TM da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* e correlacionar estes perfis a parasitemia e aos fenótipos celulares (Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺) do sangue periférico de animais submetidos ou não à imunossupressão celular com azatioprina.

2 – REVISÃO DA LITERATURA

2.1 - Modelos Experimentais na Doença de Chagas

Atualmente, diversos modelos experimentais vem sendo utilizados para o estudo da DC. A Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 1984) preconiza que um bom modelo experimental em DC é aquele capaz de reunir facilidade de manutenção e preço acessível, permitindo o isolamento do parasito durante o curso da infecção, apresentando reações sorológicas positivas indicativas da persistência da infecção e reproduzindo as diversas manifestações clínicas da DC crônica, tendo também a capacidade de desenvolver miocardite, miosite e outras alterações histopatológicas características da doença.

Fatores inerentes ao hospedeiro como raça, sexo, idade e espécie e também ao parasito como cepa, forma e tamanho do inoculo, virulência, imunogenicidade e tropismo parecem interferir nas manifestações clínicas da doença.

Em decorrência disso, as alterações encontradas quando se varia a forma infectante do *T. cruzi* ganham relevância, bem como a avaliação de animais sem raça definida, o que permitiria retratar a realidade das populações humanas, que são, na sua maioria, descendentes de miscigenação racial.

Modelos experimentais capazes de reproduzir as alterações patológicas encontradas em humanos têm sido amplamente estudados. Dentre eles, o murino é ainda o mais utilizado devido ao fácil manuseio e obtenção, baixo custo, além de possuir linhagens geneticamente modificadas, o que amplia possibilidades de investigações científicas. Além disso, há disponível no mercado, vasta gama de produtos biotecnológicos específicos para este modelo, além de anticorpos monoclonais anti-marcadores de superfície celular, citocinas, quimiocinas, dentre outros. No entanto, alguns fatores limitam a utilização deste modelo, como o fato de não serem capazes de desenvolver todas as formas clínicas da DC. Vale mencionar a pouca utilização dos ratos, justificada pelo fato de apresentarem maior resistência à infecção, apesar do fácil manuseio e manutenção em laboratórios.

Na tentativa da obtenção de um modelo experimental ideal para o estudo da DC, a possibilidade do emprego do cão (*Canis familiaris*) foi, no passado, amplamente avaliada. Atualmente, esse modelo consagrou-se pela alta representatividade na investigação de diversos aspectos da doença, como elevada susceptibilidade à infecção e similaridade nas manifestações das fases aguda e crônica com os humanos (é possível

reproduzir a fase aguda sintomática e a fase crônica em suas formas indeterminada e cardíaca) (ANDRADE & ANDRADE, 1980; ANDRADE *et al.*, 1984; LANA *et al.*, 1988; LANA, 1992; LANA *et al.*, 1992; GUEDES, 2001; BAHIA *et al.*, 2002). Ao se comparar camundongos inoculados com as cepas Be-78 e Be-62 percebe-se uma menor virulência e patogenicidade da Be-78 nestes animais (LANA, 1981; LANA & CHIARI, 1986). Entretanto, resultados diferentes são encontrados ao se avaliar o modelo canino, onde se percebe maior virulência e patogenicidade da cepa Be-78 em relação à Be-62 (LANA *et al.*, 1988; 1992).

Este modelo destaca-se também, pela capacidade de reproduzir a cardiopatia chagásica fibrosante de forma semelhante à humana (LANA *et al.*, 1988; 1992). Além disso, os animais de canis de experimentação são extremamente dóceis e longevos, podendo sobreviver por aproximadamente 15 a 20 anos, constituindo pelas razões mencionadas, modelo experimental ideal para o estudo da DC segundo os critérios da OMS (WHO, 1984).

A partir da década de 90, houve significativa preocupação da comunidade científica com a alta taxa de co-infecção pelo *T. cruzi* e vírus HIV, com presença ou ausência de manifestações da SIDA (VAIDIAN *et al.*, 2004). Houve então, maior concentração de esforços por parte do nosso grupo no sentido da compreensão da resposta imune de cães submetidos a protocolos de imunossupressão (CARNEIRO, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2007), uma vez que este modelo experimental já havia sido estabelecido para o estudo da DC. Análises do perfil sorológico de IgG e IgM em cães experimentalmente infectados com *T. cruzi* foram realizadas pela primeira vez por Lana *et al.* (1991). Recentemente, pesquisadores de nosso grupo realizaram estudos envolvendo a presença de anticorpos líticos e o perfil de classes e subclasses de Ig em cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* (GUEDES, 2006). Entretanto, pouco ainda se sabe sobre a resposta humoral na DC, considerando o papel de classes e subclasses de imunoglobulinas na infecção com diferentes formas evolutivas do *T. cruzi*, principalmente no modelo cão.

2.2 - Imunossupressão

A associação de doenças infecciosas à imunossupressão nas últimas décadas tornou-se uma das grandes preocupações da comunidade médica, despertando o interesse e atenção da OMS.

Doenças que levam a imunossupressão como a leucemia e linfoma de Hodgkin associados à DC propiciam a reagudização desta doença. Atualmente, com a expansão da pandemia da SIDA e os avanços tecnológicos na área de transplantes de órgãos, a reagudização da DC tem se tornado relativamente freqüente, confirmando que o equilíbrio da relação parasito/hospedeiro é fundamental na manutenção das formas indeterminada e crônica da DC.

Usualmente, manifestações severas da DC em pacientes imunossuprimidos resultam na reativação das infecções crônicas previamente assintomáticas ou oligossintomáticas. (GRANT *et al.*, 1989; NICKERSON *et al.*, 1989).

As alterações anatomopatológicas mais encontradas na associação entre DC e imunossupressão são a meningoencefalite e a miocardite aguda (FERREIRA & BORGES, 2002).

Estudos experimentais em camundongos e ratos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e submetidos a tratamentos com diferentes drogas imunossupressoras demonstraram reativação da doença com aumento na parasitemia, além de agravo da miocardite e aumento da mortalidade, confirmando assim o caráter oportunista deste parasito (BRENER & CHIARI, 1971; MCCABE *et al.*, 1985; SINAGRA *et al.*, 1993). Durante a fase aguda da DC foi observado aumento da gravidade da infecção, com expansão da multiplicação do parasito e aumento da mortalidade (ANDRADE & MACEDO, 1973). Durante a fase crônica Brener e Chiari (1971) demonstraram que a imunossupressão com ciclofosfamida resulta na reativação da infecção, mas não altera o curso da infecção se realizada com azatioprina. Outros estudos demonstraram que ciclofosfamida (MAGALHAES & ANDRADE, 1994) e ciclosporina (AMATO NETO *et al.*, 1986) não modificam o curso da infecção, exceto por tornar a parasitemia subpatente detectável. Andrade *et al.* (1987) demonstraram que cães infectados pelo *T. cruzi* e submetidos à imunossupressão com baixas doses de ciclofosfamida na fase crônica da doença apresentam comprometimento cardíaco mais grave com presença de

miocardite intensa, necrose focal das fibras miocárdicas e invasão das fibras lesadas por células inflamatórias mononucleadas.

2.3 - Resposta imune celular e humoral.

Nos mamíferos, o ciclo de vida do *T. cruzi* intracelular (amastigotas) e extracelular (tripomastigotas), leva o organismo a desenvolver uma resposta imune humoral e celular. Camundongos com deficiência em ambas as subpopulações de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$) apresentam maior carga parasitária, morrendo mais precocemente que animais com deficiência de apenas uma subpopulação, indicando que as duas sub-populações têm papel na resposta ao parasito (TARLETON *et al.*, 1996). Além disso, camundongos incapazes de produzir anticorpos vivem por mais tempo que aqueles deficientes de linfócitos T $CD4^+$ ou $CD8^+$, sugerindo que as populações celulares são mais importantes que a produção de anticorpos no controle da infecção (TARLETON *et al.*, 1996). Na DC os Linfócitos T $CD4^+$ atuam promovendo ativação de células B, linfócitos T $CD8^+$ e macrófagos (KUMAR & TARLETON, 1998).

Diversos estudos tem mostrado os linfócitos T $CD8^+$, INF- γ e macrófagos como importantes elementos no controle da proliferação do parasito durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, durante a qual é observada uma forte ativação do sistema imune (BRENER & GAZZINELLI, 1997). A ativação inespecífica de macrófagos (ORTIZ-ORTIZ *et al.*, 1976) e células *natural killer* (NK) (HARTCHER *et al.*, 1981) acompanhados de ativação policlonal de linfócitos B e T e hipergamaglobulinemia são observados durante estágios iniciais da DC experimental (MINOPRIO *et al.*, 1986).

Linfócitos T $CD4^+$ do tipo 1 (Th1) apresentam múltiplas funções em mecanismos relacionados à resistência na DC. Dentre eles, destaca-se a síntese de INF- γ capaz de ativar macrófagos e a ativação de linfócitos T $CD8^+$, exercendo importante papel nos mecanismos de citotoxicidade (BRENER & GAZZINELLI, 1997). Além disso, a ausência de células $CD4^+$ e $CD8^+$, em camundongos gera maior susceptibilidade às cepas do *T. cruzi* com baixa virulência (ROTTENBERG *et al.*, 1995).

Estudos em camundongos *Knock-out* (KO) revelaram que algumas citocinas são fundamentais no controle da parasitemia. Camundongos KO para IL-10 apresentaram baixa parasitemia na fase aguda da infecção, provavelmente devido à ação de IFN- γ , IL-12 e TNF- α , pois o tratamento com anti-IL-12 e anti-TNF- α ocasiona aumento da

parasitemia. Já o tratamento com anti-IL-4 não alterou a susceptibilidade dos animais à infecção, demonstrando que esta citocina não desempenha papel regulatório na DC (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996).

Devido ao fato de a replicação do *T. cruzi* realizar-se no interior do citosol, supõe-se que os antígenos são processados e expressos pela molécula de MHC de classe I. Estudos *in vitro* indicam que células infectadas pelo *T. cruzi* são reconhecidas pelos linfócitos T CD8⁺ obtidos de animais também infectados pelo parasito (NICKELL *et al.*, 1993).

Estudos envolvendo pacientes com miocardite chagásica crônica evidenciaram a presença tanto de linfócitos T CD4⁺ quanto CD8⁺ no exsudato inflamatório, sendo a última mais numerosa. A presença dos linfócitos CD8⁺ em contato com miocardiócitos em destruição sugere uma ação patogênica dessas células na miocardite chagásica crônica (TOSTES *et al.*, 1994).

Em relação à resposta humoral na DC, observa-se uma ativação policlonal de linfócitos B e elevação da produção de imunoglobulinas. Kierszenbaum e Howard (1976) demonstraram que baixos níveis de anticorpos relacionavam-se à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* e que existe correlação entre a produção de anticorpos e resistência à infecção. Ao ampliar a compreensão sobre a resposta humoral, Krettl e Brener (1982) demonstraram que hospedeiros infectados produzem anticorpos durante a fase crônica, que reagem apenas com tripomastigotas vivos do *T. cruzi*, sendo também responsáveis pela mediação de sua lise, ficando então conhecidos como anticorpos líticos. Este tipo de anticorpo, após tratamento, não é mais detectado no soro dos pacientes, sendo esse fato considerado critério de cura, mesmo quando a sorologia convencional continua positiva. A detecção dos anticorpos líticos é realizada através da reação de lise mediada pelo complemento (KRETTLI & BRENER, 1982) e/ou pela técnica de citometria de fluxo desenvolvida por Martins-Filho *et al.*, (1995) aplicada para o diagnóstico da DC ou para critério de cura, podendo, para isso, ser empregadas formas tripomastigotas vivas ou fixadas (MARTINS-FILHO *et al.*, 1995; CORDEIRO *et al.*, 2001).

Foi verificado então, que pacientes infectados pelo *T. cruzi* apresentam duas formas de anticorpos: os protetores (líticos) e os não protetores, sendo estes encontrados pela sorologia convencional.

Estudos demonstrando a participação de IgG2a, IgG2b e IgG1 na proteção durante a infecção experimental pelo o *T. cruzi* sugerem que em murinos, IgG1 e IgG2b comportam-se como anticorpos líticos, uma vez que, se vacinados com o clone CL-14 da cepa CL produzem altos níveis de IgG1 e IgG2b, o que parece estar relacionado com resistência a infecção pelo *T. cruzi* ocasionada pela vacinação. A diferença observada na produção de imunoglobulinas entre os animais vacinados e não vacinados demonstra a importância destes isotipos na proteção da doença (PYRRHO *et al.*, 1998).

Os modelos experimentais da DC têm sido muito úteis por fornecer maior entendimento do curso da infecção bem como dos mecanismos relacionados à resistência/suscetibilidade. Camundongos C57BL/6 e BALB/c são alguns dos modelos adotados, sendo úteis para o estudo da influência do hospedeiro na resposta à infecção. O C57BL/6, quando infectado pela cepa Tulahuen apresenta uma forma aguda letal que se deve, não à carga parasitária, mas ao desequilíbrio entre as citocinas pró e anti-inflamatórias, gerando excessiva reação inflamatória e menor eficiência da resposta imune humoral, o que não ocorre com BALB/c, no qual a infecção é menos severa (ROGGERO *et al.*, 2002; PÉREZ *et al.*, 2005).

Mecanismos multifatoriais parecem estar envolvidos na patogênese da DC, sendo que os eventos imunológicos podem desempenhar importante papel neste contexto (BRENER, 1980). Em estudos de fase crônica, foi verificado, em portadores de diferentes formas clínicas, aumento na produção de IgA em pacientes com maior comprometimento do sistema digestivo (SÁ FERREIRA *et al.*, 1983; PRIMAVERA *et al.*, 1988). Sá Ferreira *et al.* (1983) não encontraram, nesses pacientes, alterações na produção de IgG e IgM, considerando as diferentes formas clínicas.

Pacientes com diferentes graus de alterações cardíacas apresentam aumento de IgG1 e IgG3 e baixos níveis de IgG2 e IgG4 pelo método de ELISA empregando antígenos de epimastigotas. Ao utilizar a fração citosólica ácida como antígeno, observou-se aumento apenas de IgG1 (CERBAN *et al.*, 1993). Esses achados permitiram verificar a existência de alterações no perfil de resposta humoral em função do antígeno empregado na reação, o que foi observado também em murinos (CERBAN *et al.*, 1991). Outros estudos demonstram que as subclasses IgG1 e IgG3 têm sido associadas com a forma crônica da DC em humanos, e neste caso também não foi observado correlação com a forma clínica da doença (MORGAN *et al.*, 1996; 1998; CORDEIRO *et al.*, 2001). Michailowsky *et al.* (2003), ao utilizarem antígenos de

proteínas dos flagelos do *T. cruzi* PFR (*paraflagellar rod proteins*) encontraram como principais imunoglobulinas dos pacientes, os isotipos IgG1 e IgG3. Observaram também, que os linfócitos T CD4⁺ são a principal fonte de IFN- γ quando estimulados pelo antígeno do *T. cruzi* *in vitro*.

Um dos primeiros trabalhos envolvendo resposta humoral em cães foi realizado por Lana *et al.* (1991). Neste estudo foi observado por imunofluorescência indireta que os níveis de IgM e IgG ascendiam a partir do início da infecção, sendo que IgM aumentava até o terceiro mês e IgG até o 15^o mês. A partir daí, observou-se decréscimo de IgG até os dois anos com posterior estabilização. Os testes realizados por ELISA foram mais sensíveis, detectando IgM e IgG até o segundo ano após a infecção e a partir daí, o decréscimo de IgM (LANA *et al.*, 1991).

Vários aspectos relacionados à resposta humoral na DC canina ainda permanecem obscuros. Considerando a enorme importância do modelo canino em estudos experimentais e objetivando maiores elucidações, o presente trabalho buscou avaliar, do ponto de vista imunológico, a evolução dessa resposta e sua correlação com as células mononucleares do sangue periférico de cães infectados pelas formas TS ou TM da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*, durante a fase aguda, associada ou não à imunossupressão.

Diante de tais objetivos, vários aspectos merecem ser ponderados, a saber: a cinética do perfil de classes e subclasses de imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE) durante fase aguda da infecção experimental canina pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, bem como o comportamento do perfil destas imunoglobulinas em cães imunossuprimidos pela azatioprina infectados pela cepa Be-78. Considerando a importância da resposta celular na infecção chagásica, foi avaliada também a correlação entre os perfis de imunoglobulinas e as alterações fenotípicas das células mononucleares do sangue periférico, com a finalidade de entender a conexão dos principais eventos entre a resposta imune humoral e celular.

3 – OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral:

Avaliar o perfil de resposta imune humoral, sua correlação com a parasitemia e com o percentual de células mononucleares do sangue periférico em cães experimentalmente infectados com formas TS ou TM da cepa Be-78 do *T. cruzi*, submetidos ou não à imunossupressão com azatioprina, durante a fase aguda da infecção.

3.2 - Objetivos específicos:

- Avaliar a cinética dos perfis de classes IgG, IgM, IgA e IgE e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas na infecção experimental com formas TS ou TM da cepa Be-78 do *T. cruzi* em cães imunocompetentes e imunossuprimidos, durante a fase aguda da infecção.

- Correlacionar as cinéticas dos perfis de classes IgG, IgM, IgA e IgE e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas com a evolução da parasitemia na infecção experimental empregando as formas TS ou TM da cepa Be-78 do *T. cruzi* em cães imunocompetentes e imunossuprimidos, durante a fase aguda da infecção.

- Correlacionar as cinéticas dos perfis de imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE) com os percentuais de células mononucleares (Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺) na infecção experimental empregando as formas TS ou TM da cepa Be-78 do *T. cruzi* em cães imunocompetentes e imunossuprimidos, durante a fase aguda da infecção.

4 - MATERIAL E MÉTODOS

O presente estudo teve como objetivo central avaliar o perfil de classes e subclasses de imunoglobulinas em cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*, submetidos ou não à imunossupressão. Para sua realização, foi utilizada a soroteca do Laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP) constituída de soros obtidos a partir do projeto de Doutorado da Prof^a. Cláudia Martins Carneiro. Nesse sentido, a metodologia foi descrita em duas etapas que consistem em atividades previamente realizadas e outras realizadas, conforme descrito a seguir.

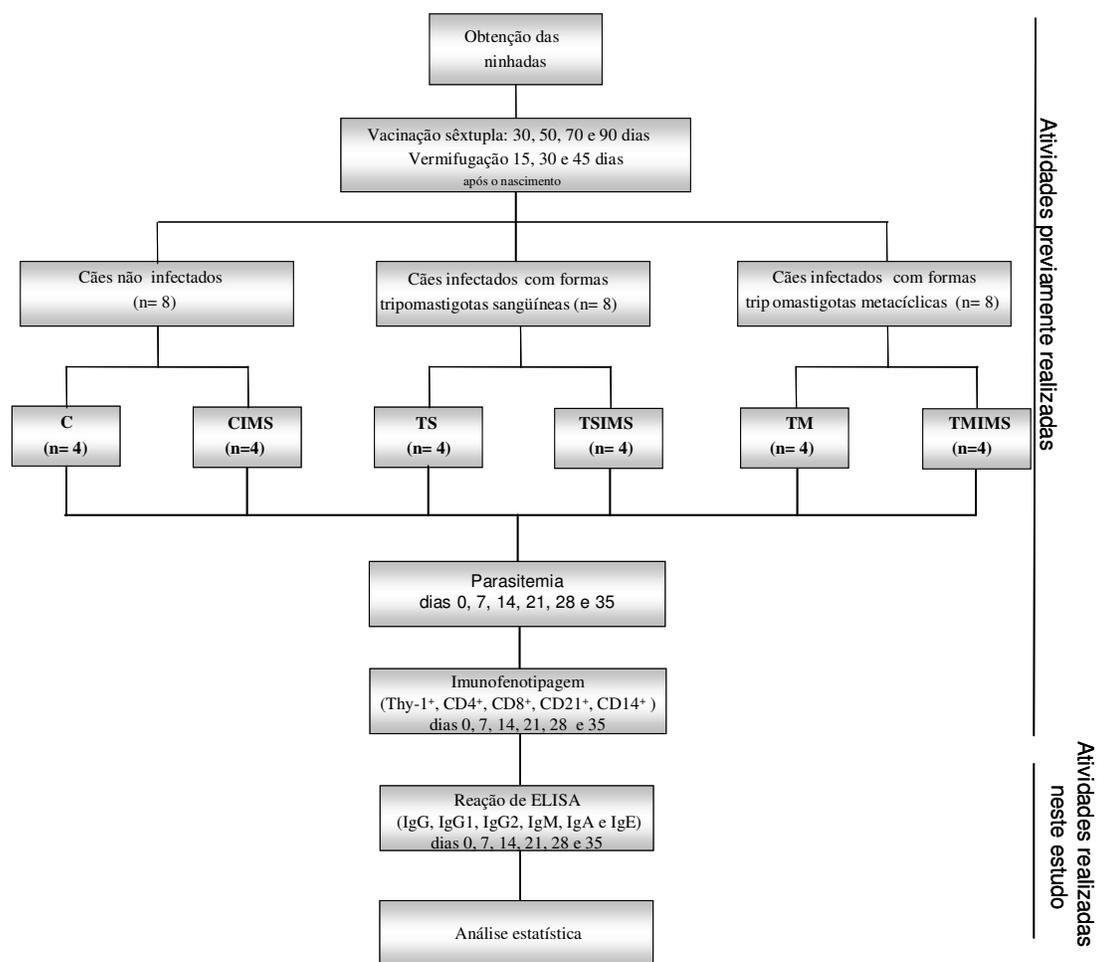


Figura 1: Delineamento experimental, demonstrando as análises previamente realizadas e as análises realizadas.

4.1 Atividades previamente realizadas

4.1.1 - Animais utilizados

Neste estudo, foi utilizado um total de 24 cães jovens (quatro meses de idade) sem raça definida (SRD) de ambos os sexos (12 fêmeas e 12 machos). Os filhotes foram mantidos com a mãe até o desmame e nesse período foi realizado o controle de endo e ectoparasitoses, onde todos os animais foram tratados com anti-helmíntico de largo espectro (Drontal Plus[®], Schering-Plough Coopers, São Paulo, SP, Brazil), aos 15, 30 e 45 dias após o nascimento. Para a vacinação contra Parvovirose, Cinomose, Leptospirose canina, Coronavírus, Adenovírus tipo 2 e Parainfluenza, foi empregada a vacina Vanguard[®] HTLP 5/CV-L (Pfizer, New York, NY, USA) em um esquema vacinal realizado nos dias 30, 50, 70 e 90 após o nascimento, via subcutânea no dorso anterior. Os animais foram divididos em seis grupos constituídos de quatro animais, com dois machos e duas fêmeas. Os grupos foram denominados: C (controle), CIMS (controle imunossuprimido), TS (infectado com formas tripomastigotas sangüíneas), TM (infectado com formas tripomastigotas metacíclicas), TSIMS (infectado com formas tripomastigotas sangüíneas imunossuprimido) e TMIMS (infectado com formas tripomastigotas metacíclicas imunossuprimido). Durante os experimentos, os animais foram mantidos no canil do biotério central da Universidade Federal de Ouro Preto, em baias lavadas diariamente com solução de hipoclorito a 1%, onde eram mantidos com livre acesso à água e ração para filhotes (Faro[®], Guabi, São Paulo, Brasil).

4.1.2 - Infecção dos cães

Todos os animais utilizados foram pesados no dia da inoculação e identificados por características físicas peculiares (resenha fenotípica), tendo os dados registrados em pastas individuais. Os animais foram inoculados com 2000 formas tripomastigotas sangüíneas (TS e TSIMS) ou metacíclicas (TM e TMIMS) por Kg/peso pela via intraperitoneal. As formas sanguíneas foram obtidas de camundongos infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, por via intraperitoneal e as formas TM de ninfas de *Triatoma infestans* provenientes da colônia de triatomíneos do Laboratório de Doença de Chagas.

4.1.3 - Imunossupressão celular

A imunossupressão foi obtida pelo uso da droga Azatioprina (Imunem[®] do Laboratório Cristália – Produtos Químicos Farmacêuticos Ltda). Trata-se de um antimetabólico que se incorpora ao DNA inibindo a sua síntese. Além disso, essa droga é um potente imunossupressor celular, que atua precocemente no ciclo proliferativo dos clones de linfócitos B e T, bloqueando a síntese de DNA e RNA em resposta à estimulação antigênica. Os animais dos grupos imunossuprimidos (CIMS, TSIMS e TMIMS) receberam a Azatioprina 2mg/Kg de peso corporal via oral (RINKARDT *et al.*, 1999) diariamente, a partir do dia da inoculação até o dia da necrópsia.

4.1.4 - Exame parasitológico a fresco

A parasitemia dos animais infectados pelo *T. cruzi* foi determinada diariamente, a partir do décimo dia após a inoculação. O sangue periférico foi coletado por punção da veia marginal da orelha e a contagem da parasitemia realizada de acordo com a técnica de Brener (1962).

4.1.5 - Resposta imune celular *ex vivo*

O fenótipo das populações celulares do sangue periférico foi determinado até o 35º dia, conforme técnica estabelecida por Reis *et al.* (2005). As reações de imunofenotipagem foram realizadas nos dias zero, sete, 14, 21, 28 e 35 após a infecção. Foi avaliado o percentual médio das populações de linfócitos T (Thy-1⁺) das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺), de linfócitos B (CD21⁺) e de monócitos (CD14⁺). Para obtenção dos dados, foi utilizado um citômetro de fluxo (FACScalibur – Becton Dickinson, San Jose, EUA) acoplado a computador onde os dados foram armazenados e posteriormente analisados pelo programa *Cell Quest* (Becton Dickinson, San Jose, EUA).

Nesse trabalho, foram utilizados estes dados obtidos por Carneiro (2002) para a análise de correlação com as imunoglobulinas das classes IgG, IgM, IgA e IgE e

subclasses IgG1 e IgG2. A figura 1 mostra o fluxograma dos procedimentos previamente realizados e os executados neste estudo.

4.2 - Atividades realizadas neste estudo

4.2.1 - Preparo do material

Os soros dos cães infectados, foram obtidos durante do trabalho de doutorado da Prof^a Cláudia Martins Carneiro. Este material foi recodificados antes da execução dos experimentos de ELISA e após as reações foram decodificados para análise dos dados obtidos.

4.2.2 - Antígeno para reação imunoenzimática

Para os testes de ELISA foi utilizado antígeno solúvel de epimastigota e estes foram isolados de cultura de cepa Y do *T. cruzi* na fase exponencial de crescimento em meio LIT. Os parasitos foram lavados 3 vezes por centrifugação a 2000 rpm em solução tampão fosfato pH 7,2 por 10 minutos. Em seguida, foram submetidos a três ciclos de ultra-som (Sonifier Cell Disruptor[®] - Branson Sonic Power Co., EUA) durante 1 minuto a 40 Watts, em banho de gelo. Posteriormente, o material sonicado foi centrifugado a 18.500 rpm por 1 hora e 30 minutos a 4°C. O sobrenadante foi dializado contra PBS, durante 1 dia e meio sendo submetido à troca do PBS a cada 6 horas. Por fim, o material remanescente na membrana de diálise foi filtrado em filtros estéreis descartáveis de 0,22 µm, em condições assépticas e uma alíquota retirada para dosagem de proteína pelo método de Lowry *et al.*, (1951) sendo ajustado para 1.000µg/mL. Amostras do antígeno foram aliquotadas e congeladas à -70°C até o momento do uso.

4.2.3 – Reação imunoenzimática (ELISA)

Foram realizadas reações imunoenzimáticas de ELISA para as imunoglobulinas das classes IgG, IgM, IgA e IgE e subclasses, IgG1 e IgG2 em soros colhidos nos dias zero, sete, 14, 21, 28 e 35 após a infecção.

O teste de ELISA para detecção de anticorpos anti-*T. cruzi* foi realizado segundo o protocolo descrito por Voller *et al.* (1979) com algumas modificações.

A sensibilização das placas de poliestireno de fundo chato (MaxiSorp™ Surface, Nunc-Immuno Plate, USA) foi procedida com 0,5µg de antígeno de *T. cruzi* por orifício. Foi aplicado em cada orifício, 100µL da solução de antígeno em tampão carbonato pH 9,6 e após este procedimento as placas foram incubadas *overnight* (18horas) a temperatura de 4°C. O excesso de antígeno foi retirado das placas lavando-as por quatro vezes com solução de lavagem (Solução salina contendo Tween-20 a 0,05%). Posteriormente, foi realizado o bloqueio de ligações inespecíficas aplicando 100µL/orifício de solução de PBS com 5% SFB. Em seguida, as placas foram incubadas a 37°C por 45 minutos, e após este prazo foram lavadas duas vezes com solução de lavagem. Os soros, em duplicata e na diluição de 1:80, foram então aplicados às placas e estas foram novamente incubadas em estufa a 37°C por 45 minutos. Após esse intervalo, seguiu-se a lavagem por quatro vezes e a aplicação do conjugado na concentração padronizada. As placas foram novamente incubadas por 45 minutos a 37°C e em seguida, lavadas quatro vezes com solução de lavagem. Posteriormente, foi adicionado 100 µL/orifício da solução de tampão citrato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,03% de O-fenilendiamino e 0,012% H₂O₂ como substrato, mantendo-as a 37°C, por 10 minutos, após este prazo foi adicionado 32µL/orifício de solução de ácido sulfúrico (H₂SO₄) a 2,5M para interrupção da reação. As leituras foram realizadas no leitor de ELISA (Molecular Devices, E Max, USA) a 490nm e os resultados foram expressos em densidade ótica. Em todas as placas foram utilizados soros controle positivos e negativos.

O painel de conjugados que foram utilizados nas reações de ELISA foi constituído de anticorpo policlonal anti-IgG (Sheep anti-dog IgG-heavy and light chain HRPO conjugated), anti-IgG1 (Goat anti-dog IgG1-heavy chain specific HRPO conjugated), anti-IgG2 (Sheep anti-dog IgG2- heavy chain specific HRPO conjugated), anti-IgM (Goat anti-mu chain specific dog IgM- HRPO conjugated), anti-IgA (Goat anti-dog IgA-alpha chain specific HRPO conjugated) e anti-IgE (Goat anti-dog IgE-epsilon chain specific HRPO conjugated). Todos os anticorpos foram produzidos pela empresa (Bethyl laboratories, Inc Montgomery – Texas, EUA) e encontram-se sumarizados na Tabela 1. A padronização da diluição usada de conjugado foi determinada por titulação em bloco, empregando-se soros padrões positivos e negativos.

As diluições empregadas na realização dos testes foram 1:16.000 para o conjugado anti-IgG, anti-IgG1 e anti-IgG2, 1:500 para anti-IgM e anti-IgA, 1:1.000 para anti-IgE.

Os valores de *cut-off* foram calculados através das médias acrescido duas vezes o desvio padrão dos valores de 10 soros de animais não-infectados pelo *T. cruzi*, testados em paralelo aos avaliados.

Os valores de *cut-off* encontrados para IgG, IgG1 e IgG2 foram 0,140, 0,070 e 0,230 respectivamente. Os valores de *cut-off* encontrados para IgM, IgA e IgE foram 0,220, 0,300 e 0,200 respectivamente. Estes valores não foram expressos nos gráficos porque o objetivo deste trabalho não é avaliar diagnóstico e sim a cinética das imunoglobulinas durante a fase aguda da DC

Tabela 1: Painel de anticorpos empregados nos testes sorológicos para detectar classes e subclasses de imunoglobulinas nos soros dos cães.

CLASSES E SUBCLASSES (Imunoglobulinas)	ANTICORPOS ESPECÍFICOS ANTI-Ig-CÃO PARA AVALIAÇÃO SOROLÓGICA (ELISA)	
	Conjugado	Afinidade molecular
Anti-IgG	HRPO	Molécula total
Anti-IgG 1	HRPO	Específico para cadeia pesada
Anti-IgG 2	HRPO	Específico para cadeia pesada
Anti-IgM	HRPO	Específico para cadeia μ
Anti-IgA	HRPO	Específico para cadeia α
Anti-IgE	HRPO	Específico para cadeia ϵ

Todos os anticorpos foram produzidos pela **BETHYL laboratories, INC** (Montgomery - Texas/EUA).

4.2.4 – Análises estatísticas

As diferenças encontradas entre os valores médios de imunoglobulinas nos dias zero, sete, 14, 21, 28 e 35 após infecção foram avaliadas empregando a Análise de Variância-ANOVA ONEWAY utilizando o teste Bonferroni's Multiple Comparison Test. As diferenças entre os dias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

Ao realizar a análise pontual comparando os grupos de animais em cada dia foi utilizado o teste de *t* Student não pareado. As diferenças entre os dias foram consideradas significativas quando $p < 0,05$.

As correlações entre imunoglobulinas e parasitemia e entre imunoglobulinas e fenótipo, foram executadas através da análise de correlação de Pearson com intervalo de confiança de 0,95%. Todas as análises citadas foram realizadas no programa GraphPad Prism 4.0.

Para confecção do quadro de correlações imunoglobulinas versus fenótipo celular (Figura 16) foi empregado a análise de regressão linear no programa Microsoft Excel XP.

5 – RESULTADOS

Diante do exposto e da escassez de estudos que abordam a resposta imune humoral na DC experimental canina bem como sua correlação com a resposta celular, nos propusemos a investigar tais abordagens.

Para melhor compreensão dos dados gerados neste estudo foi estabelecida uma apresentação na qual será exposta inicialmente, a análise da cinética do perfil de classes e subclasses de imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos. Posteriormente, estes resultados serão correlacionados às curvas de parasitemia e aos percentuais de células mononucleares do sangue periférico (Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺).

Na primeira abordagem, serão apresentadas as médias das reatividades encontradas nos ensaios de IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE no grupo C em relação aos grupos TS e TM e também do grupo TS comparado ao TM. Da mesma forma, será apresentada a análise comparativa nos grupos imunossuprimidos, CIMS em relação à TSIMS e TMIMS bem como entre TSIMS e TMIMS. Esta abordagem de análise permitirá avaliar o padrão de resposta humoral em relação à categoria da infecção a que o animal foi submetido. Além disso, será apresentada a análise longitudinal dos dados, o que permitirá verificar se há diferença significativa entre os tempos analisados em cada grupo durante a fase aguda.

Na segunda abordagem, será comparado o perfil de classes e subclasses das imunoglobulinas às curvas de parasitemia nos grupos TS, TM, TSIMS e TMIMS. Esta medida nos permitirá avaliar o impacto da produção de imunoglobulinas em relação à parasitemia de cada grupo de animais.

Na terceira e última abordagem serão apresentadas as correlações encontradas entre as imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE) e os percentuais de células mononucleares do sangue periférico (Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺) com o objetivo de buscar perfis relacionados a resposta imune humoral e celular.

5.1 - Análise da cinética da produção de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

Os resultados da cinética de produção das imunoglobulinas estão expressos pelos valores das médias encontradas por dia de coleta em cada grupo e estão representados na Figura 2.

Os dados demonstram níveis ascendentes de IgG a partir do 14º dia de infecção no grupo TS. O pico de produção dessa imunoglobulina ocorreu no 35º dia ($0,316 \pm 0,038$), sendo que a partir do 21º dia foi observada uma elevação significativa nos títulos de IgG em relação aos dias zero, sete e 14. Já o grupo TM apresentou um maior nível de IgG no 21º dia ($0,269 \pm 0,084$), mais tardiamente do que o observado no grupo TS. No 28º dia ($0,138 \pm 0,037$) ocorreu diminuição significativa na produção desta imunoglobulina em relação ao 21º dia, vindo novamente a aumentar no 35º dia ($0,241 \pm 0,055$).

A comparação entre os grupos mostrou que o grupo TS apresentou maior reatividade de IgG em relação ao grupo TM nos dias sete, 14 e 28. Nos dias 21, 28 e 35 este aumento foi observado em relação ao grupo controle.

Os cães imunossuprimidos apresentaram baixa produção de IgG, sendo encontrada diferença significativa nos grupos TMIMS e TSIMS em relação ao CIMS apenas nos dias 21º e 28º, respectivamente. No 35º dia após infecção (DAI) o grupo TSIMS apresentou diferença significativa na produção de IgG em relação aos dias sete, 14 e 21.

Ao avaliar a subclasse IgG1 foram detectados baixos níveis desta imunoglobulina em todos os grupos, entretanto, no 14º dia o grupo TS apresentou diferença significativa de IgG1 em relação ao grupo TM. Apesar de no sétimo dia de infecção o grupo TS apresentar pico de produção de IgG1 ($0,145 \pm 0,098$), não foi encontrada diferença significativa na análise longitudinal. Já nos cães imunossuprimidos não foi observada diferença significativa entre os grupos em nenhum dos tempos da cinética. Foi observado que o grupo TSIMS apresenta diminuição significativa nos níveis de IgG1 no 14º dia após a infecção.

Em relação à subclasse IgG2, foi observado um maior reatividade entre esta imunoglobulina no grupo TS em relação ao C nos dias 21 e 35 e no grupo TS em

relação ao TM no sétimo dia. Na comparação entre os grupos TM e C foi observado um maior reatividade de IgG2 em TM no 21º dia. Houve maior produção de IgG2 no grupo TM no 21º dia de infecção ($0,286 \pm 0,129$) em relação aos dias zero e 28 e no TS no sétimo dia ($0,313 \pm 0,107$), apesar de neste dia não ter sido encontrada diferença significativa na análise longitudinal. Os animais imunossuprimidos do grupo TSIMS apresentaram maiores níveis de IgG2 em relação ao grupo CIMS nos dias sete, 28 e 35. Já TMIMS teve maiores níveis de IgG2 nos dias 21 e 28 em relação ao grupo CIMS. Não foi encontrada diferença significativa entre os grupos imunossuprimidos infectados em nenhum dos dias avaliados.

Ao ser realizada a análise estatística entre os grupos TS e TSIMS foi verificado que os cães imunocompetentes apresentam maiores níveis de IgG ($p < 0,0001$) e IgG2 ($p < 0,0001$) em relação aos imunossuprimidos. Nos grupos TM e TMIMS também foram encontrados os mesmos resultados em relação aos níveis de IgG ($p = 0,0092$) e IgG2 ($p < 0,0001$) em comparação aos imunossuprimidos. Já IgG1, nos cães infectados com formas TM ocorreu o inverso. Os cães do grupo TMIMS apresentaram maiores níveis da imunoglobulina IgG1 ($p < 0,001$) que os imunocompetentes.

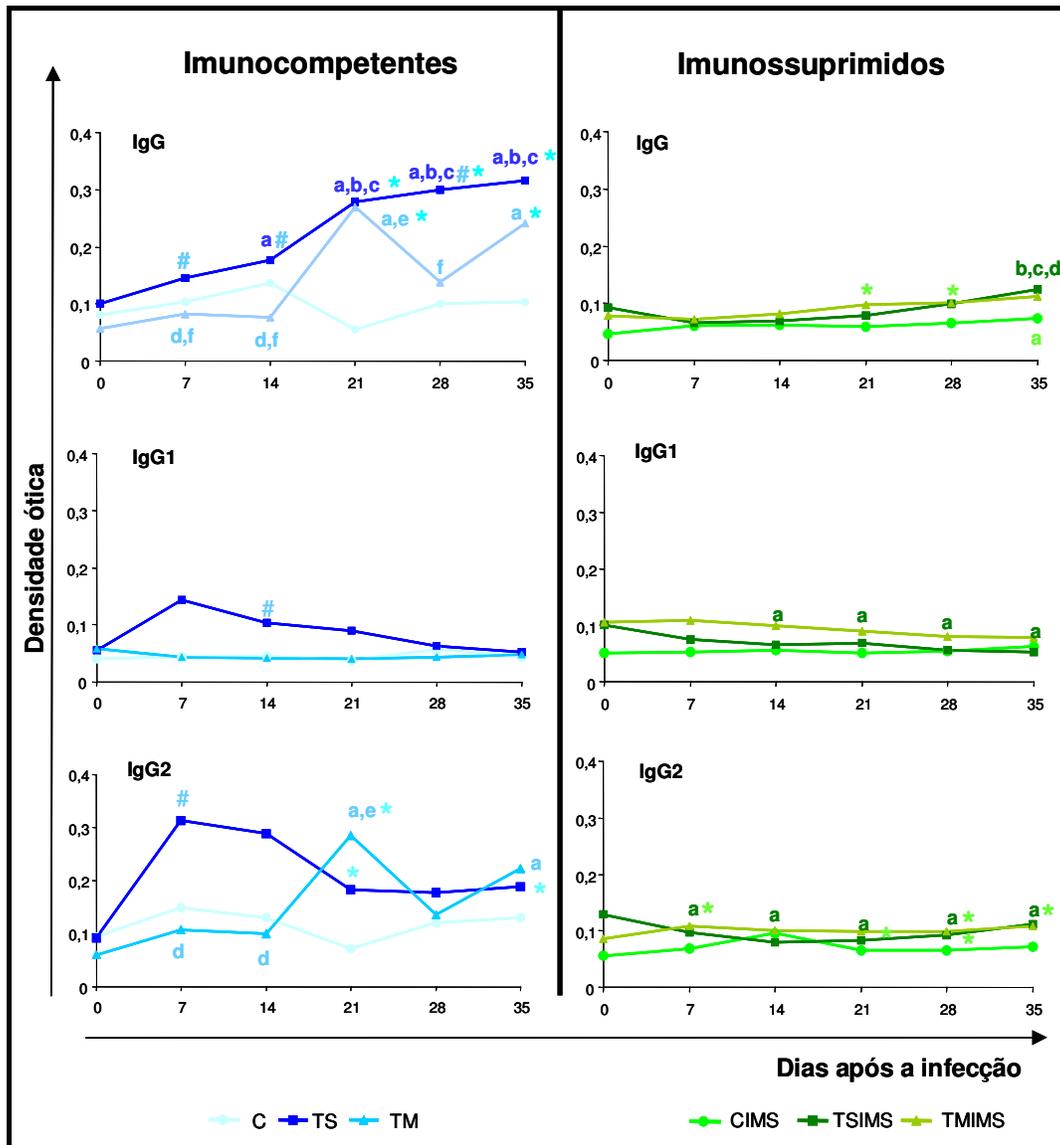


Figura 2: Perfil de imunoglobulinas anti-*T. cruzi* da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 em cães imunocompetentes e imunossuprimidos experimentalmente infectados com formas tripomastigotas sangüíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *T. cruzi*. (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) dos grupos infectados, imunossuprimidos ou não em relação ao controle não infectado; (#) representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos infectados imunocompetentes ou imunossuprimidos. As diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à avaliação longitudinal de cada grupo estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, f relacionadas aos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 de infecção, respectivamente. Limiar de reatividade: IgG: 0,140; IgG1: 0,070; IgG2: 0,230.

5.2 - Análise da cinética da produção de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

Os resultados da cinética de produção das imunoglobulinas IgM, IgA e IgE encontram-se ilustrados na Figura 3 e são expressos como as médias da densidade ótica das imunoglobulinas em cada grupo, nos seis tempos avaliados.

Níveis ascendentes de IgM em TS foram observados a partir do 7º dia de infecção, mantendo-se aumentando até o 35º dia. O grupo TS apresentou uma elevação significativa de IgM em relação aos grupos C e TM nos dias sete, 14, 21 e 28 e no dia 35 apenas em relação ao grupo C. Já no grupo TM foram observados maiores níveis de IgM em relação ao grupo C nos dias 21 e 35. Os cães imunossuprimidos do grupo TSIMS e TMIMS apresentaram uma maior produção de IgM no 28º e 35º dia de infecção. No 28º e 35º dia o grupo TSIMS mostrou aumento nos níveis de IgM em relação aos dias zero, sete e 14; e o grupo TMIMS apresentou elevação de IgM em relação aos dias zero, sete, 14 e 21. Na análise comparativa entre os grupos foi observado que o grupo TSIMS apresentou maior reatividade na produção de IgM em relação ao controle nos dias 21, 28 e 35, enquanto em TMIMS este aumento foi notado nos dias 28 e 35.

A análise de IgA mostrou que o grupo TS teve maior reatividade de IgA em relação ao grupo C nos dias sete, 14, 21, 28 e 35 e com TM nos dias sete, 14 e 21. Não foi observada diferença significativa entre os grupos TM e C em nenhum dos dias avaliados. O grupo TM apresentou aumento dos níveis de IgA a partir do 21º dia. Nos animais imunossuprimidos não foram observadas diferenças significativas entre os grupos. Entretanto, o grupo TSIMS apresentou nos dias 21 e 28 um ligeiro aumento nos níveis de IgA em relação aos dias zero e sete e o grupo TMIMS no 35º dia em relação aos dias 14 e 21.

A análise da imunoglobulina da classe IgE no grupo TS revelou pico de produção no dia sete ($0,273 \pm 0,088$) em relação aos dias zero e 21 ($p < 0,05$). Além disso, foi observado na análise entre grupos um maior nível de IgE no grupo TS em relação ao grupo C e TM neste dia. Já o grupo TM apresentou maior reatividade de IgE no 35º dia em relação ao controle. Os dados do grupo TS demonstram um decréscimo

na produção de IgE a partir do 7º dia, mas não foi observada diferença significativa em relação aos demais dias em função desta queda.

Os cães imunossuprimidos do grupo TSIMS apresentaram níveis significativamente maiores de IgE em relação ao controle nos dias zero, sete e 14 e maiores níveis de IgE ($p<0,05$) no grupo TMIMS em relação ao controle no sétimo dia.

A análise estatística entre os grupos TS e TSIMS mostrou que os cães imunocompetentes apresentam maiores níveis de IgM e IgA (IgM, $p=0,0001$ e IgA, $p<0,0001$) em relação ao cães imunossuprimidos. Já entre os grupos TM e TMIMS não foi observada diferença significativa em relação a IgM e IgA. Entretanto, foram observados maiores níveis de IgE ($p=0,0001$) nos cães do grupo TMIMS em relação ao grupo TM.

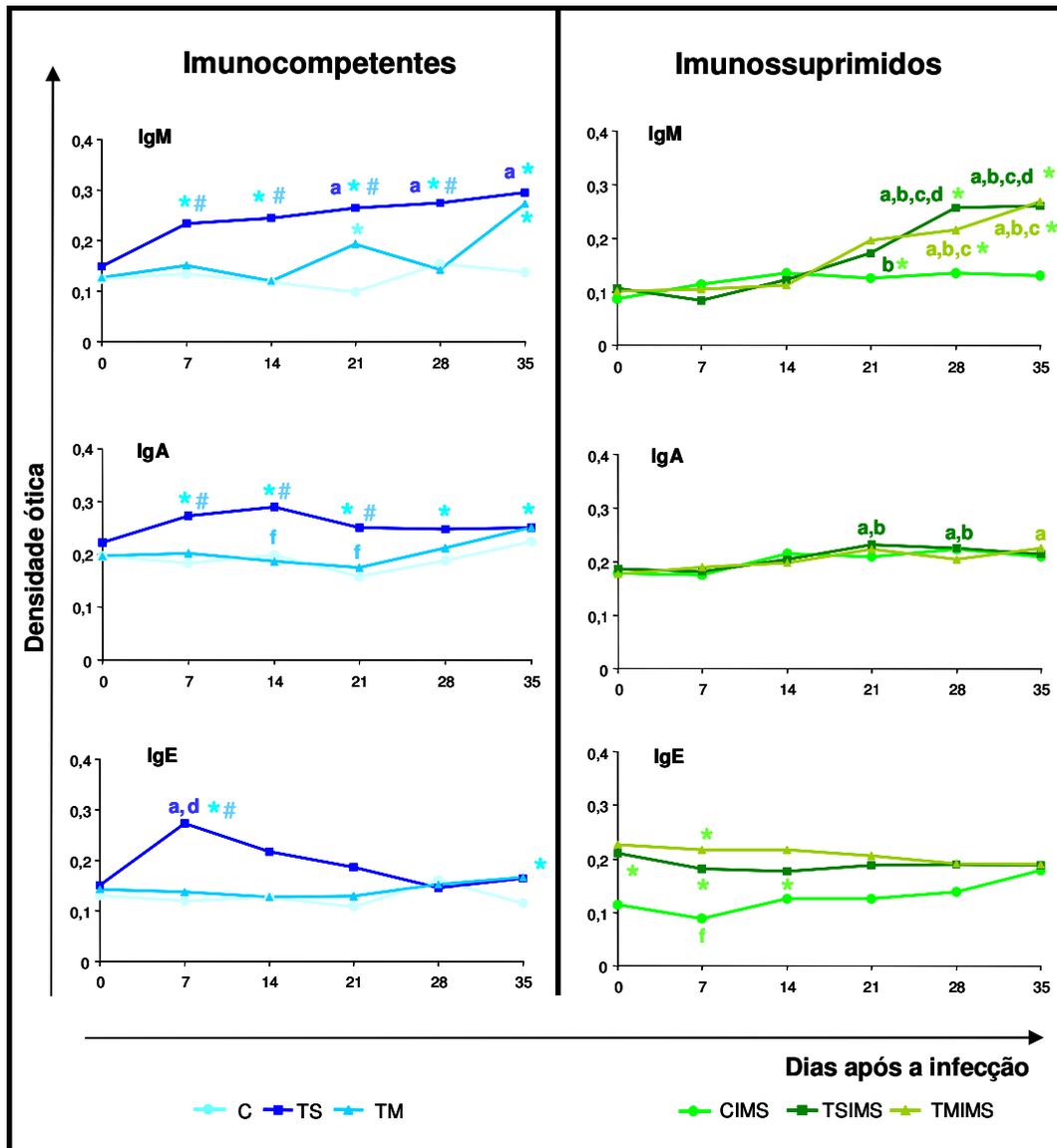


Figura 3: Perfil de imunoglobulinas anti-*T. cruzi* das classes IgM, IgA e IgE em cães imunocompetentes e imunossuprimidos experimentalmente infectados com formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *T. cruzi*. (*) representa diferença significativa ($p < 0,05$) dos grupos infectados, imunossuprimidos ou não em relação ao controle não infectado; (#) representa diferença significativa ($p < 0,05$) entre os grupos infectados imunocompetentes ou imunossuprimidos. As diferenças significativas ($p < 0,05$) em relação à avaliação longitudinal de cada grupo estão representadas pelas letras a, b, c, d, e, f relacionadas aos dias 0, 7, 14, 21, 28, 35 de infecção, respectivamente. Limiar de reatividade: IgM: 0,220; IgA: 0,300; IgE: 0,200.

5.3 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e parasitemia em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

Os resultados das análises de correlação da classe IgG e das subclasses (IgG1 e IgG2) de imunoglobulinas e a parasitemia em cães imunocompetentes e imunossuprimidos estão ilustrados através de gráficos de linha (Figuras 4 e 5) das médias de valores absolutos de densidade ótica em cada grupo, nos seis tempos avaliados (zero, sete, 14, 21, 28 e 35). Já os dados de parasitemia foram avaliados diariamente a partir do 10º dia de infecção e estão expressos pela média do número de tripomastigotas/0,1mL de sangue (Figuras 4 e 5).

Considerando isoladamente o parasitismo, foi verificado que a parasitemia nos animais imunossuprimidos apresenta-se mais elevada em relação aos cães imunocompetentes como observado nas Figuras 4 e 5.

O aumento nos níveis de IgG nos cães imunocompetentes antecede o pico de parasitemia no grupo TS e TM (Figura 4). Tanto a IgG quanto a IgG2 no grupo TM apresentam o mesmo perfil de comportamento. O grupo TS apresenta um aumento mais precoce de IgG2 reduzindo a partir do 14º dia (Figura 4). Entretanto, como descrito anteriormente, não foi encontrada diferença significativa na análise longitudinal de IgG2 (TS) em nenhum dos dias. Em relação a IgG1, nota-se que não há alteração em sua produção em relação à parasitemia.

Nos cães imunossuprimidos tanto do grupo TSIMS quanto no grupo TMIMS os níveis de IgG, IgG1 e IgG2 encontram-se baixos durante todo o curso da parasitemia. Foi observada ausência de correlação entre os perfis destas imunoglobulinas e a parasitemia durante os tempos avaliados.

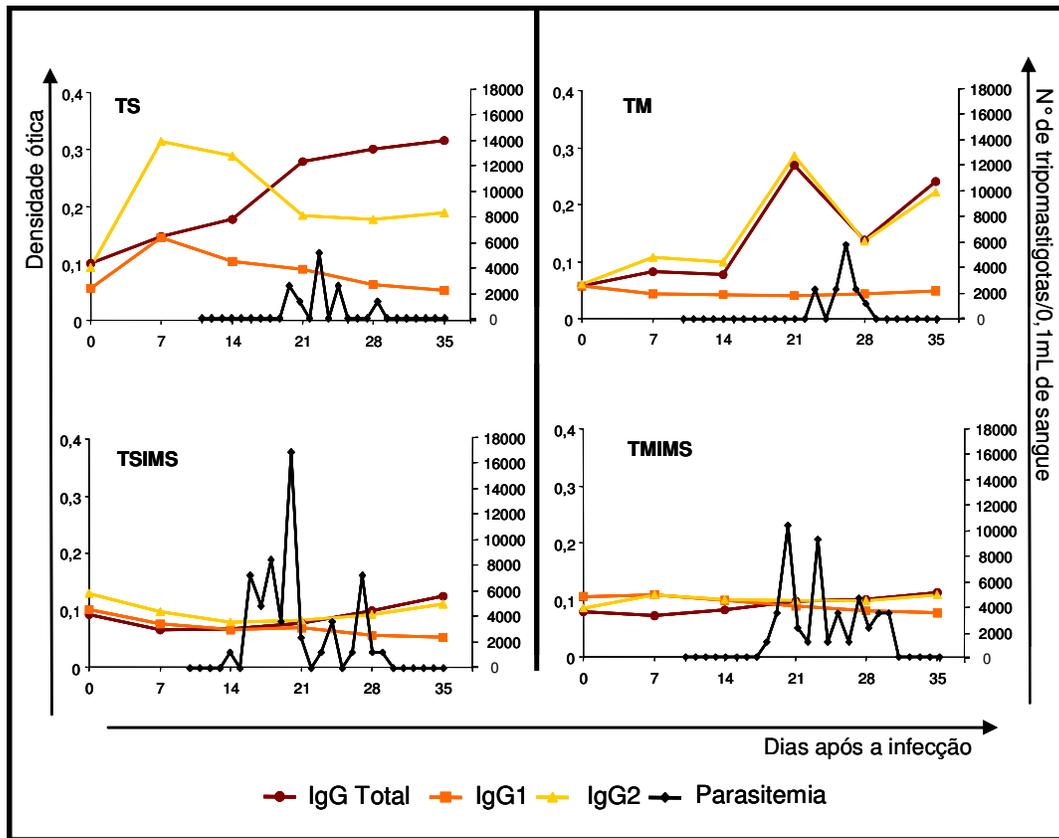


Figura 4: Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação a parasitemia média nos grupos imunocompetentes (TS, TM) e imunossuprimidos (TSIMS, TMIMS) inoculados pela via intraperitoneal com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS, TSIMS) ou metacíclicas (TM, TMIMS) da cepa Be-78 do *T. cruzi* por Kg de peso corporal. Limiar de reatividade: IgG: 0,140; IgG1: 0,070; IgG2: 0,230.

5.4 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e parasitemia em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A produção de IgM em todos os grupos, imunocompetente e imunossuprimidos, apresentou um pequeno aumento que antecedeu o pico de parasitemia (Figura 5). Entretanto, no grupo TM ocorreu certa oscilação no perfil desta classe de imunoglobulina. Nos grupos TSIMS e TMIMS a IgM aumentou após o 14º dia.

Nenhuma correlação foi observada entre o perfil de IgM e o comportamento da parasitemia nos cães imunocompetentes e imunossuprimidos.

Em relação às classes IgA e IgE, foi observada uma diminuição no perfil destas imunoglobulinas nos dias que antecederem o aumento da parasitemia no grupo TS (Figura 5). Já no grupo TM ocorreu um pequeno aumento de IgA e IgE durante o período de parasitemia patente, que se estendendo até o 35º dia. Ao analisar os cães imunossuprimidos não foi observada nenhuma alteração no comportamento de IgE em relação a parasitemia. Enquanto para IgA, notou-se um pequeno aumento nos dias próximos ao pico de parasitemia (Figura 5). Nenhuma correlação foi observada para os perfis de IgA e IgE em relação a parasitemia tanto para os cães imunocompetentes quanto para os cães imunossuprimidos.

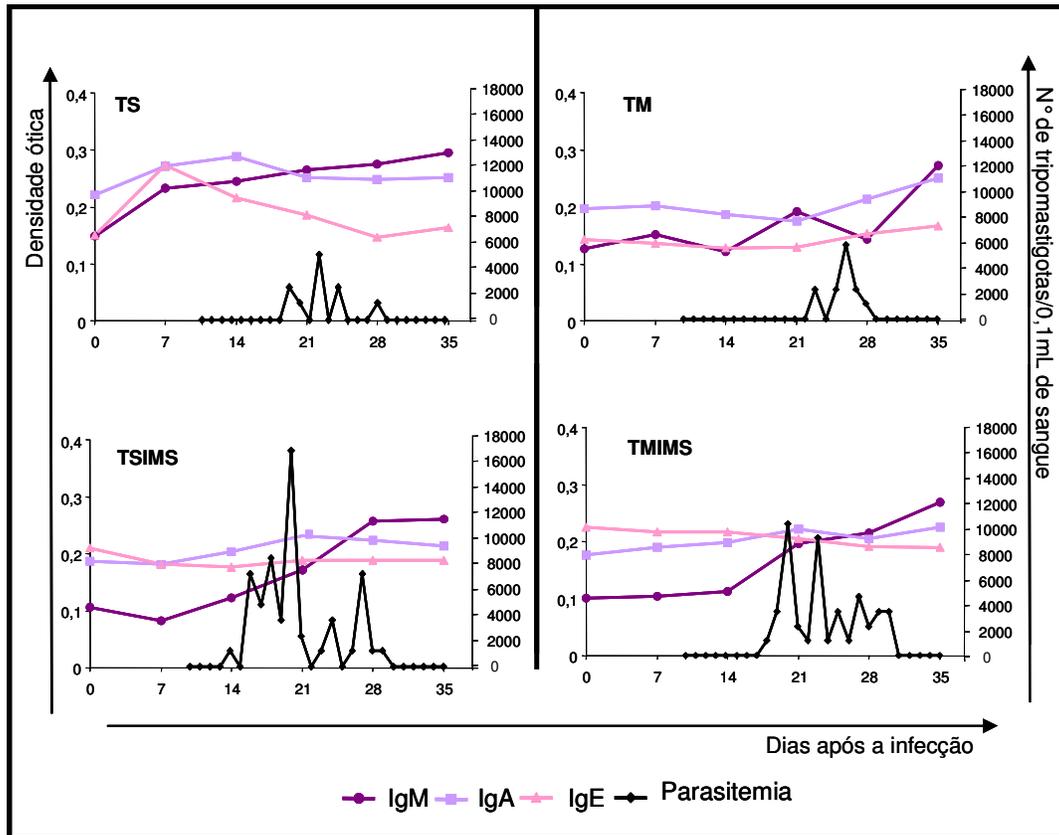


Figura 5: Perfil de imunoglobulinas da classe IgM, IgA e IgE em relação a parasitemia média nos grupos imunocompetentes (TS, TM) e imunossuprimidos (TSIMS, TMIMS) inoculados pela via intraperitoneal com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas (TS, TSIMS) ou metacíclicas (TM, TMIMS) da cepa Be-78 do *T. cruzi* por Kg de peso corporal. Limiar de reatividade: IgM: 0,220; IgA: 0,300; IgE: 0,200.

5.5 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos T (Thy-1⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A análise de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica das imunoglobulinas (IgG, IgG1 e IgG2) e o percentual de linfócitos T (Thy-1⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 6).

Nos animais imunocompetentes foi observado um aumento no percentual de linfócitos T (Thy-1⁺) a partir do sétimo DAI, sendo que no grupo TM este aumento foi oscilante e em TS há diminuição destas células no sangue periférico no 35º dia. Em relação ao perfil de IgG, IgG1 e IgG2, foi verificado um aumento nos níveis de IgG no grupo TS e IgG e IgG2 em TM, durante o intervalo avaliado. Entretanto, não foi encontrada correlação entre linfócitos T (Thy-1⁺) e estas imunoglobulinas. No grupo TS foi observada uma diminuição nos níveis de IgG1 e aumento de linfócitos T (Thy-1⁺), no entanto, não foi detectada correlação negativa entre esta subclasse e este fenótipo celular neste grupo.

Ao analisar os cães imunossuprimidos foi verificada uma redução no número de linfócitos T (Thy-1⁺) no sétimo DAI sendo que no 14º dia observou-se aumento no percentual desta população que se manteve ascendente em TSIMS e praticamente constante em TMIMS. No grupo TSIMS, os níveis de IgG e IgG2 diminuíram inicialmente (entre o 7º e 21º dia de infecção) e em seguida houve um leve aumento até o 35º dia. Em TMIMS os níveis de IgG também comportaram-se de maneira semelhante, no entanto, IgG2 manteve-se praticamente constante. A análise de correlação revelou correlação positiva de linfócitos T (Thy-1⁺) e IgG tanto em TSIMS ($r = 0,4790$; $p = 0,0179$) quanto em TMIMS ($r = 0,6080$; $p = 0,0016$). Correlação inversa entre linfócitos T (Thy-1⁺) e IgG1 foi encontrada no grupo TSIMS ($r = -0,4428$; $p = 0,0298$), visto que um aumento no percentual de células é acompanhado pela diminuição desta imunoglobulina. Não se observou correlação entre IgG2 e linfócitos T (Thy-1⁺) em nenhum dos grupos avaliados (Figura 6).

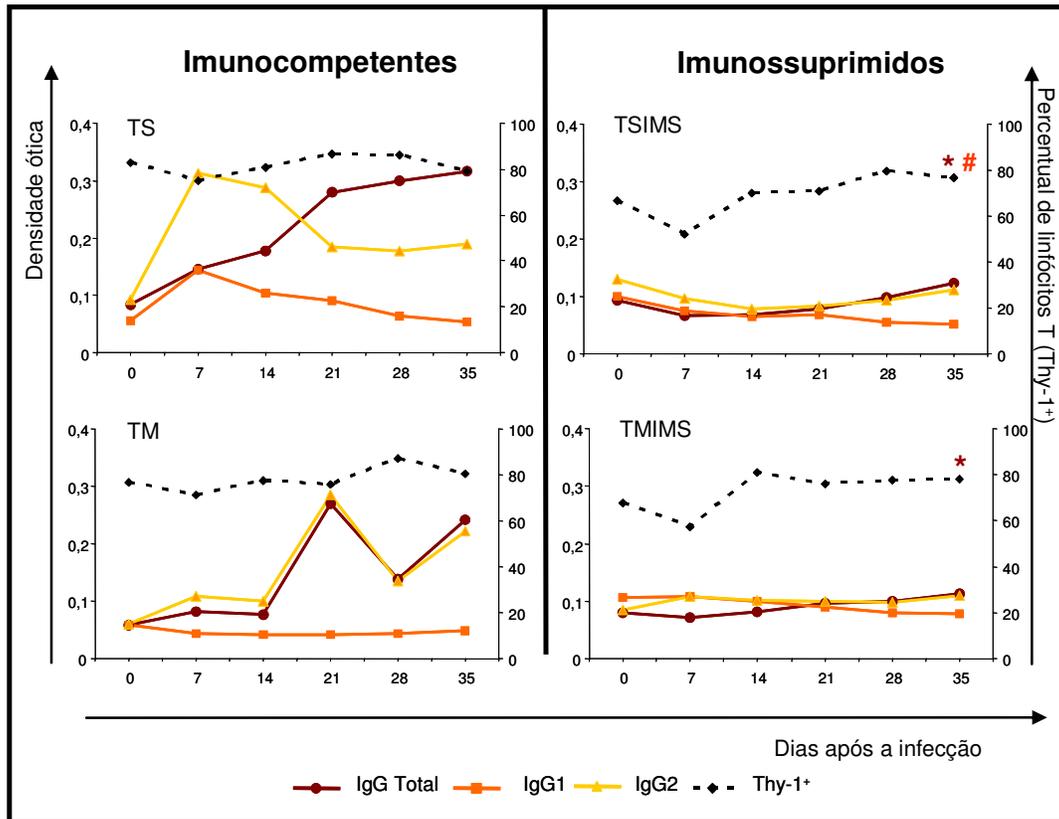


Figura 6: Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual circulante de células T (Thy-1⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. (#) representa as correlações negativas encontradas. A cor dos símbolos (*, #) corresponde à imunoglobulina onde houve correlação.

5.6 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos T (Thy-1⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A análise de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica das imunoglobulinas (IgM, IgA e IgE) e o percentual de linfócitos T (Thy-1⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 7).

Nos animais imunocompetentes foi observada correlação negativa ($r = -0,4642$; $p = 0,0256$) entre IgA e os linfócitos T (Thy-1⁺) no grupo TS. Notou-se que a diminuição no percentual de linfócitos T (Thy-1⁺) foi acompanhada de um aumento nos níveis da imunoglobulina de IgA neste grupo, e o contrário foi observado quando houve diminuição dos níveis de IgA. Apesar de um comportamento semelhante em IgE no grupo TS, não foi observada correlação entre esta imunoglobulina e o percentual linfócitos T (Thy-1⁺). No grupo TM não foi encontrada correlação entre os perfis de imunoglobulinas e o percentual de linfócitos T (Thy-1⁺).

Nos grupos imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS) foi observada correlação positiva significativa entre linfócitos T (Thy-1⁺) e IgM em ambos os grupos (TSIMS, $r = 0,6839$; $p = 0,0002$; TMIMS, $r = 0,4185$; $p = 0,0418$). Correlação positiva foi também observada ($r = 0,5256$; $p = 0,0079$) entre os níveis de IgA e linfócitos T (Thy-1⁺) no grupo TSIMS. Não foram observadas diferenças significativas na análise de correlação entre IgE e linfócitos T (Thy-1⁺) em nenhum dos grupos avaliados (Figura 7).

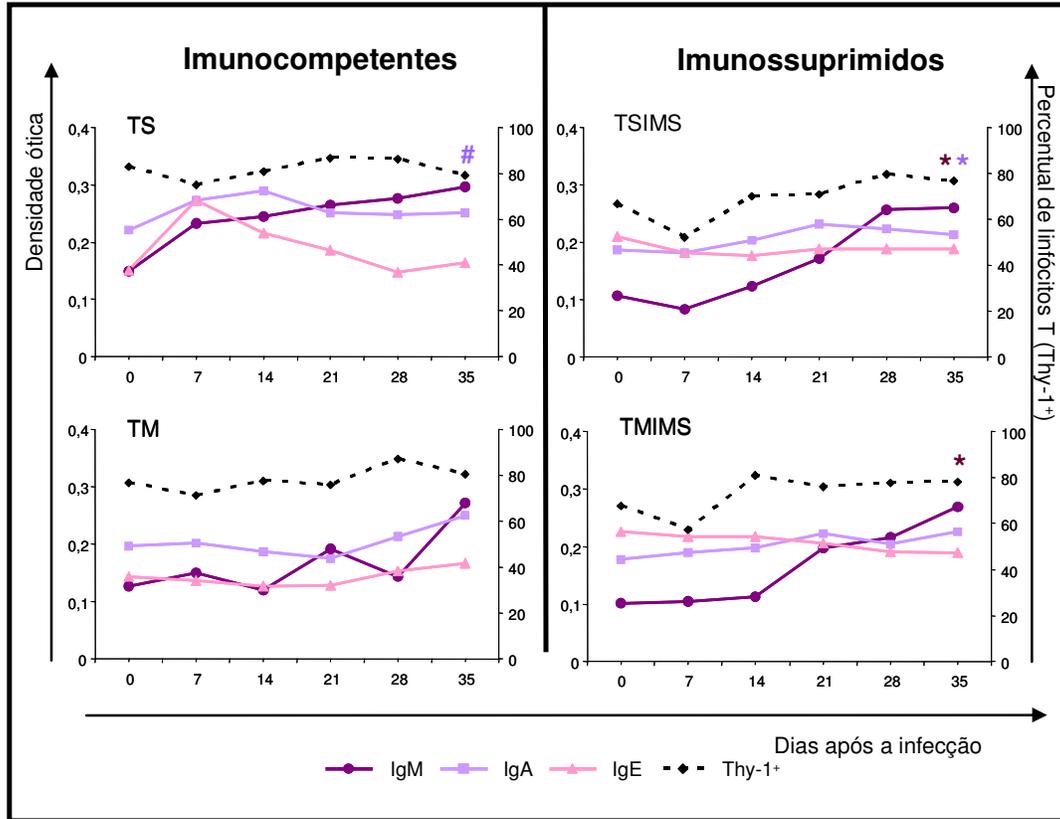


Figura 7: Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual circulante de células T (Thy-1⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. (#) representa as correlações negativas encontradas. A cor dos símbolos (*, #) corresponde à imunoglobulina onde houve correlação.

5.7 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos T (CD4⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A análise de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidos na cinética de produção da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual de linfócitos T (CD4⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 8).

Entre os grupos de cães imunocompetentes foi verificada correlação negativa ($r = -0,569$; $p = 0,0045$) apenas entre percentual de linfócitos T (CD4⁺) e níveis de IgG no grupo TS. Neste grupo, também foi observada diminuição aparente nos níveis de IgG2 acompanhada de diminuição no percentual de linfócitos T (CD4⁺), no entanto, não houve correlação entre os níveis desta imunoglobulina e linfócitos T (CD4⁺). No grupo TM não foi encontrada nenhuma correlação entre linfócitos T (CD4⁺) e IgG, IgG1 e IgG2.

A análise dos animais imunossuprimidos demonstrou correlação negativa significativa ($r = -0,4054$; $p = 0,0494$) entre linfócitos T (CD4⁺) e IgG2 no grupo TSIMS. Apesar de IgG total apresentar um perfil semelhante a IgG2 neste grupo, não foi observada correlação significativa ($p < 0,05$). Já no grupo TMIMS, foi encontrada correlação ($r = 0,6183$; $p = 0,0013$) entre o fenótipo (CD4⁺) e IgG. Em nenhum dos grupos foi verificada correlação entre IgG1 e o percentual de linfócitos T (CD4⁺) (Figura 8).

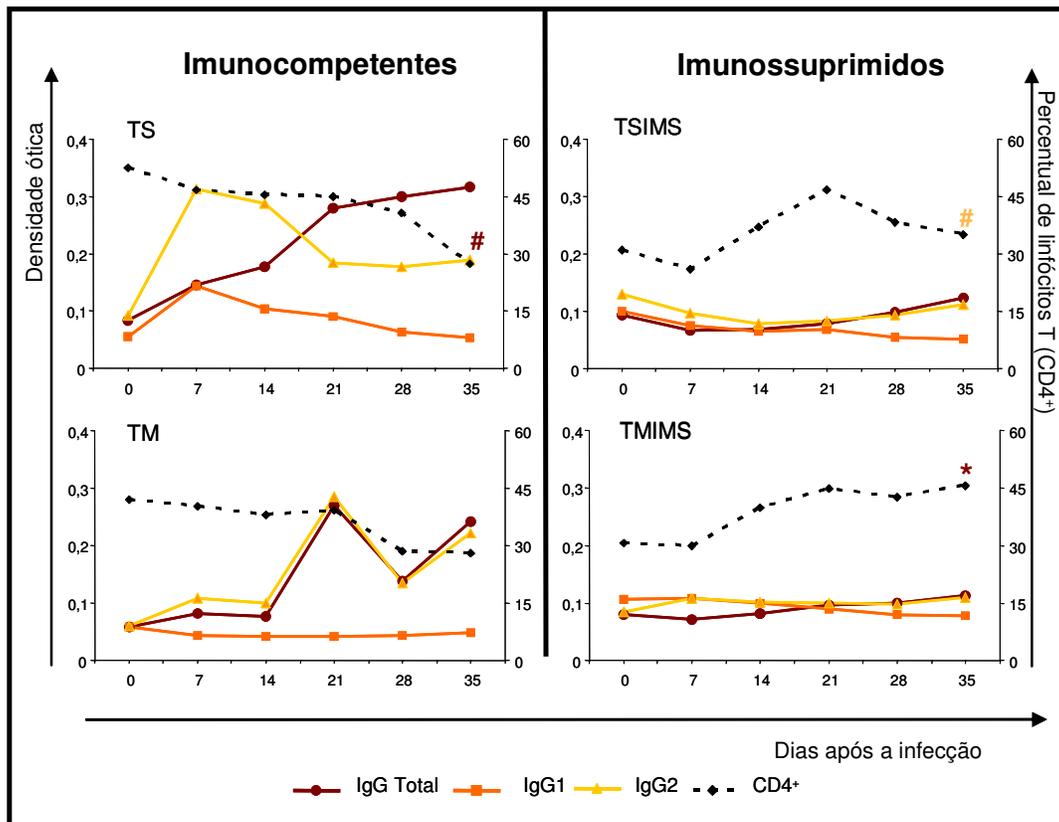


Figura 8: Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual circulante de células T (CD4⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. (#) representa as correlações inversas encontradas. A cor dos símbolos (*, #) corresponde à imunoglobulina onde houve correlação.

5.8 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos T (CD4⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A análise de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidas na cinética de produção de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE versus o percentual de linfócitos T (CD4⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 9).

No grupo TS, a imunoglobulina da classe IgE mostrou um comportamento descendente acompanhado por decréscimo do percentual de linfócitos T CD4⁺, não sendo entretanto, encontrada correlação. Já IgM apresentou correlação negativa ($r = -0,5527$; $p = 0,0062$) neste grupo, demonstrando que uma diminuição de linfócitos T CD4⁺ pode ser acompanhada por aumento de IgM durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. O grupo TM não apresentou correlação com as imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE, durante a fase aguda da infecção.

Nos animais imunossuprimidos foi verificada correlação positiva (TSIMS, $r = 0,4697$; $p = 0,0206$; TMIMS, $r = 0,6843$ $p = 0,0002$) entre o percentual de linfócitos T CD4⁺ e os níveis de IgA em ambos os grupos. Já o grupo TMIMS também apresentou correlação positiva ($r = 0,7286$; $p = 0,0001$) com os níveis de IgM e o percentual de linfócitos T CD4⁺. Em nenhum dos grupos foi encontrada correlação entre os níveis de IgE e o percentual de linfócitos T CD4⁺ (Figura 9).

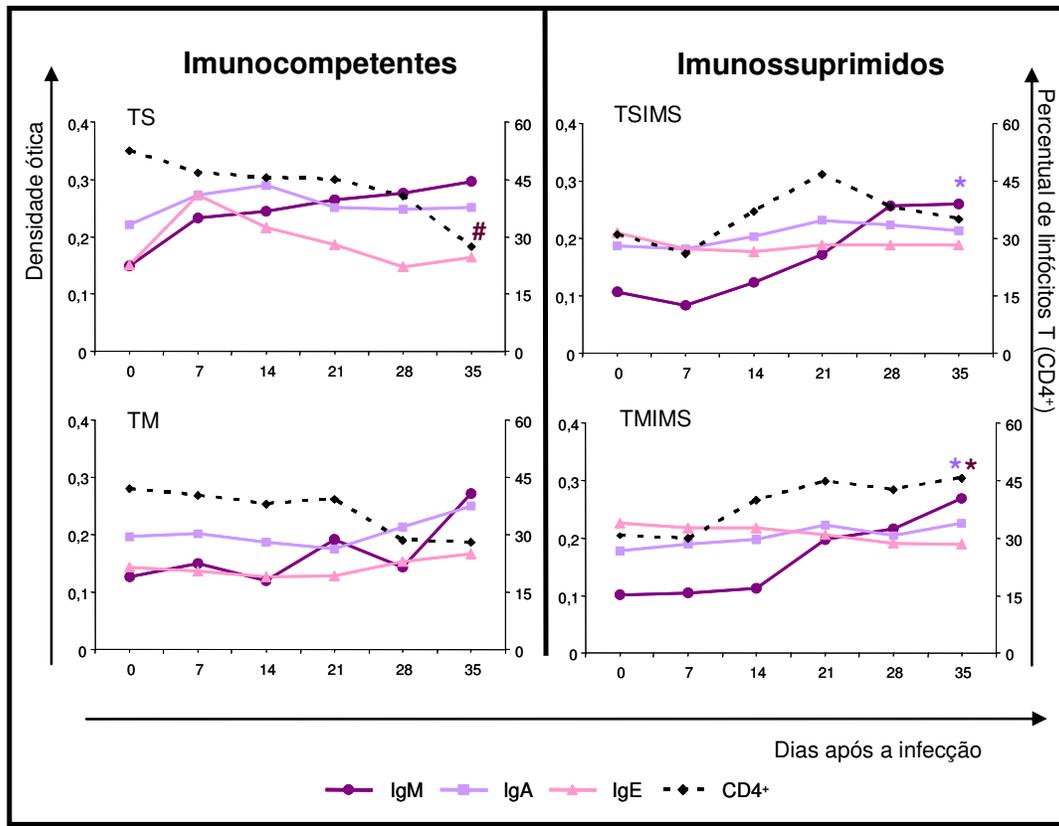


Figura 9: Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual circulante de células T ($CD4^+$) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. (#) representa as correlações inversas encontradas. A cor dos símbolos (*, #) corresponde à imunoglobulina que houve correlação.

5.9 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos T (CD8⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A análise de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidas na cinética de produção da classe IgG e subclasse IgG1 e IgG2 em relação ao percentual de linfócitos T (CD8⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 10).

Os cães infectados com formas TS apresentaram correlação entre percentual de linfócitos T (CD8⁺) circulantes no sangue periférico e níveis de IgG nos grupos imunocompetentes (TS, $r = 0,7137$; $p = 0,0001$) e imunossuprimidos (TSIMS, $r = 0,4425$; $p = 0,0304$). Nenhuma correlação entre as subclasses IgG1 e IgG2 e percentual de linfócitos T (CD8⁺) foi observada nestes grupos.

Nos animais infectados com formas TM, apenas o grupo imunocompetente apresentou correlação ($r = 0,4158$; $p = 0,0433$) entre os níveis de IgG e o percentual de linfócitos T (CD8⁺). Não foi observada correlação entre os níveis das subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2 e o percentual de linfócitos T (CD8⁺) nos grupos TM e TMIMS, apesar de o perfil de IgG2 no grupo TM ser muito semelhante ao encontrado com a classe IgG neste grupo.

Nenhuma correlação foi encontrada entre os níveis de imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual de linfócitos T (CD8⁺) circulantes no sangue periférico dos animais avaliados (Figura 10).

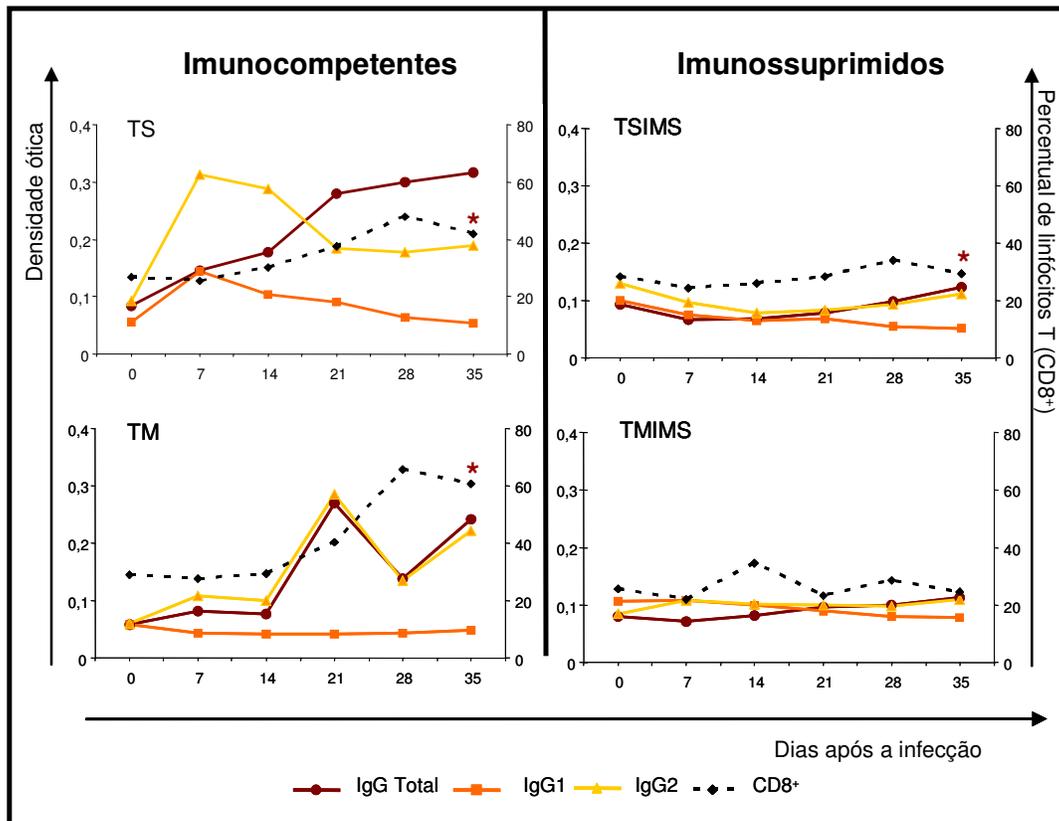


Figura 10: Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual circulante de células T (CD8⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. A cor do símbolo corresponde à imunoglobulina que houve correlação.

5.10 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos T (CD8⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A avaliação de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidos na cinética de produção das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual de linfócitos T (CD8⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 11).

Nos animais infectados com formas TS foi observada correlação entre os níveis de IgM e o percentual de linfócitos T (CD8⁺) nos cães imunocompetentes ($r = 0,5292$; $p = 0,0094$) e imunossuprimidos ($r = 0,5267$; $p = 0,0082$). Animais do grupo TS apresentaram um aumento no número de linfócitos T CD8⁺ em relação ao TSIMS e este aumento foi acompanhado por elevação nos níveis de IgM. Nenhuma correlação foi observada entre IgA e IgE com o fenótipo CD8⁺.

Entre os cães infectados com formas TM, apenas o grupo TM apresentou correlação ($r = 0,4627$; $p = 0,0228$) entre os níveis de IgA e o percentual de linfócitos T (CD8⁺). Já nas outras classes de imunoglobulinas (IgM e IgE) não foi encontrada correlação. O grupo TMIMS não apresentou correlação significativa com nenhuma das imunoglobulinas (IgM, IgA e IgE).

Não foi observada correlação entre linfócitos T CD8⁺ e a classe de imunoglobulina IgE em nenhum dos grupos avaliados durante a fase aguda da infecção (Figura 11).

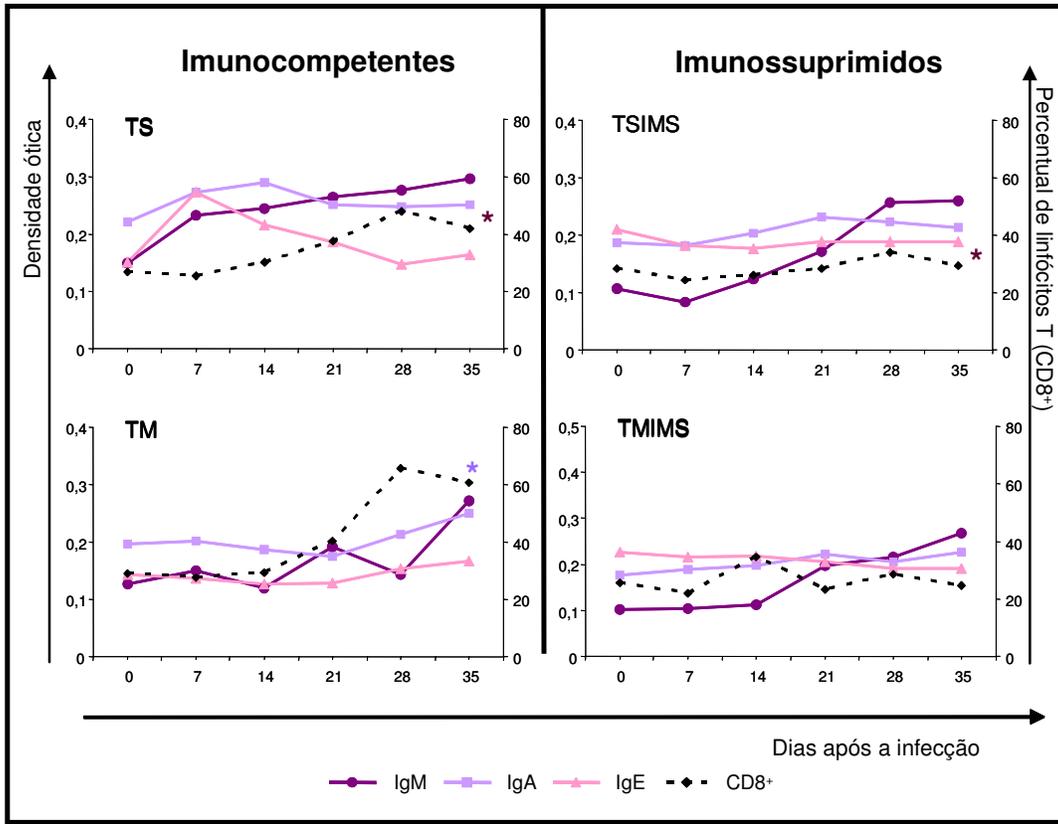


Figura 11: Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual circulante de células T (CD8⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. A cor do símbolo corresponde à imunoglobulina que houve correlação.

5.11 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e linfócitos B (CD21⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A avaliação de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidos na cinética de produção das imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual de linfócitos B (CD21⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 12).

Cães imunocompetentes infectados com formas TS apresentaram durante a fase aguda da infecção um perfil de imunoglobulinas das subclasses IgG1 e IgG2 semelhantes ao perfil do percentual de linfócitos B (CD21⁺) não tendo sido, entretanto, observada correlação entre esses parâmetros. Já no grupo TM foi observada correlação ($r = 0,4405$; $p = 0,0312$) entre os níveis de IgG1 e o percentual de linfócitos B (CD21⁺) circulantes.

A análise de correlação nos grupos de animais imunossuprimidos demonstrou que estes apresentavam correlação negativa (TSIMS, $r = -0,5011$; $p = 0,0120$), (TMIMS, $r = -0,6905$; $p = 0,0002$) entre os níveis de IgG e o percentual de linfócitos B (CD21⁺) independente da forma infectante utilizada no inoculo. Nenhuma correlação foi observada entre linfócitos B (CD21⁺) e IgG2 durante a fase aguda da DC, independente da forma de inoculo ou do estado imunológico dos animais avaliados (Figura 12).

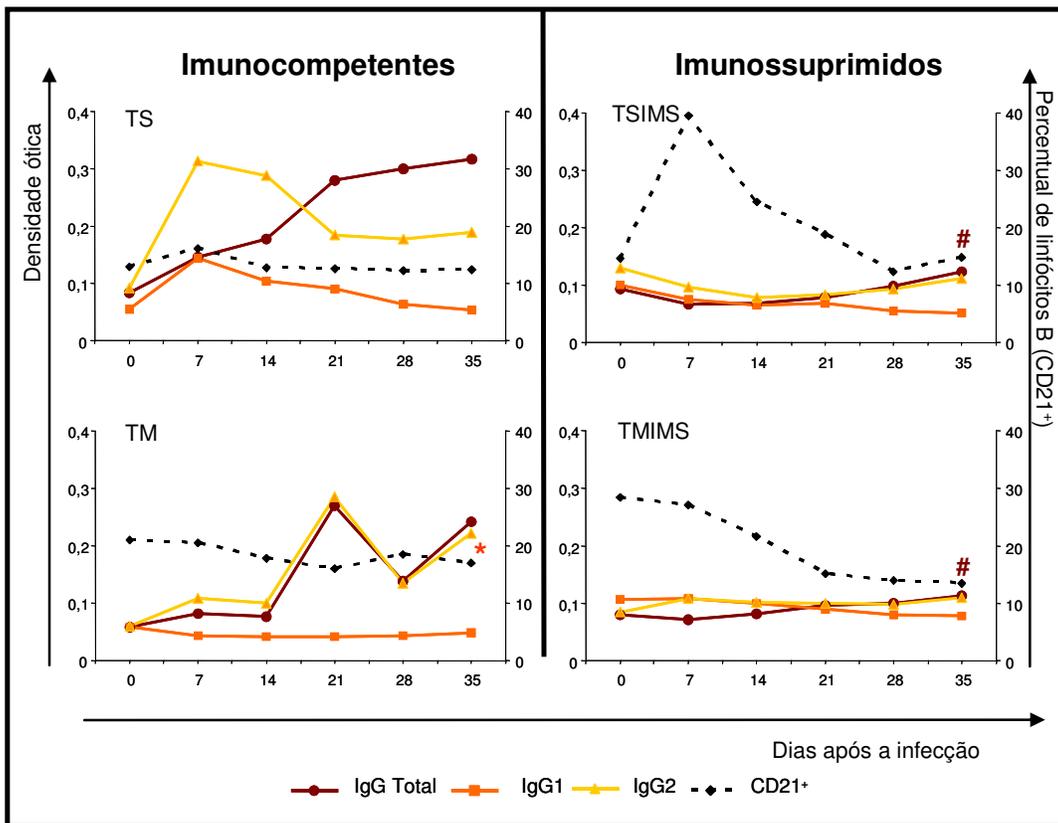


Figura 12: Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual circulante de células B (CD21⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. (#) representa as correlações inversas encontradas. A cor dos símbolos (*, #) corresponde à imunoglobulina que houve correlação.

5.12 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e linfócitos B (CD21⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A avaliação de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidas na cinética de produção das imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual de linfócitos B (CD21⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 13).

Não foi observada correlação significativa nos grupos imunocompetentes, entre as imunoglobulinas IgM, IgA e IgE relação ao percentual de linfócito B (CD21⁺). Já nos animais imunossuprimidos, nos grupos TSIMS e TMIMS foi verificada correlação negativa entre percentual de linfócitos B (CD21⁺) com os níveis de IgM ($r = -0,5755$; $p = 0,0033$; $r = -0,6336$; $p = 0,0009$) e IgA ($r = -0,4371$; $p = 0,0327$; $r = -0,4415$; $p = 0,0308$), respectivamente. Nenhuma correlação foi observada entre linfócitos B (CD21⁺) circulantes e IgE durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*, independente do grupo avaliado (Figura 13).

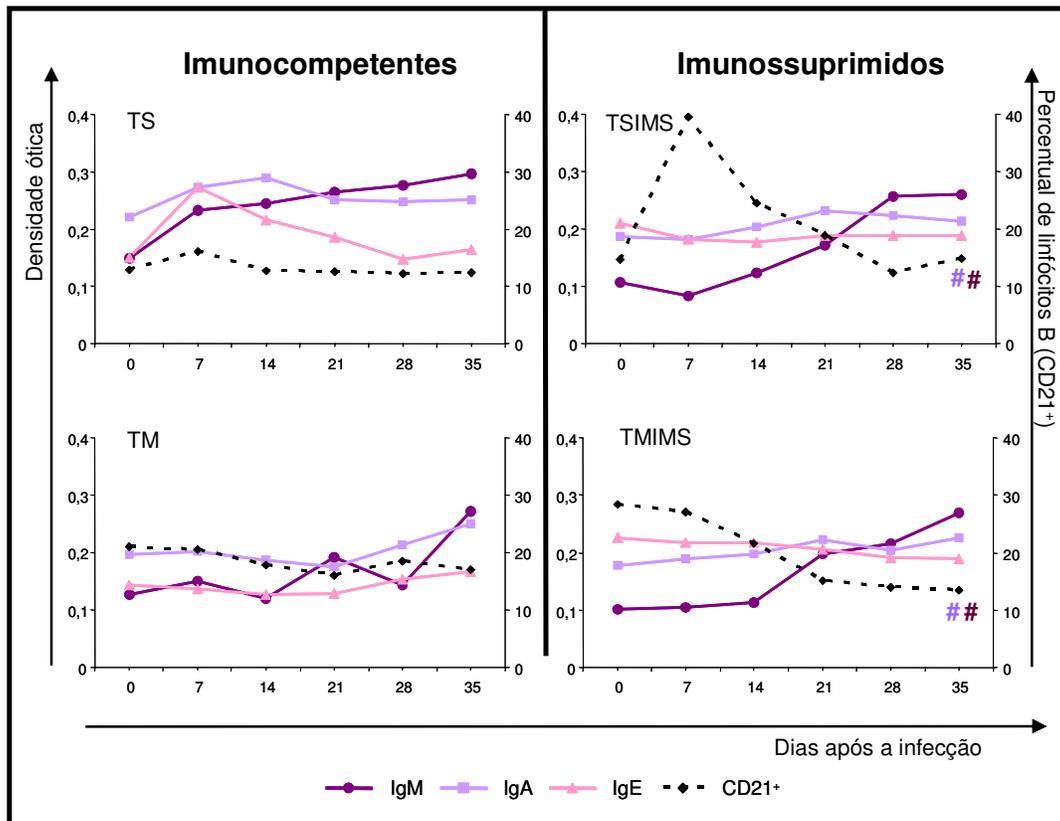


Figura 13: Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual circulante de células B (CD21⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (#) representa as correlações inversas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. A cor do símbolo corresponde à imunoglobulina que houve correlação.

5.13 - Correlações entre as cinéticas dos perfis da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 de imunoglobulinas e monócitos (CD14⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A avaliação de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidos na cinética de produção das imunoglobulinas da classe IgG e das subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual de linfócitos B (CD14⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 14).

Em relação aos cães imunocompetentes foi observada correlação positiva ($r = 0,4720$; $p = 0,00199$) apenas no grupo TM entre os níveis de IgG1 e o percentual de monócitos (CD14⁺). Além disso, foi detectada correlação negativa ($r = -0,4562$; $p = 0,0250$) entre os níveis de IgG total e o percentual de monócitos (CD14⁺) neste grupo. Nenhuma correlação foi encontrada entre o percentual de monócitos (CD14⁺) e as imunoglobulinas IgG, IgG1 e IgG2 no grupo TS.

Nos animais imunossuprimidos apenas o grupo TSIMS apresentou correlação significativa, sendo esta positiva para IgG1 ($r = 0,4469$; $p = 0,0286$) e inversa para os níveis de IgG total ($r = -0,5106$; $p = 0,0108$) em relação ao percentual de monócitos (CD14⁺). Nenhuma correlação significativa foi encontrada entre monócitos (CD14⁺) circulantes e os níveis de IgG2 nos grupos de animais estudados.

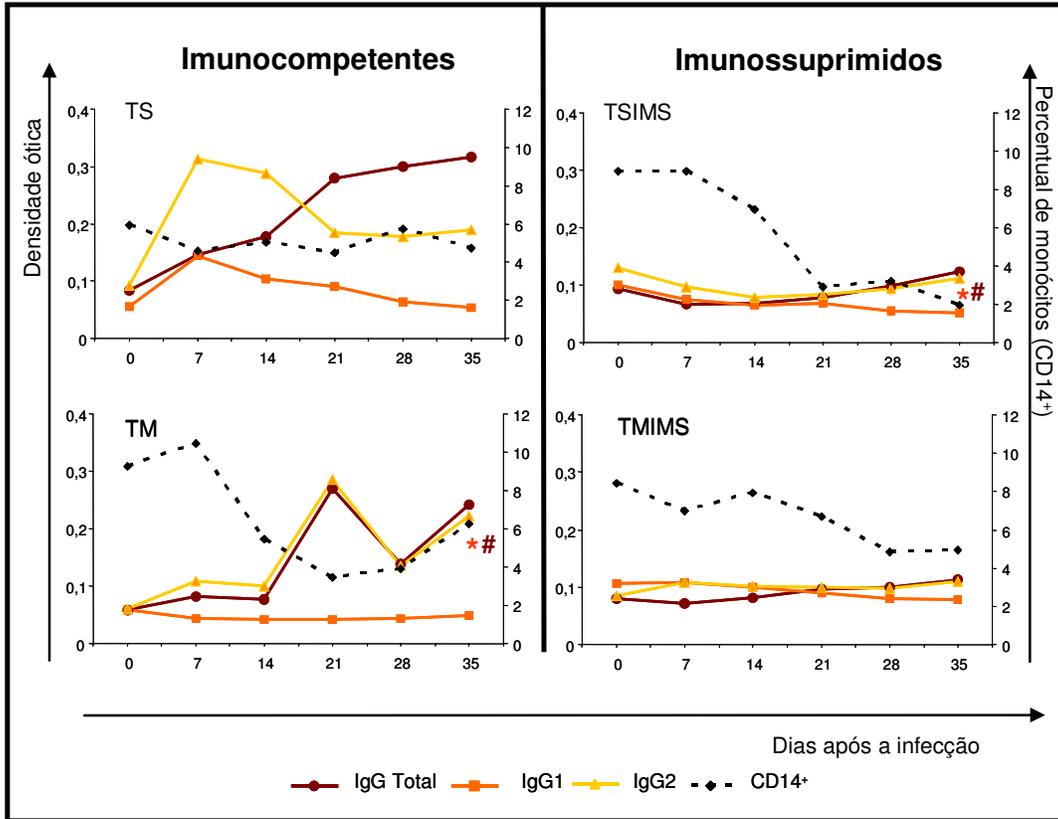


Figura 14: Perfil de imunoglobulinas da classe IgG e subclasses IgG1 e IgG2 em relação ao percentual circulante de monócitos (CD14⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (*) representam as correlações positivas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. (#) representa as correlações inversas encontradas. A cor dos símbolos (*, #) corresponde à imunoglobulina que houve correlação.

5.14 - Correlações entre as cinéticas dos perfis das classes IgM, IgA e IgE de imunoglobulinas e monócitos (CD14⁺) em cães imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

A avaliação de correlação foi realizada utilizando os valores de densidade ótica obtidos na cinética de produção das imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual de linfócitos B (CD14⁺) no mesmo grupo ao longo da cinética (Figura 15).

Nenhuma correlação entre o perfil de imunoglobulinas IgM, IgA e IgE e o percentual de monócitos (CD14⁺) circulantes na fase aguda da DC foi observada nos grupos TS e TM. Entretanto, foram observadas correlações negativas entre monócitos (CD14⁺) e os níveis de IgM nos animais imunossuprimidos dos grupos TSIMS e TMIMS ($r = -0,7646$; $p < 0,0001$), ($r = -0,5080$; $p = 0,0113$), respectivamente. Além disso, o grupo TSIMS também apresentou correlação negativa ($r = -0,6884$; $p = 0,0002$) com os níveis de imunoglobulina IgA e percentual de monócitos (CD14⁺) circulantes. Em nenhum dos grupos aqui estudados foi encontrada correlação entre os níveis de IgE e o percentual de monócitos (CD14⁺) durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

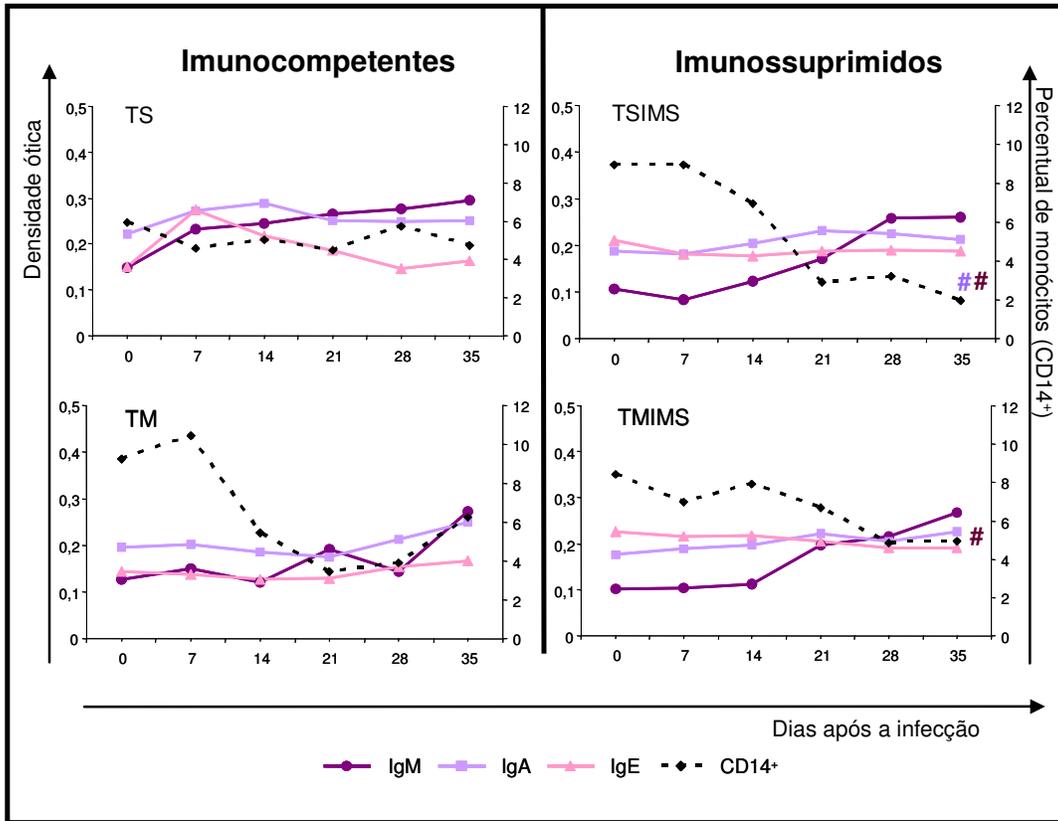


Figura 15: Perfil de imunoglobulinas das classes IgM, IgA e IgE em relação ao percentual circulante de monócitos (CD14⁺) nos grupos imunocompetentes (TS e TM) e imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS). (#) representa as correlações inversas significativas encontradas entre a imunoglobulina e o fenótipo celular representado. A cor do símbolo corresponde à imunoglobulina que houve correlação.

Na Tabela 2, encontra-se a síntese da análise de correlações entre as classes IgG, IgM, IgA e IgE e as subclasses IgG1 e IgG2, fenótipos de linfócitos T (Thy-1⁺), subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), linfócitos B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺). Os valores de r e p , estão sumarizados em função das correlações observadas.

Igs	Grupos	Thy-1 ⁺	CD4 ⁺	CD8 ⁺	CD21 ⁺	CD14 ⁺
IgG	TS	----	<i>r</i> = -0,5697 <i>p</i> = 0,0045	<i>r</i> = 0,7137 <i>p</i> = 0,0001	----	----
	TSIMS	<i>r</i> = 0,4790 <i>p</i> = 0,0179	----	<i>r</i> = 0,4425 <i>p</i> = 0,0304	<i>r</i> = -0,5011 <i>p</i> = 0,0120	<i>r</i> = -0,5106 <i>p</i> = 0,0108
	TM	----	----	<i>r</i> = 0,4158 <i>p</i> = 0,0433	----	<i>r</i> = -0,4562 <i>p</i> = 0,0250
	TMIMS	<i>r</i> = 0,6080 <i>p</i> = 0,0016	<i>r</i> = 0,6183 <i>p</i> = 0,0013	----	<i>r</i> = -0,6905 <i>p</i> = 0,0002	----
IgG1	TS	----	----	----	----	----
	TSIMS	<i>r</i> = -0,4428 <i>p</i> = 0,0298	----	----	----	<i>r</i> = 0,4469 <i>p</i> = 0,0286
	TM	----	----	----	<i>r</i> = 0,4405 <i>p</i> = 0,0312	<i>r</i> = 0,4720 <i>p</i> = 0,00199
	TMIMS	----	----	----	----	----
IgG2	TS	<i>r</i> = -0,4813 <i>p</i> = 0,0201	----	----	----	----
	TSIMS	----	<i>r</i> = -0,4054 <i>p</i> = 0,0494	----	----	----
	TM	----	----	----	----	----
	TMIMS	----	----	----	----	----
IgM	TS	----	<i>r</i> = -0,5527 <i>p</i> = 0,0062	<i>r</i> = 0,5292 <i>p</i> = 0,0094	----	----
	TSIMS	<i>r</i> = 0,6839 <i>p</i> = 0,0002	----	<i>r</i> = 0,5267 <i>p</i> = 0,0082	<i>r</i> = -0,5755 <i>p</i> = 0,0033	<i>r</i> = -0,7646 <i>p</i> < 0,0001
	TM	----	----	----	----	----
	TSIMS	<i>r</i> = 0,4185 <i>p</i> = 0,0418	<i>r</i> = 0,7286 <i>p</i> = 0,0001	----	<i>r</i> = -0,6336 <i>p</i> = 0,0009	<i>r</i> = -0,5080 <i>p</i> = 0,0113
IgA	TS	<i>r</i> = -0,4642 <i>p</i> = 0,0256	----	----	----	----
	TSIMS	<i>r</i> = 0,5256 <i>p</i> = 0,0079	<i>r</i> = 0,4697 <i>p</i> = 0,0206	----	<i>r</i> = -0,4371 <i>p</i> = 0,0327	<i>r</i> = -0,6884 <i>p</i> = 0,0002
	TM	----	----	<i>r</i> = 0,4627 <i>p</i> = 0,0228	----	----
	TMIMS	----	<i>r</i> = 0,6843 <i>p</i> = 0,0002	----	<i>r</i> = -0,4415 <i>p</i> = 0,0308	----

Tabela 2: Valores de *r* (Pearson) e *p*, encontrados na análise de correlação entre as imunoglobulinas IgG, IgG1, IgG2, IgM e IgA e os fenótipos Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD21⁺ e CD14⁺, nos grupos imunocompetentes (TS, TM) e imunossuprimidos (TSIMS, TMIMS). A linha tracejada representa a falta de correlação significativa (*p*<0,05). Em azul, para facilitar a visualização, estão representadas as correlações negativas encontradas.

5.15 – Síntese das cinéticas dos perfis de imunoglobulinas versus fenótipos celulares em animais imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção.

No quadro 1 encontra-se sumariado as correlações observadas entre todas as classes e subclasses de imunoglobulinas e os fenótipos celulares em cães imunossuprimidos e imunocompetentes. O presente quadro, foi estabelecido com base nos dados das cinéticas de imunoglobulinas apresentados anteriormente e após análise de regressão linear.

Animais imunocompetentes infectados com tripomastigota sanguíneas apresentam um perfil conjunto de correlações positivas entre linfócitos T (CD8⁺) versus IgG e IgM e correlações negativas entre linfócitos T (Thy-1⁺) versus IgG2 e IgA e linfócitos T (CD4⁺) versus IgG e IgM.

Animais imunocompetentes infectados com tripomastigota metacíclicas apresentam um perfil conjunto de correlações positivas entre linfócitos T (CD8⁺) versus IgG e IgA, linfócitos B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) versus IgG1 e correlação negativa entre monócitos (CD14⁺) versus IgG.

Animais infectados com tripomastigota sanguíneas e imunossuprimidos apresentam um perfil conjunto de correlações positivas entre linfócitos T (Thy-1⁺) versus IgG, IgM e IgA, linfócitos T (CD4⁺) versus IgA, linfócitos T (CD8⁺) versus IgG e IgM, monócitos (CD14⁺) versus IgG1 e correlações negativas entre linfócitos T (Thy-1⁺) versus IgG1, linfócitos T (CD4⁺) versus IgG2, linfócitos B (CD21⁺) e monócitos (CD14⁺) versus IgG, IgM e IgA.

Animais infectados com tripomastigota metacíclicas e imunossuprimidos apresentam um perfil conjunto de correlações positivas entre linfócitos T (Thy-1⁺) versus IgG, IgM, linfócitos T (CD4⁺) versus IgG, IgM e IgA e correlações negativas entre linfócitos B (CD21⁺) versus IgG, IgM e IgA, monócitos (CD14⁺) versus IgM.

Ao avaliar o percentual de células B (CD21⁺) percebe-se nos animais imunocompetentes um aumento nos níveis de IgG, IgM e IgA quando ocorre redução no percentual das células B (CD21⁺).

Grupos infectados com formas tripomastigotas sanguíneas							Grupos infectados com formas tripomastigotas metacíclicas					
	IG	THY-1+	CD4+	CD8+	CD21+	CD14+	IG	THY-1+	CD4+	CD8+	CD21+	CD14+
I M U N O C O M P E T E N T E S	IgG ↑		-	+			IgG ↑			+		-
	IgG1 ↓						IgG1 ≈				+	+
	IgG2 ≈	-					IgG2 ↑					
	IgM ↑		-	+			IgM ↑					
	IgA ≈	-					IgA ↑			+		
	IgE ↓						IgE ↑					
	IG	THY-1+	CD4+	CD8+	CD21+	CD14+	IG	THY-1+	CD4+	CD8+	CD21+	CD14+
I M U N O S U P R I M I D O S	IgG ↑	+		+	-	-	IgG ↑	+	+		-	
	IgG1 ↓	-				+	IgG1 ↓					
	IgG2 ≈		-				IgG2 ≈					
	IgM ↑	+		+	-	-	IgM ↑	+	+		-	-
	IgA ↑	+	+		-	-	IgA ↑		+		-	
	IgE ↓						IgE ↓					

Figura 16: Correlações das cinéticas dos perfis de imunoglobulinas versus fenótipos celulares em animais imunocompetentes e imunossuprimidos durante a fase aguda da infecção. (+) correlações positivas (-) correlações negativas (↑) aumento dos níveis de imunoglobulina, (↓) diminuição dos níveis de imunoglobulina (≈) manutenção dos níveis de imunoglobulina.

6 – DISCUSSÃO

Em 1984, a OMS preconizou os requisitos fundamentais para o estabelecimento de modelos experimentais para estudos da DC. No Brasil, além de alguns trabalhos isolados (MACHADO *et al.*, 2001), dois grupos investiram fortemente no modelo canino visando suprir algumas das necessidades básicas na compreensão da história natural da doença neste modelo (ANDRADE & ANDRADE, 1980; ANDRADE *et al.*, 1984; LANA *et al.*, 1988; LANA *et al.*, 1991).

Com a possibilidade da reprodução das três formas clínicas da DC humana apresentada por este modelo (formas aguda sintomática, indeterminada e cardíaca crônica fibrosante descompensada), o mesmo passou a ser amplamente utilizado nos estudos desta doença (ANDRADE *et al.*, 1984; LANA *et al.*, 1988; LANA *et al.*, 1992; GUEDES, 2001; BAHIA *et al.*, 2002; CARNEIRO, 2002; CARNEIRO *et al.*, 2007).

Neste contexto, Lana *et al.* (1991) ao estudar a história natural da infecção experimental em cães, sob a ótica do comportamento sorológico de IgM e IgG, observou através da RIFI que a positividade destas imunoglobulinas ocorre a partir da terceira semana de infecção e até a quarta semana os níveis de IgM apresentaram-se mais elevados que os de IgG e a partir da quinta semana este fato se inverte. Já através da técnica de ELISA, IgM apresentou reatividade a partir da primeira semana de infecção, enquanto em IgG a partir da terceira semana. Os níveis de IgG foram mais elevados que os de IgM a partir da quinta semana de infecção permanecendo até o 30^o mês.

Mais recentemente, estudos que avaliaram classes e subclasses de imunoglobulinas foram realizados em outras doenças no modelo canino, principalmente na leishmaniose visceral canina (LVC) (BOURDOISEAU *et al.*, 1997, REIS *et al.*, 2006), promovendo assim um maior entendimento do papel das imunoglobulinas em doenças infecciosas neste modelo. No presente estudo foram utilizados cães jovens (4 meses), uma vez que animais nesta faixa etária reproduzem com maior fidelidade os aspectos encontrados na forma aguda da DC, conforme descrito por Andrade e Andrade (1980). Outra importante abordagem avaliada nesse estudo, foi o aspecto da imunossupressão nestes animais, visando a melhor compreensão do comportamento de classes e subclasses de imunoglobulinas (IgG, IgG1, IgG2, IgM, IgA e IgE) em animais imunossuprimidos portadores de DC. Foram então utilizados 24 cães infectados pela via intraperitoneal com 2000 formas tripomastigotas metacíclicas (grupos TM e TMIMS) ou sanguíneas (grupos TS e TSIMS). A utilização de diferentes formas infectantes pode

implicar em respostas imunes diferenciadas, além disso, algumas peculiaridades sobre as distintas vias de transmissão do parasito estariam sendo consideradas ao utilizarmos estas duas formas do parasito. A infecção com formas TS reproduziria em parte, o que acontece na transmissão transfusional ou por acidente de laboratório e com TM, o que ocorre em casos de transmissão vetorial. Bahia *et al.*, (2002) demonstraram que o inoculo pela via intraperitoneal empregando 2000 formas TS ou TM por Kg/peso garante 100% de infectividade, sendo esse grau menor na rota intra-ocular. A infectividade encontrada no presente trabalho foi de 100%, tanto nos animais imunocompetentes quanto nos imunossuprimidos. Já a mortalidade foi de 0% nos imunocompetentes e de 50% no grupo imunossuprimido infectado com formas TM (CARNEIRO, 2002).

Diferenças estruturais encontradas na glicofosfatidilinositol GPI mucina de TS e TM podem influenciar na interação com as células do hospedeiro vertebrado e conseqüentemente no desenvolvimento da resposta imune e no processo inflamatório durante os estágios iniciais da infecção aguda (BRENER & GAZINELLI, 1997). Provavelmente, as diferenças no perfil da resposta humoral nos grupos infectados com TM ou TS deveram-se à forma infectante do parasito utilizada. Por outro lado, nos animais imunossuprimidos infectados com TM ou TS poucas alterações foram observadas no perfil das imunoglobulinas, possivelmente devido a grande deficiência na síntese de anticorpos nesses animais o que, neste caso, independe da forma infectante utilizada.

Um dos grandes desafios encontrados atualmente tem sido a escolha da preparação antigênica ideal para análise sorológica, visto que vários trabalhos demonstram que os resultados detectados por ELISA são altamente dependentes do antígeno empregado no teste, o que dificulta a observação de um padrão de resposta entre diferentes trabalhos (PRIMAVERA *et al.*, 1990; CERBAN *et al.*, 1993; MATSUMOTO *et al.*, 1993; CORDEIRO *et al.*, 2001; GUEDES, 2001; MICHAILOWSKY *et al.*, 2003). Carneiro (2002) utilizou antígeno de tripomastigotas e epimastigotas para avaliar a reatividade de IgG total. Nos grupos imunocompetentes foi detectado IgG a partir do 14^o DAI independente do antígeno empregado. A partir daí, os níveis de IgG sempre se mostraram superiores quando foi empregado antígenos de tripomastigotas, entretanto, o padrão da curva foi semelhante entre as duas preparações antigênicas. Nossos dados foram obtidos utilizando antígenos solúveis de epimastigotas,

se utilizássemos outras preparações antigênicas ou mesmo outras técnicas, provavelmente encontraríamos diferentes perfis de resposta. A utilização do antígeno de epimastigota foi empregado neste trabalho por ser facilmente cultivado em meio acelular, apresentar maior segurança no laboratório e ser o mais utilizado na literatura para a realização de reações de ELISA.

Ao avaliarmos o perfil de IgG, observamos a ocorrência de aumento dos níveis desta imunoglobulina a partir da segunda semana após o inóculo, sendo este progressivo nos animais infectados com TS e oscilante nos infectados com TM. Isso demonstra que a resposta humoral desencadeada no organismo do cão varia de acordo com a forma infectante utilizada. Possivelmente indivíduos infectados por transfusão sanguínea ou acidente de laboratório apresentariam perfis de resposta humoral diferentes daqueles que contraíram a doença de forma natural (pelo vetor). Lana *et al.* (1991) estudando o mesmo modelo também observaram aumento nos níveis de IgG durante a fase inicial da infecção. Guedes (2006), ao infectar cães da raça *Beagle* com diferentes cepas de *T. cruzi*, observou aumento nos níveis de IgG a partir da segunda semana após inóculo com formas TS. Tais resultados demonstram que a IgG total é precocemente detectada no soro de cães experimentalmente infectados (14 dias).

Estudos de fase aguda envolvendo camundongos BALB/c e C57BL/6 demonstraram aumento crescente nos níveis de IgG durante a infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos BALB/c apresentam uma maior produção desta imunoglobulina quando comparados a C57BL/6 (PÉREZ *et al.*, 2005). Nos casos humanos a produção de IgG aumenta mais lentamente durante o início da infecção, com pico de produção no 30º dia após a infecção, mantendo-se alta até o 93º dia (GRAUERT *et al.*, 1993).

Observa-se então uma variação no intervalo para se iniciar a produção de imunoglobulinas, devendo-se provavelmente, à capacidade inerente de cada indivíduo produzir uma resposta antígeno-específica, resultando na produção diferencial de imunoglobulinas circulantes.

Sá Ferreira *et al.* (1983) avaliando pacientes chagásicos crônicos não perceberam correlação entre os níveis de IgG e IgM em relação às diferentes formas clínicas da doença. Estes dados mostraram que, inicialmente, para a doença humana não era possível encontrar um marcador de prognóstico sorológico relacionado às diferentes manifestações clínicas da DC.

Avaliando os animais imunossuprimidos, observamos que os níveis de IgG total mantiveram-se baixos desde o inoculo, sendo que apenas o grupo TSIMS apresentou pequeno aumento destes níveis no último dia analisado. Dessa forma, percebe-se que a imunossupressão com azatioprina ocasionou uma diminuição nos níveis de IgG total independente da forma infectante utilizada. Acreditamos que a imunossupressão tenha alterado a capacidade da resposta imune celular influenciando diretamente na produção de anticorpos IgG específicos contra o *T. cruzi*. Estes resultados podem explicar falhas no diagnóstico precoce em indivíduos HIV/AIDS comumente encontradas na DC e em Leishmaniose visceral.

Ao analisarmos os resultados de IgG1, observamos que os animais infectados com TS apresentaram maiores níveis desta subclasse de imunoglobulina em relação ao grupo controle e TM em vários tempos, mas apenas no 14^o dia após inoculo esta diferença foi significativa. No entanto os níveis de IgG1 foram baixos tanto nos animais imunocompetentes quanto nos imunossuprimidos, o que pode ser resultante do curto período em que foi feita essa análise, pois estudos em cães *Beagle* infectados com a cepa Be-78 demonstraram que os níveis desta imunoglobulina começam baixos e depois ascendem até a 30^a semana (GUEDES, 2006). Há, portanto, fortes indícios de que a IgG1 seja uma imunoglobulina marcante no início da fase crônica na DC canina.

Estudos sorológicos em pacientes com comprometimento cardíaco revelaram altos níveis de IgG1 e IgG3 e baixos de IgG2 e IgG4 pelo método de ELISA quando empregados antígenos de epimastigota. Ao utilizar a fração antigênica citosólica ácida de epimastigota foi observado que IgG1 é o principal isotipo produzido nestes indivíduos (CERBAN *et al.*, 1993). Análises através da técnica de citometria de fluxo realizadas por Cordeiro *et al.* (2001) demonstraram que IgG1 e IgG3 são os principais anticorpos líticos presentes em humanos e que pacientes na forma indeterminada apresentam altos níveis de IgG1, o que pode caracterizar esta imunoglobulina como protetora na DC humana. Dados semelhantes foram obtidos através da sorologia de pacientes por ELISA, onde se percebeu que IgG1 e IgG3 são as principais imunoglobulinas presentes no sangue de pacientes com DC (MICHAILOWSKY *et al.*, 2003). Em murinos, vários estudos sugerem que as subclasses de imunoglobulinas IgG1 e IgG2b comportam-se como anticorpos líticos (STEFANI *et al.*, 1983; LIMA MARTINS *et al.*, 1985; PYRRHO *et al.*, 1998). Ainda não sabemos se a IgG1 canina possui função biológica semelhante a IgG1 humana. Mais recentemente, foi possível

produzir conjugados capazes de detectar especificamente a IgG3 e IgG4 de cães o que permitirá em um futuro próximo a melhor compreensão da função dessas outras subclasses de Imunoglobulinas G na DC experimental canina.

O comportamento do perfil da subclasse IgG2 encontrado foi semelhante ao de IgG total no grupo infectado com TM, ou seja, houve um aumento progressivo de ambos, enquanto que no grupo infectado com TS observou-se o contrário. No entanto, não foi observado diferença significativa de IgG2 no grupo TS durante os dias avaliados. Já Guedes (2006) observou perfis similares de IgG2 e IgG total, em animais infectados com formas TS independente da cepa utilizada (Be-78, ABC e Y). Estes resultados controversos podem ser devido ao curto período avaliado, provavelmente os níveis de IgG2 devem ascender após o 35^o dia.

Estudos realizados em murinos vacinados com o clone CL-14, da cepa CL do *T. cruzi*, demonstraram que IgG1 e IgG2b são as principais subclasses de imunoglobulinas produzidas nestes animais e que estas desempenham função protetora (PYRRHO *et al.*, 1998).

Torna-se importante ressaltar que semelhante ao que ocorreu para IgG, os grupos de cães imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS) não foram capazes de produzir níveis superiores de IgG1 e IgG2 em relação ao limiar de positividade (*cut off*) para estas imunoglobulina. Esses dados são relevantes, uma vez que evidenciam a incapacidade da resposta à produção de anticorpos IgG1 e IgG2 antígeno-específica em cães submetidos à imunossupressão, demonstrando assim, o efeito da terapêutica imunossupressora sob o sistema imune do animal.

Quanto ao perfil de IgM, percebe-se que os animais infectados com TS apresentam níveis mais elevados desta imunoglobulina que o grupo infectado com TM. O aumento nos níveis desta imunoglobulina ocorre a partir do inoculo; porém, elevação significativa somente foi percebida a partir da terceira semanas após a infecção.

Lana *et al.* (1991) observaram aumento dos níveis de IgM, por ELISA e RIFI, a partir da 2^a semana após a infecção, sendo que estes níveis se mantiveram ascendentes até o terceiro mês, quando avaliado pela técnica de RIFI, e até o segundo ano quando avaliado por ELISA.

Resultados semelhantes foram encontrados por Guedes (2006) nos quais foi observado aumento de IgM em cães *Beagle* infectados pelas cepas Be-78, Y e ABC a partir da 2^a semana de infecção com queda nos níveis desta imunoglobulina a partir da

30ª semana de infecção. Matsumoto *et al.* (1993) investigaram a detecção de IgM em humanos, encontrando uma detecção de 100% durante a fase aguda da DC e na fase crônica, ínfima proporção desta imunoglobulina. Morgan *et al.* (1996) observaram que pacientes com alterações cardíacas apresentam níveis mais elevados de IgM em relação aos indivíduos não infectados ou na forma indeterminada. Estudo avaliando a cinética da produção de IgM em pacientes de fase aguda, demonstra rápida elevação nos níveis de IgM até o décimo sétimo dia após a infecção Grauert *et al.* (1993), sendo que estes decaem até o 66º dia permanecendo acima dos níveis basais até o 93º dia.

É digno de nota o achado de que apenas a classe IgM apresentou, no decorrer da infecção, aumento de seus níveis nos grupos imunossuprimidos (TSIMS e TMIMS), demonstrando uma cinética diferenciada desta imunoglobulina em relação às outras classes e subclasses avaliadas. Tais achados parecem indicar uma incapacidade da célula B em promover a troca de classe de imunoglobulinas nos animais imunossuprimidos (HALDAR *et al.*, 1983; MEDRANO *et al.*, 1998).

Da mesma forma que IgM, a IgA apresentou maiores níveis no grupo TS em relação ao grupo TM e controle, sendo esta diferença significativa a partir da primeira semana após o inóculo. Entretanto, os níveis desta imunoglobulina não se alteraram significativamente ao longo do período analisado. Guedes (2006) detectou em seu trabalho, envolvendo cães *Beagle*, baixos níveis de IgA a partir da segunda semana após o inóculo, com aumento destes níveis até a 6ª semana para todos os grupos avaliados, independentes da cepa utilizada. Estudos envolvendo humanos demonstram que a IgA está relacionada à forma digestiva da DC. Sá Ferreira *et al.* (1983) ao avaliarem indivíduos na fase crônica da DC apresentando diferentes formas clínicas observaram, através de imunodifusão radial, que metade dos pacientes avaliados portadores da forma digestiva da doença apresentavam elevados níveis de IgA. Estudos posteriores demonstraram que a técnica de ELISA empregando antígenos de amastigotas são mais adequados na detecção de IgA em soros de pacientes Chagásicos e que IgA realmente está associada a forma digestiva da doença (PRIMAVERA *et al.*, 1988; MORGAN *et al.*, 1996). Matsumoto *et al.* (1993) realizaram imunofluorescência indireta empregando amastigotas como antígeno e não observaram, no entanto, correlação entre IgA e a forma digestiva da doença, mas detectaram, na fase aguda, altos títulos de IgA em mais da metade dos pacientes, sendo que na fase crônica este aumento foi observado em apenas 33% dos pacientes.

Níveis elevados de IgE são encontrados em várias doenças parasitárias causadas por helmintos. Estudos envolvendo a infecção pelo *T. cruzi* demonstram que este protozoário não se comporta da mesma forma. Avaliações realizadas em pacientes chagásicos não identificaram aumento nos níveis de IgE em relação a indivíduos não infectados (GELLER *et al.*, 1978). Nossos resultados, entretanto, demonstram que o grupo TS apresentou maior reatividade desta imunoglobulina no sétimo dia após a infecção e depois houve um decréscimo em sua produção. De forma interessante, os animais imunossuprimidos apresentaram aumento nos níveis de IgE em relação ao controle nos dias zero, sete e quatorze no grupo TSIMS e no dia 7 no grupo TMIMS. Estas diferenças podem ter sido ocasionadas não pela infecção destes animais, mas por uma produção intrínseca desta imunoglobulina por eles, visto que não foi observada diferença significativa entre o dia da infecção e os outros dias após o inoculo em ambos os grupos imunossuprimidos infectados.

Trabalhos envolvendo a cepa Be-78, ABC e Y demonstraram que nas infecções com as cepas Be-78 e ABC há predomínio de formas largas, já na infecção com a cepa Y observa-se predomínio da forma delgada (LANA & CHIARI, 1986; MARQUES DE ARAÚJO & CHIARI, 1988; GUEDES, 2006). Ao se observar a infectividade em cães *Beagle*, percebe-se que as formas largas (Be-78 e ABC) são menos infectantes que as formas delgadas (Y). Percebe-se também, que a cepa ABC é capaz de desenvolver maior parasitemia que as cepas Y e Be-78, sendo que o grupo infectado com a última apresenta menor parasitemia (GUEDES, 2006). Outros estudos demonstram que a cepa Be-78 apresenta uma maior virulência e patogenicidade em relação à cepa Be-62, utilizando o cão como modelo experimental (LANA *et al.*, 1988; 1992).

Carneiro (2002) ao observar as curvas de parasitemia dos grupos imunocompetentes mostrou que o período pré-patente no grupo TM foi de 23 dias e do grupo TS de 19 dias, já os animais imunossuprimidos apresentaram período pré-patente significativamente menor e parasitemia maior em ambos os grupos (TSIMS e TMIMS). A presença de um período pré-patente maior no grupo TM pode dever-se ao fato de a interação tripomastigota metacíclica-célula hospedeira ocorrer mais lentamente, levando a um maior período de latência, até que ocorra a liberação das formas TS na circulação tal como sugere Carneiro, (2002). A partir deste achado, que envolve a possibilidade de uma interação mais lenta entre o parasito e as células do hospedeiro no grupo TM podemos sugerir que este fato se repercuti em uma elevação mais tardia nos níveis de

imunoglobulinas das classes IgG, IgM, IgA e IgE, e subclasses IgG1 e IgG2 nos animais do grupo TM em relação ao grupo TS.

Ao observar os resultados de IgG, IgG2, IgM, IgA e IgE percebemos uma elevação nos níveis destas imunoglobulinas que antecede o pico de parasitemia nos animais imunocompetentes, exceção feita a IgA e IgE no grupo TM. Este aumento pode ser resultado de uma ativação dos linfócitos B antes mesmo que a parasitemia alcance níveis mais elevados. Nos cães imunossuprimidos o perfil de IgM se destaca e percebe-se um aumento de seus níveis a partir do dia em que foi detectado tripomastigotas na corrente sanguínea. Possivelmente, devido a uma redução no número de células apresentadoras de antígeno a estimulação dos linfócitos B também ocorre mais tardiamente. Ao verificarmos possíveis correlações entre as imunoglobulinas avaliadas e a parasitemia notamos a ausência de correlação entre estes fatores. Lana *et al.* (1991) também não encontrou correlação entre imunoglobulinas e parasitemia na DC avaliando o mesmo modelo. Estudo em cães infectados com *Trypanosoma evansi*, protozoário que afeta principalmente caprinos, também relatou ausência de correlação entre os níveis de anticorpos e o controle da parasitemia (AQUINO *et al.*, 1999).

Carneiro (2002) ao comparar as curvas de parasitemia dos animais imunocompetentes, e estabelecer uma relação com o percentual médio das populações celulares analisadas, observou que o controle da parasitemia coincidia com a elevação e manutenção do percentual de células T CD8⁺ e com o período de menor percentual de monócitos circulantes, sugerindo que o controle da parasitemia poderia estar relacionado a estas populações celulares. O menor percentual de monócitos circulantes poderia ser devido a uma migração preferencial dessas células para os tecidos (órgãos linfóides) e sua transformação em macrófagos com conseqüente aumento da eliminação de parasitas teciduais. Da mesma forma, as células T CD8⁺ estariam identificando células cardíacas infectadas, colaborando para a diminuição do parasitismo tecidual e, conseqüentemente, sanguíneo. Além disso, estudos histopatológicos do miocárdio destes animais mostraram que o processo inflamatório foi menor no grupo infectado com formas TM, sugerindo uma resposta mais eficiente neste grupo, com ampla participação de macrófagos (SANTOS, 2006).

Diferentes estudos têm descrito uma forte ativação do sistema imune durante a fase aguda da DC. Ativação inespecífica de macrófagos e células NK acompanhado de

ativação policlonal de linfócitos B e T e de hipergamaglobulinemia são observados durante os estágios iniciais da DC experimental (TARLETON, 1991).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, na corrente sanguínea do indivíduo infectado circula a forma tripomastigota que invade uma ampla variedade de células e se transforma em amastigotas multiplicando-se intracelularmente. Ambas as formas reproduzem um complexo padrão de resposta imune, incluindo produção de anticorpos e resposta celular mediada por células T CD4⁺ e T CD8⁺ (TARLETON, 1991). A insuficiência na produção de anticorpos dificulta a geração de resposta protetora ao *T. cruzi*, entretanto, camundongos deficientes de células B são capazes de sobreviver por períodos significativamente maiores que camundongos deficientes de células T CD4⁺ e T CD8⁺. Já camundongos deficientes de ambos os tipos celulares apresentam altas cargas parasitárias e morrem mais rapidamente que animais com deficiência de apenas uma das subpopulações de células T (TARLETON *et al.*, 1992; 1996; ROTTENBERG *et al.*, 1995).

As células T podem se dividir em dois principais subgrupos, Th1 e Th2, dependendo das citocinas produzidas após sua ativação. Células Th1 produzem IL-2, IFN- γ e TNF- α , e as Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10 e IL-13 (O'GARRA., 1998; O'GARRA & MURPHY., 1996; PAUL & SEDER, 1994). Linfócitos Th1 CD4⁺ que produzem IL-2 e IFN- γ têm se mostrado importantes para a proteção contra um amplo espectro de patógenos intracelulares através da ativação de macrófagos que levam à inibição da replicação intracelular. Além disso, as células Th1 CD4⁺ exercem atividade moduladora além de ajudar na expansão de linfócitos T citotóxicos CD8⁺ que reconhecem e destroem as células infectadas. Entretanto, linfócitos T CD4⁺ mostram-se necessários, mas não suficientes para controlar a infecção pelo *T. cruzi* em murinos (HOFT *et al.*, 2000).

Estudos *in vivo* demonstram que ambos os tipos celulares, Th1 e Th2, são capazes de estimular a expansão clonal de células B e a produção de anticorpos (SMITH *et al.*, 2000). Estudos neste campo ainda são necessários, pois existem trabalhos controversos em relação à capacidade de Th1 estimular células B e outros demonstram que alguns clones de célula Th2 deixam a desejar no suporte à síntese de anticorpos (DEKRUYFF *et al.*, 1989; RANDOLPH *et al.*, 1999).

Devido à importância da resposta humoral e celular na DC verificamos as possíveis correlações entre as imunoglobulinas das classes IgG, IgM, IgA e IgE e

subclasses IgG1 e IgG2 e os fenótipos celulares (Thy-1⁺, CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e CD21⁺) presentes no sangue periférico de animais infectados com as formas TS ou TM. Os dados referentes ao fenótipo celular do sangue periférico foram obtidos por Carneiro, (2002) durante seu trabalho de doutorado. Em seu estudo Carneiro, (2002) realizou análises de cinética das populações celulares do sangue periférico, baço e linfonodo, além de outras abordagens.

Estudos envolvendo correlação entre as classes e subclasses de imunoglobulinas em relação aos fenótipos celulares do sangue periférico são escassos na literatura. O atual trabalho traz algumas correlações encontradas nos diversos grupos analisados, sendo que em muitas não há uma conexão direta entre a imunoglobulina e o fenótipo analisado. Assim, estas novas abordagens aqui empregadas poderão contribuir para a elucidação de muitos dos mecanismos envolvidos na resposta imune da DC.

Carneiro (2002) verificou em seu trabalho, aumento significativo de célula T (Thy-1⁺) durante a fase aguda da infecção pelas formas TM da cepa Be-78 em cães sem raça definida quando comparados a animais não infectados. Rinkardt *et al.* (1999) relataram que não ocorrem alterações no percentual de células T (Thy-1⁺, CD4⁺ e CD8⁺) e B em cães normais, após 14 dias de tratamento com azatioprina. Já Carneiro (2002) verificou aumento significativo de Thy-1⁺ nos grupos infectados tanto com TM quanto com TS em animais imunossuprimidos pela azatioprina, sendo que no grupo infectado com TM este aumento foi maior. Ao verificarmos o comportamento das imunoglobulinas frente ao fenótipo Thy-1⁺ observamos que a medida em que ocorre aumento em seus níveis o mesmo acontece com IgG total, IgM e IgA, e o inverso com IgG1 nos cães do grupo TSIMS. Já no grupo TMIMS a correlação positiva ocorreu apenas com IgG total e IgM. Nos animais imunocompetentes infectados com formas TS percebe-se a ocorrência de uma diminuição da imunoglobulina IgA, a medida que há um aumento de linfócitos T (Thy-1⁺).

Trabalhos envolvendo crianças na forma indeterminada da DC relataram baixo percentual de linfócitos T CD3⁺ na corrente sangüínea durante o início da fase indeterminada da infecção, sendo este decréscimo acompanhado pela diminuição de linfócitos T CD8⁺ (VITELLI-AVELAR *et al.*, 2006).

Análises da cinética do percentual de células CD4⁺ do sangue periférico demonstram que os cães infectados com TM ou TS apresentam também diminuição destas células durante a fase aguda da DC quando comparados ao grupo controle

(CARNEIRO, 2002). Animais infectados com TS mostraram um aumento das imunoglobulinas IgG total e IgM a medida que $CD4^+$ diminui, o que também foi observado no grupo TM, no entanto neste grupo a correlação não foi significativa.

Já nos cães imunossuprimidos com azatioprina houve aumento do percentual de células $CD4^+$ nos animais infectados com TM (CARNEIRO, 2002). Acompanhado deste aumento de $CD4^+$ é observado discreta elevação dos níveis de IgG total e IgA no grupo TMIMS, enquanto um aumento mais evidente é percebido em relação a IgM neste grupo. Já em cães imunossuprimidos infectados com TS o aumento de $CD4^+$ é acompanhado de níveis ascendentes de IgA e descendentes de IgG2.

A avaliação das células T $CD8^+$ demonstrou que cães infectados com TM ou TS apresentaram aumento no percentual destas células ao longo da fase aguda da infecção, sendo este aumento maior no grupo infectado com TM em relação ao grupo controle (CARNEIRO, 2002). Este crescimento no percentual de linfócitos T $CD8^+$ foi acompanhado do aumento de IgG e IgM em cães infectados com TS, independente do estado imunológico, e por aumento de IgG e IgA apenas no grupo TM.

Já nos animais imunossuprimidos não foi observado diferença nos percentuais destas células ao longo da fase aguda, entretanto os animais infectados com TM apresentaram maior percentual destas células em relação ao grupo controle avaliado (CARNEIRO, 2002). Ao realizarmos avaliação do grupo infectado com as formas TM não foi observado correlação com nenhuma das imunoglobulinas avaliadas.

Tais alterações observadas na análise de correlação entre a resposta humoral aqui avaliada por diferentes classes e subclasses de imunoglobulina e os fenótipos de células T mostram uma série de fenômenos decorrentes do processo de infecção na fase aguda. Estes fenômenos estão intimamente relacionados com a interação parasito/célula hospedeira no intuito de conter a infecção em animais imunocompetentes. Por outro lado, observamos que os cães imunossuprimidos são capazes de expandir determinadas subpopulações celulares como linfócitos $TCD4^+$ e/ou mesmo $CD8^+$. Entretanto, estas expansões isoladamente não representam um fenômeno relacionado com proteção ou equilíbrio na relação parasito-hospedeiro, já que muitas vezes a produção de anticorpos encontra-se comprometida. Além disso, estes animais apresentaram parasitemia maior em relação aos cães imunocompetentes demonstrando assim falhas no processo imunológico que provavelmente estão relacionados à inabilidade de produzir anticorpos líticos.

Estudos prévios envolvendo células B CD21⁺ realizadas durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* demonstraram diminuição no percentual destas células no sangue periférico de cães infectados com TM ou TS em relação ao controle tanto em animais imunocompetentes quanto em imunossuprimidos (CARNEIRO, 2002). O decréscimo de células B, paralelo ao aumento da produção de imunoglobulinas observada durante a fase aguda, sugere a provável ocorrência de modulação das células B, com conseqüente perda da molécula CD21 e manutenção dos níveis de linfócitos B. Outra justificativa hipotética para este desaparecimento de linfócitos B circulantes é a migração preferencial desta população de células para órgãos linfóides e sua transformação em plasmócitos, resultando daí a ativação policlonal e conseqüente produção de imunoglobulinas.

De acordo com Ogilvie *et al.* (1988), a ação imunossupressora da azatioprina sobre células caninas está relacionada à supressão de células T e, em menor grau, ao seu efeito sobre as células B. A detecção de uma diminuição do percentual médio das células CD21⁺ durante a avaliação, em todos os grupos, confirma a atuação da azatioprina sobre a população de linfócitos B. Apesar da atuação sobre os linfócitos B, podemos perceber principalmente nos animais imunossuprimidos um aumento dos níveis de IgG total, IgM e IgA a medida que o percentual de células CD21⁺ diminui no sangue periférico. Entretanto, quando se compara os animais imunocompetentes com imunossuprimidos observa-se uma diminuição mais evidente nos níveis das imunoglobulinas da classe IgG e subclasse IgG2 nos animais submetidos ao tratamento com azatioprina. Desta forma, podemos sugerir que a queda no percentual de células B observada ao longo dos 35 dias de infecção estaria relacionada a baixos níveis de IgG e IgG2 se comparada aos animais não imunossuprimidos. Apesar da diminuição da proliferação das células B *in vitro*, Abdou *et al.* (1973) não observaram diminuição nos níveis de imunoglobulinas *in vivo*. Nos animais imunocompetentes é observada correlação positiva apenas entre o percentual de células CD21⁺ e IgG1 no grupo TM. REIS *et al.*, (2006) observaram em cães naturalmente infectados com *Leishmania chagasi*, portadores da forma sintomática, que apesar dos altos níveis de anticorpos circulantes, ocorre redução de linfócitos B (CD21⁺) no sangue periférico e no baço.

Avaliações de fase aguda envolvendo monócitos CD14⁺ demonstraram que cães infectados com TM ou TS apresentaram menor percentual destas células no sangue periférico que os não infectados. Este fato foi observado tanto em animais imunocompetentes quanto em imunossuprimidos (CARNEIRO, 2002). Ao avaliarmos o

percentual de monócitos CD14⁺ no sangue periférico notamos que ao ocorrer uma diminuição no percentual desta célula ocorre paralelamente diminuição de IgG1 e aumento de IgG total, IgM e IgA em animais imunossuprimidos pela azatioprina e infectados com TS. Já nos imunossuprimidos infectados com TM ocorre aumento apenas da imunoglobulina da classe IgM quando o percentual de monócitos diminui. Em relação a cães imunocompetentes infectados com TM os níveis de IgG total aumentam a medida que o número de monócitos do sangue periférico diminui e o contrário ocorre com IgG1, que diminui seus níveis junto à diminuição do percentual de monócitos.

No presente trabalho, procuramos contribuir para a melhor compreensão dos eventos relacionados à resposta humoral com a realização de um estudo detalhado de classes e subclasses de imunoglobulinas em cães, além de buscar uma conexão desses eventos à parasitemia e à resposta celular, através de análises de correlações. Entretanto, acreditamos que a avaliação dos perfis de citocinas em animais imunocompetentes e imunossuprimidos será fundamental para a maior elucidação dos fenômenos aqui relatados.

7 - CONCLUSÕES

A forma infectante interfere na cinética do perfil de resposta humoral em cães imunocompetentes, sendo que animais infectados com as formas tripomastigotas sangüíneas apresentam maiores níveis de imunoglobulinas em relação aos animais infectados com as formas tripomastigotas metacíclicas. Uma característica marcante no grupo de cães infectados com as formas tripomastigotas sangüíneas, foi o aumento nos níveis de IgG e IgM, manutenção dos níveis de IgG1, IgG2 e IgA ao longo do tempo e um aumento de IgE seguido de decréscimo, enquanto que os cães infectados com as formas tripomastigotas metacíclicas apresentam aumento nos níveis de IgG, IgG2 e IgA e manutenção dos níveis de IgG1, IgM e IgE.

A imunossupressão com azatioprina interfere no perfil de resposta humoral reduzindo os níveis de IgG, IgG1, IgG2, IgA e IgE em todos os animais, independente da forma infectante. Por outro lado, os níveis de IgM foram ascendentes a partir do 21º dia após a infecção. Apesar dos baixos níveis de imunoglobulinas detectados nos cães imunossuprimidos, aqueles infectados com as formas tripomastigotas sangüíneas apresentam um padrão de resposta humoral semelhante ao grupo imunocompetente. Enquanto que os animais infectados com formas tripomastigotas metacíclicas apresentaram padrão semelhante para IgG, IgM e IgA e distinto para IgE com redução de IgG1 e manutenção de IgG2.

Perfis de classes e subclasses de imunoglobulinas não estão relacionados à parasitemia durante a fase aguda da infecção de cães, seja naqueles infectados por formas tripomastigotas sangüíneas ou metacíclicas, submetidos ou não a imunossupressão.

Diversas correlações entre os perfis cinéticos de imunoglobulinas e os percentuais celulares foram encontradas. Destacam-se, no grupo infectado com formas tripomastigotas sangüíneas, as correlações negativas de IgG e IgM com linfócitos T CD4⁺ e positivas com linfócitos T CD8⁺, e no grupo infectado com as formas tripomastigotas metacíclicas, as correlações positivas de IgG com linfócitos T CD8⁺ e de IgG1 com linfócitos B CD21⁺.

Nos animais imunossuprimidos de ambos os grupos, destacam-se as correlações negativas de IgG e IgM com linfócitos B CD21⁺, enquanto as correlações positivas foram de IgG e IgM com linfócitos T CD8⁺ no grupo infectado com tripomastigotas

sangüíneas e com linfócitos T CD4⁺ no grupo infectado com tripomastigotas metacíclicas.

Assim, estes distintos perfis permitem hipotetizar que a infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas seria capaz de induzir uma atividade policlonal de linfócitos B mais diversificada que poderia ser responsável pelo maior período pré-patente neste grupo, sugerindo um equilíbrio na relação parasito/hospedeiro. Além disso, o comprometimento da resposta celular nos animais imunossuprimidos interfere na interação célula T – B prejudicando a síntese de anticorpos em ambos os grupos. Finalmente, a mortalidade de 50% observada apenas no grupo imunossuprimido infectado com as formas tripomastigotas metacíclicas pode se dever ao somatório das alterações mais pronunciadas neste grupo.

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDOU, N.I.; CASELLA, S.R.; ABDOU, N.L.; ABRAHAMSOHN, I.A. Comparative study of bone marrow and blood B cells in infantile and acquired agammaglobulinemia. Possible role of circulating anti-IgM in pathogenesis. **J Clin Invest.** v. 52, n. 9, p. 2218-2224, 1973.
- ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. Trypanosoma cruzi: IL-10, TNF, IFN- γ , and IL-12 Regulate Innate and Acquired Immunity to Infection. **Exp Parasitol,** v. 84, n. 2, p. 231-244, 1996.
- ACHE, A.; MATOS, A.J. Interrupting Chagas disease transmission in Venezuela. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 43, n. 1, p. 37-43. 2001.
- AQUINO, L.P.; MACHADO, R.Z.; ALESSI, A.C.; MARQUES, L.C.; DE CASTRO, M.B.; MALHEIROS, E.B. Clinical, parasitological and immunological aspects of experimental infection with *Trypanosoma evansi* in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v. 94, n. 2, p. 255-260, 1999.
- AMATO NETO, V.; MOREIRA, A.A.; CAMPOS, R.; DUARTE, M.I.; PINTO, P.L.; DE SANT'ANA EJ. Experimental and preliminary observation on the ultimate influence of cyclosporin on chronic infection of mice by *Trypanosoma cruzi*. **Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo,** v.41, n. 5, p. 219-221, 1986.
- ANDRADE, S.G.; MACEDO, V. Combined treatment of Chagas' disease with Bayer 2502 and corticoid (experimental and clinical study) **Rev Inst Med Trop São Paulo,** v.15, n. 6, p. 421-430; 1973.
- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am J Pathol,** v. 127 n. 3, p. 467-473, 1987.
- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Damage and healing in the conducting tissue of the heart (an experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*). **J Pathol,** v.143, n. 2, p. 93-101, 1984.
- ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Pathology of experimental Chagas disease in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz,** v.75, n. 3-4, p. 77-95, 1980.
- BAHIA, M.T.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V.; VELOSO, VM.; CARNEIRO, C.M.; COELHO, G.L.L.M.; LANA, M.. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78strains via intraperitoneal and conjunctival routes. **Rev Inst Med Trop São Paulo,** v. 35, n. 4, p. 339-345, 2002.
- BARBOSA, P.R.B. The oral transmission of Chagas' disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks. **Int J Cardiol.** v. 112, n. 1, p.132-133, 2006.
- BOURDOISEAU, G.; BONNEFONT, C.; HOAREAU, E.; BOEHRINGER, C.; STOLLE, T.; CHABANNE, L. Specific IgG1 and IgG2 antibody and lymphocyte subset levels in naturally *Leishmania infantum*-infected treated and untreated dogs. **Vet Immunol Immunopatho,** v. 59, n. 1-2, p. 21-30, 1997.

- BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol**, v. 114, n. 2, p.103-110, 1997.
- BRENER Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv Parasitol**, v. 18, p. 247-292, 1980.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas' disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. v. 65, n. 5, p. 629-636, 1971.
- BRENER Z. Therapeutic activity and criterion of cure in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v.4, n. 11-12, p. 389-396; 1962.
- CARNEIRO, C.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; REIS, A.B.; VELOSO, V.M.; ARAÚJO, F.M.G.; BAHIA, M.T.; LANA, L.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TAFURI, W.L. Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. **Acta Tropica**. v.101, n.2, p. 120-129; 2007.
- CARNEIRO, C.M. Avaliação parasitológica e imunológica de cães experimentalmente infectados com formas tripomastigotas metacíclicas ou sangüíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, submetidos ou não, à imunossupressão durante a fase aguda. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Faculdade de Medicina, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte. 184f. 2002.
- CERBAN, F.M., GEA, S., MENSIO, E., VOTTERO-CIMA, E. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 67, n. 1, p. 25-30, 1993.
- CERBAN, F.; GRUPPI, A.; GEA, S.; VOTTERO-CIMA, E. IgG isotype profiles induced in mice by two *Trypanosoma cruzi* electromegative antigens. **Int Arch Allergy Appl Immunol**, v. 96, n.1, p. 35-40, 1991.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.
- CORDEIRO, F.D.; MARTINS-FILHO, O.A.; ROCHA, M.O.C.; ADAD, S.J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, A.J. Anti-*Trypanosoma cruzi* Immunoglobulin G1 Can Be a Useful Tool for Diagnosis and Prognosis of Human Chagas' Disease. **Clin Diagn Lab Immunol**. v.8, n.1, p. 112-118; 2001.
- DEL CASTILLO, M.; MENDOZA, G.; OVIEDO, J.; BIANCO, R.P.P.; ANSELMO, A.E.; SILVA, M. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. **Am J Med** . v. 88, n. 6, p. 693–694; 1990.

- DEKRUYFF, R.H.; JU, S.T.; HUNT, A.J.; MOSMANN, T.R.; UMETSU, D.T. Induction of antigen-specific antibody responses in primed and unprimed B cells. Functional heterogeneity among Th1 and Th2 T cell clones. **J Immunol.** v. 142, n. 8, p. 2575-2582, 1989.
- DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin América – A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 5, p. 603-612, 2002.
- DIAS, J.C.P. Epidemiological surveillance of Chagas disease. **Cad Saúde Pública**, v. 16, n. 2, p. 43-59, 2000.
- ELKELES, G. On the life cycle of *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol.** v. 37, n. 4, p. 379-386, 1951.
- FERREIRA, M.S.; BORGES, A.S. Some Aspects of Protozoan Infections in Immunocompromised Patients - A Review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v. 97, n. 4, p. 443-457, 2002.
- GELLER, M.; GELLER, M.; FLAHERTY, D.K.; BLACK, P.; CAPANEMA-SOUZA, A.P. Serum IgE levels in Chagas' disease. **Clin Allergy**, v.8, n. 4, p. 383-385, 1978.
- GOLDEN, J.M.; TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi*: Cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp Parasitol**, v. 72, n. 4, p. 391-402, 1991.
- GRANT, I.,; GOLD, J.W.M.; WITTNER, M.; TAMOWITZ, H.B.; NATHAN, C.; MAYER, K.; REICH, L.; WOLLNER, N.; STEINHERZ, L.; GHAVINI, F.; O'REILLY, R.J.; ARMSTRONG, D. Transfusion-associated acute Chagas disease acquired in the United States. **Ann Int Med.** v.111, n. 10, p. 849-851, 1989.
- GRAUERT, M.R.; HOUDAYER, M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWCIZ, M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in na acute case of human Chagas' disease. **Clin Exp Immunol**, v. 93, n. 1, p. 85-92, 1993.
- GUEDES, P.M.M. Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, **Universidade Federal de Minas Gerais**, Belo Horizonte. 103f. 2006.
- GUEDES, P.M.M. Avaliação do cão como modelo experimental para a quimioterapia da doença de Chagas. Tese (Mestrado em Ciências Biológicas), **Universidade Federal de Ouro Preto**, 2001, 106p.
- HALDAR, J.P.; GHOSE, S.; SAHA, K.C.; GHOSE, A.C. Cell-mediated immune response in Indian kala-azar and post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Infect Immun**; v. 42, n. 2, p. 702-707, 1983.

- HARTCHER, F.M.; KUHN, R.E.; CERRONE, M.C.; BURTON, R.C. Increased natural killer activity in experimental American trypanosomiasis. **J. Immunol.**,v.127, n. 3, p. 1126-1130, 1981.
- HIGUCHI, M.D. Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. **Rev Paul Med.** v. 113, n. 2, p. 821-825, 1995.
- HOFT, D.F.; SCHNAPP, A.R.; EICKHOFF, C.S.; ROODMAN, S.T. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** v. 68, n. 1, p. 197-204. 2000.
- KICRCHHOFF, L.V. American trypanosomiasis (Chagas' disease)--a tropical disease now in the United States. **N Engl J Med.** v.329, n. 9, p. 639-644.1993.
- KIERSZENBAUM, F.; HOWARD, J.G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J. Immunol.** v.116, n. 5, p. 1208-1211, 1976.
- KOLLIEN, A.H.; SCHAUB, G.A. The development of *Trypanosoma cruzi* in triatominae. **Parasitol. Today.** v. 16, n. 9, p. 381-387, 2000.
- KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.** v. 128, n. 5, p. 2009-2012, 1982.
- KUMAR, S.; TARLETON, R.L. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.**, v. 20, n. 5, p. 207-216, 1998.
- LANA, M. O cão como modelo experimental para o estudo da doença de Chagas. Tese (Doutorado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 206 f. 1992.
- LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L. Experimental Chagas' disease in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 87, n. 1, p. 59-71; 1992.
- LANA, M.; VIEIRA, L.M.; MACHADO-COELHO, G.L.; CHIARI, E.; VELOSO, V.M.; TAFURI, W.L. Humoral immune response in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 86, n. 4, p. 471-473, 1991.
- LANA, M.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V.; BAMBIRRA, E.A.; CHIARI, C.D.; LEITE, V.H.; BARBOSA, A.J.; TOLEDO, M.J.; CHIARI, E. Chronic fibrotic cardiac stage of experimental trypanosomiasis cruzi in dogs. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 21, n. 3, p. 113-21, 1988.

- LANA, M.; CHIARI, C.A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice-78 de *Trypanosoma cruzi*, isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 81, p. 247-253, 1986.
- LANA, M. Caracterização do *Trypanosoma cruzi*, cepa Berenice, isolada da mesma paciente em diferentes períodos. Tese (Mestrado em Parasitologia) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 91 f. 1981.
- LIMA MARTINS, M.V.; SANCHEZ, G.A.; KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunol.** v. 7, n. 4, p. 367-376, 1985.
- LOPES, E.R.; BRASILEIRO-FILHO, G.; BARBOSA, A.; PITELLA, A.; PEREIRA, F.E.L. Patologia das Principais Doenças Tropicais no Brasil, Doença de Chagas. In: **Bogliolo**, 1103-1124, 1994.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J Biol Chem.** v. 193, n.1, p. 265-275; 1951.
- MACHADO, E.M.; CAMILO-JUNIOR, D.J.; PINHEIRO, S.W.; LOPES, E.R.; FERNANDES, A.J.; DIAS, J.C.; ADAD, S.J. Morphometry of submucous and myenteric esophageic plexus of dogs experimentally reinfected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 96, n. 4, p. 545-548, 2001.
- MAGALHAES, J.B.; ANDRADE, S.G. Investigation on the possibility of spontaneous cure of mice infected with different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop São Paulo**, v. 36, n. 6, p.481-484, 1994.
- MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.; CARVALHO, J.F.; CANCADO, J.R.; BRENER, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. **Clin Diagn Lab Immunol.** v. 2, n.5, p.569-573, 1995.
- MARQUES DE ARAÚJO, S.M.; CHIARI, E. Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred C3H mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 83, n. 2, p. 175-181, 1988.
- MATSUMOTO TK, HOSHINO-SHIMIZU S, NAKAMURA PM, ANDRADE HF JR, UMEZAWA ES. High resolution of *Trypanosoma cruzi* amastigote antigen in serodiagnosis of different clinical forms of Chagas' disease. **J Clin Microbiol.** v. 31, n. 6, p. 1486-1492, 1993.
- MCCABE, R.E.; REMINGTON, J.S.; ARAUJO, F.G. "In vivo" and "in vitro" effects of cyclosporin A on *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg.** v. 34, n. 5, p. 861-865, 1985.

- MEDRANO, F.J.; CAÑAVATE, C.; LEAL, M.; REY, C.; LISSEN, E.; ALVAR, J. The role of serology in the diagnosis and prognosis of visceral leishmaniasis in patients coinfecting with human immunodeficiency virus type-1. **Am J Trop Med Hyg.** v. 59, n. 1, p. 155-162, 1998.
- MICHAILOWSKY, V.; LUHRS, K.; ROCHA, M.O.C.; FOUTS, D.; GAZZINELLI, R.T.; MANNING, J.E. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. **Infect Immun.** v. 71, n. 6, p. 3165-3171; 2003.
- MINOPRIO, P.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. I. Quantitation of both T and B responses. **Scand J. Immunol.** v. 24, n. 6, p. 661-668; 1986.
- MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the southern cone countries. **Mens Inst Oswaldo Cru.** v. 98, n. 5, p. 577-591, 2003.
- MORGAN, J.; COLLEY, D.G.; DIAS J.C.P.; GONTIJO, E.D.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; POWELL, M.R.. Analysis of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype specificities by Western blot in sera from patients with different forms of Chagas' disease. **J. Parasitol.** v. 84, n. 3, p. 641-643, 1998.
- MORGAN, J.; DIAS, J.C.P.; GONTIJO, E.D.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D.G.; POWELL, M.R. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **Am J Trop Med Hyg.** v. 55, n. 4, p. 355-359, 1996.
- NICKELL, S.P.; STRYKER, G.A.; AREVALO, C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.** v. 150, n. 4, p. 1446-1457, 1993.
- NICKERSON, P.; ORR P.; SCHROEDER, M.L.; SEKLA, L.; JOHNSTON, J.B. Transfusion associated *Trypanosoma cruzi* infection in a non-endemic area. **Ann Intern Med.** v. 111, n. 10, p. 851-853, 1989.
- O'GARRA A. Checkpoints for regulation of development and interferon gamma production by Th1 cells in TCR-transgenic models. **Eur Cytokine Netw.** v. 9, n. 3 p. 41-42, 1998.
- O'GARRA, A.; MURPHY, K. Role of cytokines in development of Th1 and Th2 cells. **Chem Immunol.** v. 63 p.1-13, 1996.
- OGILVIE, G.K.; FELSBURG, P.J.; HARRIS, C.W. Short-term effect of cyclophosphamide and azathioprine on selected aspects of the canine blastogenic response. **Vet Immunol Immunopathol.** v. 18, n.2, p. 119-127, 1988.

- ORTIZ-ORTIZ, L.; ORTEGA, T.; CAPIN, R.; MARTINEZ, T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Int Arch Allergy Appl Immunol.** v. 50, n. 2, p. 232-242; 1976.
- PARADA, H.; CARRASCO, H.A.; ANEZ, N.; FUENMAYOR, C.; INGLESSIS, I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. **Int J Cardiol.** v. 60, n. 1, p.49-54, 1997.
- PAUL, W.E.; SEDER, R.A. Lymphocyte responses and cytokines. **Cell.** v. 76, n. 2, p. 241-251, 1994.
- PÉREZ, A.R.; TAMAE-KAKAZU, M.; PASCUTTI, M.F.; ROGGERO, E.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. Deficient control of *Trypanosoma cruzi* infection in C57BL/6 mice is related to a delayed specific IgG response and increased macrophage production of pro-inflammatory cytokines. **Life Sci.** v. 77, n. 16, p. 1945-1959, 2005.
- PRIMAVERA, K.S.C.; UMEZAWA, E.S.; PERES, B.A.; CAMARGO, M.E.; HOSHINO-SHIMIZU. Chagas' disease: IgA, IgM and IgG antibodies to *T. cruzi* amastigote, trypomastigote and epimastigote antigens in acute and in different chronic forms of the disease. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** v. 32, n. 3, p. 172-180, 1990.
- PRIMAVERA, K.S.C.; HOSHINO-SHIMIZU, S.; UMEZAWA, E.S.; PERES, B.A.; MANIGOT, D.A.; CAMARGO, M.E. Immunoglobulin A antibodies to *Trypanosoma cruzi* antigens in digestive forms of Chagas' disease. **J Clin Microbiol.** v. 26, n. 10, p. 2101-2104. 1988.
- PYRRHO, A.S.; MORAES, J.L.C.; PEÇANHA, L.M.T.; GATTASS, C.R. *Trypanosoma cruzi*: IgG1 and IgG2b are the main immunoglobulins produced by vaccinated mice. **Parasitol Res.** v. 84, n. 4, p. 333-337, 1998.
- RAMIREZ, L.E.; LAGES-SILVA, E.; SOARES-JUNIOR, J.M.; CHAPADEIRO, E. Experimental hamster infection by *Trypanosoma cruzi*: the chronic phase. **Rev Soc Bras Med Trop.** v. 26, n. 4, p. 253-254, 1993.
- RANDOLPH, D.A.; HUANG, G.; CARRUTHERS, C.J.; BROMLEY, L.E.; CHAPLIN, D.D. The role of CCR7 in TH1 and TH2 cell localization and delivery of B cell help in vivo. **Science.** v. 10, n. 286, p. 2159-2162, 1999.
- REIS, A.B.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; VALE, A.M.; MARQUES, M.J.; GIUNCHETTI, R.C.; MAYRINK, W.; GUERRA, C.C.; ANDRADE, R.A.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; MARTINS-FILHO, O.A. Isotype patterns of immunoglobulins: Hallmarks for clinical status and tissue parasite density in brazilian dogs naturally infected by *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Vet Immunol Immunopathol.** v.112, n. 3-4, p. 102-116, 2006.

- REIS AB, CARNEIRO CM, CARVALHO MG, TEIXEIRA-CARVALHO A, GIUNCHETTI RC, MAYRINK W, GENARO O, CORREA-OLIVEIRA R, MARTINS-FILHO OA. Establishment of a microplate assay for flow cytometric assessment and its use for the evaluation of age-related phenotypic changes in canine whole blood leukocytes. **Vet Immunol Immunopathol.** v.103, n. 3-4, p.173-185; 2005.
- RINKARDT, N.E.; KRUTH, A.S.; KAUSHIK, A. The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs. **Can J Vet Res**, v. 63, n. 1, p. 18-24, 1999.
- ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; WIETZERBIN, J.; SERRA, E.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. Differential susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in BALB/c and C57BL/6 mice is not associated with a distinct parasite load but cytokine abnormalities. **Clin Exp Immunol**, v. 128, n. 3, p. 421-428, 2002.
- ROSEMBERG, G.S.; CHAVES, C.J.; HIGUCHI, M.L.; LOPES, M.B.S.; CASTRO, L.H.M.; MACHADO, L.R. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. **Neurology**, v. 42, n. 3. p. 640-642, 1992.
- ROTTENBERG, M.E.; RIARTE, A.; SPORRONG, L.; ALTCHER, J.; PETRAY, P.; RUIZ, A. M.; WIGZELL, H., ORN, A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. **Immunology Letters**. v. 45, n. 1-2, p. 53-60; 1995.
- SÁ FERREIRA, J.A.; GALVÃO-CASTRO, B.; MACEDO, W.; CASTRO, C. Immunoglobulin and other serological parameters in Chagas' disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. **Clin Exp Immunol.** v. 52, n. 2, p. 266-270, 1983.
- SANTOS, V.R.L. Distribuição de macrófagos e alterações teciduais no coração e na medula espinhal de cães inoculados com as formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice 78 do *Trypanosoma cruzi* submetidos à imunossupressão durante a fase aguda. Dissertação de Mestrado, Pós Graduação em Ciências Biológicas, UFOP, 2006.
- SHIKANAI-YASUDA, M.A.; MARCONDES, C.B.; GUEDES, L.A.; SIQUEIRA, G.S.; BARONE, A.A.; DIAS, J.C.; AMATO NETO, V.; TOLEZANO, J.E.; PERES, B.A.; ARRUDA JUNIOR, E.R.; et al. Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 33, n.5, p. 351-357, 1991.
- SMITH, K.M.; POTTAGE, L.; THOMAS, E.R.; LEISHMAN, A.J.; DOIG, T.N.; XU, D.; LIEW, F.Y.; GARSIDE, P. Th1 and Th2 CD4+ T cells provide help for B cell clonal expansion and antibody synthesis in a similar manner in vivo. **J Immunol.** v. 165, n. 6, p.3136-3144, 2000.

- SINAGRA, A.; RIARTE, A.; LAURICELLA, M.; SEGURRA, E.L. Reactivation of experimental chronic *T cruzi* infection after immunosuppressive treatment by cyclosporine A and betametason. **Transplantation**. v. 55, n. 6, p. 1431-1434; 1993.
- SOLARI, A.; SAAVEDRA, H.; SEPÚLVEDA, C.; ODDÓ, D.; ACUÑA, G.; LABARCA, J.; MUÑOZ, S.; CUNY, G.; BRENGUES, C.; VEAS, F.; BRYAN, R.T. Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with hemophilia and AIDS. **Clin Infect Dis**. v.16, n. 2, p. 255-259, 1993.
- STEFANI, M.M.; TAKEHARA, H.A.; MOTA, I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Immunol Lett** . v. 7, n. 2, p. 91-97; 1983.
- TARLETON, R.L.; GRUSBY, M.J.; POSTAN, M.; GLIMCHER, L.H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cell in immune resistance and disease. **International Immunology**. v. 8, n. 1, p.13-22, 1996.
- TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**. v. 356, n. 6367, p.338-40, 1992.
- TARLETON, R.L. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. **Res Immunol**. v.142, n. 2, p. 130-133, 1991.
- TEIXEIRA, A.R.; CUNHA-NETO, E.; RIZZO, L.V.; SILVA, R. Trypanocidal nitroarene treatment of experimental *Trypanosoma cruzi* infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits. **J Infect Dis**. v. 162, n. 6, p. 1420, 1990.
- TOSTES, J.R.S.; LOPES, E.R.; PEREIRA, F.E.L.; CHAPADEIRO, E. Miocardite chagásica crônica humana: estudo quantitativo dos linfócitos CD4⁺ e dos CD8⁺ no exsudato inflamatório. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 27, n. 3, p. 127-134, 1994.
- VAIDIAN, A.K.; WEISS, L.M.; TANOWITZ, H.B. Chagas' disease and AIDS. **Kinetoplastid Biol Dis**. v.3, n. 1, p. 2. 2004.
- VITELLI-AVELAR, D.M.; SATHLER-AVELAR, R.; MASSARA, R.L.; BORGES, J.D.; LAGE, P.S.; LANA, M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; DIAS, J.C, ELOI-SANTOS, S.M.; MARTINS-FILHO, O.A. Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4+CD25high T cells balancing activated CD8+ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin Exp Immunol**. v. 145, n. 1, p. 81-92, 2006.
- VOLLER, A.; BIDWELL, W.H.; ARJONA, I. The enzyme linked immunosorbent assay (ELISA): a guide with abstracts of microplate applications. **Guerney: Dynatec Europe**, p. 124; 1979.

WORLD HEALTH ORGANIZATION /TDR, Scientific Working Group on Chagas Disease, Buenos Aires, Argentina. 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION/TDR. Strategic Direction for Research. 2002

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the Scientific Working Group on the Development and Evaluation of Animal Models for Chagas' Disease. **Genebra**. 1984.

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)