

Juliana Reis Machado

Avaliação de citocinas em diferentes linhagens de
camundongos infectados com as cepas Y e Colombiana
de *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Geral”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dra. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Co-Orientadores: Prof. Dr. Virmondes Rodrigues Jr.

Prof. Dr. Javier Emilio Lazo Chica

Uberaba-MG

Junho - 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

Dedicatória

*À Deus,
Minha Família,
Marcos Vinícius,
A todos que contribuíram para confecção deste trabalho.*

*“Amo as dificuldades, as impossibilidades.
Amo, sobretudo a vida e acredito
que a produção, seja qual for,
é sempre preferível
ao repouso.”
(Émile Zola)*

À minha Família,

*Meu pai Luiz Cláudio Machado e sua esposa Fernanda
Cristina Gonzaga;*

*Minha mãe Eliane Cristina dos Reis e seu esposo Jânio
Costa Rodrigues;*

*Aos meus Irmãos Ícaro, Tassiana, Lucas, Joaquim Neto
e Matheus*

*“Existem homens que lutam um dia e são bons,
outros que lutam um ano e são melhores.
Porém existem os que lutam toda a vida.
Estes são imprescindíveis”
(Bertolt Brecht)*

Ao Marcos Vinícius da Silva,

*Pela imensa colaboração neste trabalho,
Pelo amor e companheirismo incondicional.*

*“A suprema felicidade da vida é a convicção
de ser amado por aquilo que você é,
ou mais corretamente de ser amado,
apesar daquilo que você é.”
(Victor Hugo)*

Agradecimentos

Aos meus orientadores Denise Bertulucci e Virmondes Rodrigues pela oportunidade de fazer parte de seu grupo de trabalho e pela capacidade de ensinar e mostrar como a pesquisa científica é fascinante.

Minha eterna gratidão!

*"Se o conhecimento pode criar problemas,
não é através da ignorância que
podemos solucioná-los."
(Isaac Asimov)*

Agradecimentos

*À professora Marlene Antônia dos Reis
por me ensinar como deve ser um mestre e
por seus conselhos valiosos que representam ensinamentos
para toda a vida.*

*Não podemos escolher como vamos morrer.
Ou quando. Podemos somente
decidir como vamos viver."
(Joan Baez).*

Agradecimentos

Aos amigos e colaboradores desse trabalho: Cláudia Renata Bibiano Borges, Lúcio Roberto Castellano, Marcos Vinícius da Silva. Divido com vocês todo mérito dessa produção: obrigada pela imensa ajuda!

Ao professor Javier Lazo pela imensa colaboração e paciência em ensinar-me técnicas experimentais.

À minha grande amiga Eliângela de Castro Cobô pelo incentivo constante.

À professora Ana Carolina Faleiros pela amizade e credibilidade a mim dispensada.

Aos amigos da imunologia: Amanda, Beatriz, Betânia Ribeiro, Betânea Peghini, Carlos Mota, Carla Sandrina, professora Cristina Cardoso, Cristina Wide, Francielle, Jéssica, Karine Rezende, Lilian Borges, Mauricio Llaguno, Mônica Sawan, Patrícia Reis, Polyanna Miranda, Rafael Faria, Taciana Cristina, Thaís Farnesi, Thiago Costa, pelo ótimo convívio e troca de experiência durante estes anos.

Aos amigos da Parasitologia: César Gomes, Elaine Bento e Tatiane Marques pela troca de experiências.

Às amigas Débora Tavares e Camila Cavellani e Camilla Christian pelo carinho e companheirismo.

Aos meus colegas de pós graduação: Ana Paula Espíndula, Camila Souza, Humberto, Janaína Pacheco, Laura Penna e Livia Helena, pelo apoio constante.

A todos os técnicos da disciplina de Patologia Geral, representados pelo Edson, Elenemar, Liliane, Soninha e Vandair: obrigada pela valiosa ajuda no processamento e confecção das lâminas para realização deste trabalho.

Aos alunos de iniciação científica Diego Costa e Precil Miranda pela amizade e auxílio.

Aos funcionários da disciplina de Biologia celular, representados pelo João Batista e Alex Pacheco pelo auxílio na manutenção dos animais utilizados neste trabalho.

Aos técnicos da Patologia Especial: Anuska, Cida Martins, Daniela, Juliano e Luzia, pelo carinho com que sempre me acolheram.

Às funcionárias da pós-graduação Denise Teresinha e Nelma Aparecida pela presteza.

Aos órgãos de fomento, CAPES, FUNEPU e CNPq, pelo auxílio financeiro para realização desse trabalho.

A UFTM pela oportunidade de fazer parte dessa comunidade.

SUMÁRIO

1. Introdução.....	18
1.1. Doença de Chagas.....	18
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2.1. Cepas de <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.3. O modelo murino e o <i>Trypanosoma cruzi</i>	20
1.4. Mecanismos de patogênese: parasitismo, inflamação e fibrose.....	22
1.5. A Resposta Imune	25
1.5.1. Sistema imune e Doença de Chagas Experimental	25
1.5.2. Mediadores da resposta imune: Citocinas e Óxido Nítrico na Doença de Chagas Experimental	26
2. Justificativa.....	30
3. Hipótese.....	31
4. Objetivo Geral	32
4.1. Objetivos específicos	32
5. Casuística e Métodos.....	33
5.1. Casuística	33
5.2. Confirmação da Infecção dos animais – Parasitemia	33
1.3. Aspectos éticos	34
1.4. Obtenção do <i>Trypanosoma cruzi</i> para inóculo em camundongos	35
1.5. Obtenção de antígenos de <i>Trypanosoma cruzi</i> para cultura de células do baço	35
1.6. Cultura de células esplênicas	35
5.7. Dosagem de citocinas por ELISA dos sobrenadantes de cultura de células do baço	36
5.8. Processamento das lâminas.....	37
5.9. Quantificação do infiltrado inflamatório	37
5.10. Quantificação da Fibrose.....	39
5.11. Imunohistoquímica.....	40

5.12.	Densidade Parasitária	41
5.13.	Análises estatísticas.....	41
6.	Resultados	42
6.1.	Ninhos de Amastigotas	42
6.2.	Infiltrado infamatório.....	43
6.3.	Fibrose	44
6.4.	Produção de Citocinas	45
7.	Discussão.....	51
8.	Considerações Finais.....	57
9.	Conclusões	58
	Referências	59

LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus célsius

Ag-Tc – Antígeno de *Trypanosoma cruzi*

CD – Grupamento de diferenciação

CO₂ – Dióxido de carbono

COBEA – Conselho brasileiro de experimentação animal

ConA – Concanavanina A

DNA – Ácido desoxiribonucléico

DTUs - *Discrete Typing Unit*

ELISA – Ensaio imunoenzimático

FBS – Soro fetal bovino

Fc – Fração cristalizante de imunoglobulina

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

HCl – Ácido clorídrico

Hepes – Ácido 4-(2-hidroxietil)-1-piperazineetanosulfônico

IFN- γ – Interferon gama

IgG – Imunoglobulina G

IL - Interleucina

iNOS – Óxido nítrico sintase induzível

iNOS^{-/-} - Nocaute para o gene da enzima Óxido nítrico sintase induzível

LPS - Lipopolissacarídeo

M - Molar

MG - miligrama

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

mL - mililitro

mm - milímetro

mM -Milimolar

mm² – milímetros quadrados

NK – Linfócito *Natural Killer*

nm - nanômetros

NO – Óxido nítrico

NO₂ - Nitrato

NO₃ - Nitrito

NOS – Óxido nítrico sintase

OMS – Organização Mundial de Saúde

Pb – Pares de bases

PBS – Solução salina tamponada com fosfato

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pg/mL – picogramas por microlitro

RAG – Gene ativador de recombinação

RPMI – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*

rRNA – RNA ribossômico

TGF- β – Fator de crescimento e transformação beta

Th – Linfócito T auxiliar

TMB – Tetra-Metil-Benzidina

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Treg – Linfócito T regulador

TRIS – tris (hidroximetil) aminometano

UI – Unidades Internacionais

XG/min – força gravitacional por minuto

μ l - microlitro

μ m - micrômetros

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da casuística conforme grupo de animais, cepa e fase da infecção33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfometria para quantificação de infiltrado inflamatório.	38
Figura 2 - Infiltrado inflamatório no tecido cardíaco segundo critério de Dallas.	39
Figura 3 - Sistema computadorizado de quantificação de fibrose. Morfometria computadorizada microscópica automática.	40
Figura 4 - Sistema de quantificação da área do tecido cardíaco.	41
Figura 5 - Ninhos de <i>T. cruzi</i> no tecido cardíaco de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-}	42
Figura 6 – % de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-}	43
Figura 7 - % de Fibrose no tecido cardíaco de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-}	44
Figura 8 - Níveis de IFN- γ (pg/mL) em sobrenadantes de cultura do baço de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-} não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de <i>T.cruzi</i> (Ag-Tc).	46
Figura 9 - Níveis de TNF- α (pg/mL) em sobrenadantes de cultura do baço de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-} não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de <i>T.cruzi</i> (Ag-Tc).	47
Figura 10 - Níveis de IL-4 (pg/mL) em sobrenadantes de cultura do baço de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-} não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de <i>T.cruzi</i> (Ag-Tc).	48
Figura 11 - Níveis de IL-10 (pg/mL) em sobrenadantes de cultura do baço de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-} não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de <i>T.cruzi</i> (Ag-Tc).	49

PRANCHAS

Prancha 1 - Cortes histológicos de coração de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS ^{-/-} :	50
---	----

RESUMO

A Doença de Chagas é resultante da infecção pelo *T. cruzi*. Este protozoário é constituído de cepas ou subespécies com comportamentos peculiares. As cepas Y e Colombiana são consideradas cepas polares, levando-se em conta sua morfologia e tropismo tissular. Os camundongos C57Bl/6 e BALB-c são amplamente utilizados para avaliação da imunopatogênese e mediadores envolvidos na resposta imune frente a parasitas intracelulares. O papel das citocinas e do Óxido Nítrico na infecção Chagásica ainda não foram totalmente elucidados. No presente estudo foram avaliados os animais; BALB-c; C57Bl/6 e C56Bl/6 iNOS^{-/-}, sendo 5 animais de cada grupo para cada uma das cepas, Y e Colombiana, na fase aguda (15 dias) e na fase crônica (90 dias) da infecção experimental. Foram analisados no tecido cardíaco a presença ninhos de *T. cruzi*, infiltrado inflamatório e fibrose. Células do baço foram utilizadas para cultura e posterior avaliação da produção de citocinas pela técnica de ELISA. Observou-se que os animais C57Bl/6 apresentaram número significativamente maior de ninhos na fase aguda com ambas as cepas, que os animais BALB-c ($p=0,008$ e $p=0,001$; Mann Whitney) e quantidade significativamente menores de ninhos que o C57Bl/6 iNOS^{-/-} na infecção com a cepa Colombiana ($p=0,001$; Mann Whitney). Os animais C57Bl/6 apresentaram infiltrado inflamatório significativamente menores na infecção com a cepa Y ($p=0,004$; Mann Whitney), contudo, na infecção com a cepa Colombiana, esses, apresentaram infiltrado cardíaco significativamente maiores que os animais BALB-c na fase crônica da infecção ($p=0,008$; Mann Whitney). Os C57Bl/6 iNOS^{-/-} não apresentaram diferença significantes. A fibrose foi significativamente maior nos animais BALB-c tanto na fase aguda, como na fase crônica na infecção pela cepa colombiana ($p=0,0135$ e $p=0,0004$; “t” não pareado). Em relação à produção de citocinas os animais C57Bl/6 apresentaram níveis significativamente maiores de IFN- γ após a infecção pela cepa Y, enquanto que, a infecção com a cepa colombiana, esses níveis foram significativamente maiores nos animais BALB-c. A IL-4 foi significativamente maior nos animais C57Bl/6, tanto na fase aguda, como na fase crônica nas duas cepas utilizadas. Os níveis de TNF- α foi significativamente maiores nos animais BALB-c infectados com a cepa Colombiana. A IL-10 foi significativamente maior tanto na fase aguda, como na fase crônica nos animais C57Bl/6 em relação aos BALB-c, e os animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} apresentaram níveis significativamente maiores de IL-10 que os animais C57Bl/6 em todas as condições de cultura. Portanto, o maior comprometimento cardíaco nos animais BALB-c em relação ao C57Bl/6, é provavelmente reflexo do desequilíbrio entre citocinas pro-inflamatórias e anti-inflamatórias, sendo mais evidente na infecção com a cepa Colombiana. A ausência do óxido nítrico parece não influenciar diretamente no desenvolvimento das lesões cardíacas experimental.

Palavras Chaves: *T. cruzi*, Camundongos, fibrose, citocinas.

ABSTRACT

Chagas' disease is resulting from infection by *T. cruzi*. This parasite is composed of strains or subspecies presenting peculiar behaviors. Y and Colombian strains are considered polar, taking into account their morphology and tissue tropism. The C57Bl/6 and BALB-c mice are widely used to evaluate the immunopathogenesis and mediators involved in immune response against intracellular parasites. The role of cytokines and nitric oxide in Chagasic infection has not been fully elucidated. In this study we evaluated BALB-c, C57Bl/6 and C56Bl/6 iNOS^{-/-} mice, 5 mice from each group were inoculated with Y strain and 5 mice with Colombian strain, in acute phase (15 days) and in chronic phase (90 days) of experimental infection. We analyzed the presence of *T. cruzi* nests, inflammatory infiltrate and fibrosis in cardiac tissue. Spleen cells were used for cultivation and subsequent assessment of cytokine production by ELISA on supernatants. It was observed that the C57Bl/6 showed a significantly higher number of nests in the acute phase with both strains than BALB-c mice (p=0.008 and p=0.001; Mann Whitney) and significantly lower amount of nests than C57Bl/6 iNOS^{-/-} in infection with the Colombian strain (p = 0.001 Mann Whitney). Animals C57Bl/6 showed significantly less inflammatory infiltrate in infection with Y strain (p = 0.004, Mann Whitney), however, infection with the Colombian strain, they showed significantly higher cardiac infiltrate than BALB-c in the chronic phase infection (p= 0.008, Mann Whitney). The C57Bl/6 iNOS^{-/-} showed no significant difference. Fibrosis was significantly higher in BALB-c both in acute as in chronic phase of infection in the Colombian strain (p=0,0135 e p=0,0004; unpaired t test). Regarding cytokine production in the C57Bl/6 had significantly higher levels of IFN- γ after infection by Y strain, while infection with the Colombian strain, these levels were significantly higher in BALB-c. IL-4 was significantly higher in C57Bl/6, both in acute as in chronic phase, with both strains used. The levels of TNF- α was significantly higher in BALB-c mice infected with the Colombian strain. IL-10 was significantly higher in acute phase and chronic phase in C57Bl/6 mice compared to BALB-c; C57Bl/6 iNOS^{-/-} had significantly higher levels of IL-10 than C57Bl/6 mice in all culture conditions. Therefore, the major cardiac involvement in BALB-c compared to C57Bl/6 is probably a result of an imbalance between pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines, being more evident in infection with the Colombian strain. The absence of nitric oxide appears to directly influence the development of experimental heart injuries.

Keywords: *T. cruzi*, mice, fibrosis, cytokines.

1. Introdução

1.1. Doença de Chagas

A tripanossomíase americana, posteriormente denominada Doença de Chagas em homenagem ao seu descobridor Carlos Chagas, é uma importante doença parasitária resultante da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), tendo os insetos triatomíneos como vetores (CHAGAS, 1909).

Estima-se que existam cerca de 12-14 milhões de indivíduos infectados na América Latina, sendo ainda encontrados casos em países da Europa e América do Norte, resultantes da migração de indivíduos infectados em busca de melhores condições de vida. Estes dados indicam a importância social da Doença de Chagas 100 anos após sua descoberta (DIAS, 2007).

Ainda que iniciativas da OMS (organização mundial de saúde) e de governos da América Latina tenham levado ao controle na transmissão vetorial da doença em diversas áreas endêmicas pelo seu principal vetor, o *Triatoma infestans*, a inexistência de vacina e de tratamento eficaz, principalmente para os pacientes com a forma crônica da doença, são ainda desafios a serem enfrentados (COURA & DIAS, 2009).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi*, agente etiológico da Doença de Chagas, é um protozoário flagelado pertencente à ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Apresenta durante seu ciclo de vida três formas distintas:

- Tripomastigota metacíclica, encontrada no intestino posterior do inseto triatomíneo, ao fim do desenvolvimento do parasito, no interior da célula do hospedeiro vertebrado, imediatamente antes da lise celular e também na corrente sangüínea;
- Amastigota, encontrada no interior das células dos hospedeiros vertebrado;
- Epimastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e também na maior parte das culturas axênicas (ANDRADE *et al.*, 2000).

O ciclo da infecção no hospedeiro vertebrado tem início quando o inseto libera a forma infectante nas fezes durante o repasto sanguíneo. Essas formas, tripomastigotas metacíclicas, penetram ativamente em qualquer célula do organismo e diferenciam-se em formas amastigotas intracelulares, encurtando seu flagelo e incorporando-o ao seu corpo. É

capaz de destruir a membrana do vacúolo parasitóforo e ficar livre no citoplasma da célula. Após um período de 35 horas de latência o parasita começa uma fase de divisão binária que ocorre por vários dias, sendo que, após cinco dias, existem cerca de 500 amastigotas no interior da célula. Começa então, o processo de diferenciação de amastigotas em tripomastigotas sanguíneas, que sob esta forma, rompem a célula hospedeira, invadem as células vizinhas ou caem na corrente circulatória dando início ao novo ciclo (ANDRADE *et al.*, 2000).

O *T. cruzi* é um parasito polimórfico e a estrutura de suas diversas cepas está longe de ser entendida. Até o fim dos anos 80 a idéia prevalente era de que as cepas de *T. cruzi* não poderiam ser subdivididas em poucos grupos que pudessem representar tal grupo taxonômico (MOREL *et al.*, 1980; TIBAYRENC *et al.*, 1986). Essa heterogeneidade genética entre cepas foi, inicialmente, estudada através da análise de padrões isoenzimáticos (zimodemas), o que resultou em um grande número de grupos ou linhagens (ROMANHA *et al.*, 1979; MILES *et al.*, 1980; TIBAYRENC & BRENIERE, 1988), e biodemas (ANDRADE; ANDRADE & MAGALHÃES, 1997). Ao contrário da diversidade sugerida pelas análises isoenzimáticas, a amplificação por PCR de um domínio divergente de 100pb do gene de rRNA 24S alfa indicou a presença de dimorfismo entre as cepas de *T. cruzi* provenientes de hospedeiros vertebrados e invertebrados (SOUTO & ZINGALES, 1993). A amplificação por PCR de uma região intergênica do gene mini-exon com um conjunto específico de iniciadores permitiu a divisão dos isolados de *T. cruzi* nos grupos 1 e 2, que se correlacionam com o dimorfismo no gene de rRNA (SOUTO *et al.*, 1996), o que já havia sido sugerido em estudos prévios (MACEDO *et al.*, 1992) e observado posteriormente (ZINGALES *et al.*, 1998; MACEDO *et al.*, 2004). Em 1999, numa tentativa de homogeneizar a nomenclatura, o grupo 1 foi renomeado linhagem *T. cruzi* II (ciclo doméstico), enquanto o grupo 2 foi designado linhagem *T. cruzi* I (ciclo silvestre) (ZINGALES *et al.*, 1999). Entretanto, observou-se que, dentre as cepas avaliadas, algumas não se enquadram completamente em nenhuma das duas linhagens, o que sugere a existência de um terceiro grupo (SOUTO *et al.*, 1996). Em 2000, foi proposta a subdivisão da linhagem *T. cruzi* II em sublinhagens IIa, IIb, IIc, IId e IIe (BRISSE *et al.*, 2000). Mais recentemente, a análise de polimorfismos de um único nucleotídeo do gene *MHS2* de *T. cruzi* veio sustentar a hipótese da existência de três linhagens filogenéticas (I, II, III) (AUGUSTO-PINTO *et al.*, 2003; DE FREITAS *et al.*, 2006). Em 2009, foi reconhecido que a nomenclatura das cepas de *T. cruzi* deve ser classificada em seis DTUs (discrete typing units), denominadas de Tc I a Tc VI (ZINGALES *et al.*, 2009).

1.2.1. Cepas de *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* constitui-se de cepas ou subespécies com comportamentos peculiares, especialmente quando utilizados em modelos experimentais. As cepas Y e Colombiana são descritas como cepas polares, considerando seus aspectos morfológicos, tropismo tissular e parasitemia (BRENER & CHIARI, 1963; BRENER, 1965).

A cepa Y, pertencente ao grupo *T. cruzi* II (ZINGALES *et al.*, 2009), foi isolada por Silva e Nussenzweig de uma paciente japonesa, sendo posteriormente estudada e mantida em laboratório por Pedreira de Freitas em 1953, no hospital da USP de Ribeirão Preto, São Paulo, Brasil (PACKCHANIAN, 1934; FREITAS *et al.*, 1953). Esta cepa foi mantida por dezesseis anos no setor de parasitologia através de passagens sucessivas de camundongo a camundongo (PACKCHANIAN, 1934). Existem muitas controvérsias quanto sua virulência, já tendo sido sugerido que a cepa Y seja avirulenta (MENEZES, 1968). Entretanto, outros trabalhos observaram parasitismo dos macrófagos em vários setores do organismo e na fase mais avançada da infecção aguda observa-se evidente miotropismo, lesões inflamatórias de miocárdio, músculo esquelético e músculo liso das paredes intestinais, com envolvimento de plexos mioentéricos e lesões neurais (ANDRADE & SILVA, 1995).

A cepa Colombiana pertencente ao grupo de *T. cruzi* I (ZINGALES *et al.*, 2009), foi isolada de um caso humano na Colômbia e esta, tem sido utilizada em investigações experimentais (FEDERICI *et al.*, 1964). Essa cepa apresenta parasitemia de evolução lenta, nítido miotropismo, sobretudo, com envolvimento de musculatura esquelética, desenvolvendo extensas lesões de fibras musculares esqueléticas, intenso processo inflamatório e lesões miocárdicas proeminentes (ANDRADE *et al.*, 2000). Em trabalhos experimentais essa cepa demonstrou maior capacidade de atravessar a barreira gástrica e produzir infecção mais intensa em camundongos, quando comparadas às outras cepas (ANDRADE, 1990). Outra característica da cepa Colombiana, assim como, todas as cepas do biodema tipo III é a sua resistência à quimioterapia com Benzonidazol e Nifurtimox (ANDRADE *et al.*, 1985).

1.3. O modelo murino e o *Trypanosoma cruzi*

O camundongo (*Mus domesticus domesticus*) é um modelo experimental amplamente utilizado na pesquisa de doenças infecciosas. A Doença de Chagas no modelo murino manifesta-se de forma semelhante à observada na infecção em humanos, sendo influenciada pelo background genético e pela cepa infectante, desenvolvendo uma variedade de quadros que na sua grande maioria são acompanhados de uma fase aguda sintomática que evolui para

1 a fase crônica. Assim como no homem, na infecção murina o *T. cruzi* infecta quase todos os
2 tipos celulares, sendo de maior importância os da musculatura cardíaca e da musculatura
3 esquelética (BRENER, 1973; BURLEIGH & ANDREWS, 1995).

4 Os padrões de resistência e susceptibilidade a infecção pelo *T. cruzi* foram
5 amplamente estudados no que se refere ao camundongo. Nos camundongos susceptíveis se
6 observa um elevado índice de parasitemia e, na sua grande maioria, sucumbem precocemente
7 à infecção aguda (ARAÚJO-JORGE & CASTRO, 2000). No outro extremo, encontram-se os
8 camundongos considerados resistentes, que majoritariamente e, dependendo do inóculo,
9 desenvolvem baixos índices de parasitemia e mortalidade (ARAÚJO-JORGE & CASTRO,
10 2000). Embora nenhum gene principal tenha sido identificado, vários autores têm sugerido a
11 influência da variabilidade dos camundongos na resistência ou suscetibilidade à infecção por
12 *T. cruzi* (TRISCHMANN *et al.*, 1978; MOREL *et al.*, 1980; TRISCHMANN & BLOOM,
13 1982; WRIGHTSMAN *et al.*, 1982; ROWLAND *et al.*, 1992). Entre estes, temos a linhagem
14 C57Bl/6 e, em grau intermediário, encontram-se o BALB-c e o CBA. Além disso, nos
15 camundongos que sucumbem à fase aguda, o tratamento quimioterápico específico com
16 Benzonidazol permite que haja tempo suficiente para montar uma resposta imune efetora
17 adequada, de tal forma que, o animal passa a controlar a fase aguda, sobrevivendo e passando
18 para as fases indeterminada ou crônica (GRISSOTO, 1998).

19 Vários estudos vêm sendo feitos para comparar o perfil imunológico frente à infecção
20 com *T. cruzi* em diferentes camundongos. Camundongos BALB-c e C57Bl/6 foram
21 imunizados com cruzipaina, resultando no aumento da produção de citocinas do padrão Th2
22 nos animais BALB-c, e em contrapartida, os animais C57Bl/6 produziram citocinas do perfil
23 Th1 (SAVINO *et al.*, 2007). Em outro estudo, com as mesmas linhagens, os BALB-c se
24 mostraram mais susceptíveis quando infectados com a cepa Peruana de *T. cruzi*
25 (WRIGHTSMAN *et al.*, 1982).

26 Com o intuito de estudar mais detalhadamente as alterações na patogênese da Doença
27 de Chagas, pesquisadores têm investido em animais geneticamente modificados. Os primeiros
28 animais usados com essa finalidade foram os camundongos “Biozzi”: esses foram
29 selecionados quanto à alta e baixa produção de anticorpos por cruzamento e retrocruzamento
30 (KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976). Posteriormente foram desenvolvidos os animais
31 deficientes no componente C5 do Sistema Complemento (DALMASSO & JARVINEN,
32 1980) e os animais atímicos, denominados Nude para avaliar o papel das células T
33 (GONCALVES DA COSTA *et al.*, 1984). Atualmente, com a finalidade de avaliar o papel do
34 óxido nítrico (NO) no estudo da Doença de Chagas experimental vários pesquisadores têm

utilizado animais deficientes na enzima iNOS (VESPA *et al.*, 1994; BORGES *et al.*, 2009). Têm-se percebido que a ausência dessa enzima tem um papel crucial na resistência dos animais durante a infecção pelo *T. cruzi* (VESPA *et al.*, 1994; HOLSCHER *et al.*, 1998).

1.4. Mecanismos de patogênese: parasitismo, inflamação e fibrose

Diversos fatores atuam na patogênese da Doença de Chagas, determinando uma maior ou menor incidência de infiltrado inflamatório e de destruição tissular. Entre estes, alguns são inerentes ao *T. cruzi*, ligados ao seu polimorfismo, tropismo e constituintes antigênicos e outros estão relacionados ao hospedeiro, como constituição genética, idade, sexo, entre outros. Nota-se que os fatores patogênicos são múltiplos e em grande parte desconhecidos (TAFURI, 1987).

Foram propostas teorias para tentar esclarecer porque o coração é alvo de tão grave agressão e porque apenas alguns indivíduos desenvolvem a cardiopatia. Margarino Torres foi o primeiro, em 1929, a levantar a hipótese de que na cardiopatia chagásica, poderiam ocorrer fenômenos de hipersensibilidade envolvidos na gênese dessa lesão. A participação de mecanismos auto-imunes tem sido também postulada como causa da miocardite chagásica crônica (KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976; ANDRADE, 1983; RIBEIRO-DOS SANTOS & ROSSI, 1985). Atualmente quatro mecanismos principais são definidos como responsáveis pelo desenvolvimento das formas clínicas da Doença de Chagas, sendo eles: agressão dependente do parasito, alterações do sistema nervoso autônomo, agressão imunomediada com processos inflamatórios nos tecidos e aparente ausência de parasitos e alterações microvasculares (MARIN-NETO *et al.*, 2007). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar como a resposta imune poderia determinar a disfunção dos órgãos atingidos, estes incluem: I - a destruição direta do tecido muscular, II - perda de função muscular conseqüente à desnervação local, III - agregação plaquetária intravascular geradora de microinfartos, entre outros (TARLETON *et al.*, 1997).

O curso clínico-patológico da doença consta de duas fases: aguda e crônica. Dependendo de fatores inerentes ao parasito ou ao hospedeiro, a miocardite aguda pode evoluir de vários modos, agravando-se devido à intensidade e a qualidade do exsudato inflamatório (TAFURI, 1987). A fase aguda pode ser ou não sintomática, e nessa fase a doença não é diagnosticada na maioria dos pacientes (RASSI, 1979). Após 30 a 60 dias de infecção, a parasitemia normalmente regride em virtude da resposta imune, mas o parasito não é totalmente eliminado. A fase aguda é seguida por um longo período de latência, (LOPES &

CHAPADEIRO, 1997), que apresenta, à autópsia, coração com parasitismo raro, inflamação discreta e fibrose ausente ou cicatricial (LOPES *et al.*, 1981).

Durante a fase crônica, ocorre a forma indeterminada, que tem seu início de dois a quatro meses após a infecção (PRATA, 1990), podendo os indivíduos permanecerem indefinidamente neste estágio (DIAS, 1989; PRATA, 1990). A fase crônica é caracterizada pela parasitemia baixa e por elevados níveis de anticorpos circulantes (FRAGATA, 1995). Na fase crônica, na forma indeterminada, as lesões são caracterizadas por epicardite crônica, com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, que acomete também o tecido gorduroso subepicárdico, estendendo aos gânglios e miocardite focal discreta com exsudação de células mononucleadas entre miocardiócitos, ou então, formando pequenos nódulos, que lembram granulomas. Os fenômenos regressivos dos miocardiócitos são muito discretos e praticamente não há fibrose, a não ser pequenos focos de tipo cicatricial (LOPES *et al.*, 1981). A maioria dos autores, tem demonstrado em estudos de biópsias endomiocárdicas, que chagásicos na forma indeterminada apresentam inflamação no tecido cardíaco (MADY & PEREIRA BARRETTO, 1981). O que diferencia estes achados daqueles observados em cardiopatas é a intensidade do processo inflamatório que é menor no grupo assintomático (LOPES *et al.*, 1981). Na forma cardíaca, ocorre principalmente miocardite crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração (FERRAZ *et al.*, 2007).

A miocardite é um dos principais processos patológicos observados na Doença de Chagas, ocorrendo tanto na fase aguda como na fase crônica, sendo nesta última, relatada como desproporcional em relação ao parasitismo tecidual (BRENER *et al.*, 2000). Embora ainda existam controvérsias, desde o início do século passado, os autores chamaram atenção para o fato de o infiltrado inflamatório parecer mais lesivo para as fibras cardíacas do que para os próprios parasitas (VIANA, 1911; HIGUCHI *et al.*, 1997). Nesta fase, a miocardite é caracterizada fundamentalmente por um infiltrado de células mononucleares, destruição de fibras miocárdicas no foco inflamatório, áreas de fibrose e raros parasitos nas lesões (BRENER *et al.*, 2000). Dados experimentais indicaram que a destruição de fibras cardíacas em pacientes chagásicos poderia ser mediada por mecanismos estabelecidos logo após a infecção com *T. cruzi* e que seriam perpetuados pela contínua estimulação antigênica durante o curso da doença (SANTOS-BUCH & TEIXEIRA, 1974).

A hipótese mais aceita para explicar a existência de inflamação no coração, tubo digestivo, e outros órgãos lesados seria a de uma reação inflamatória frente aos parasitas que colonizam estes órgãos. Nesta perspectiva, as lesões crônicas seriam geradas por uma contínua destruição do tecido infectado através de uma resposta inflamatória induzida pelo *T.*

cruzi e mediada por clones linfocitários específicos para o parasita (ZHANG & TARLETON, 1999).

Entretanto, a ausência de ninhos nas proximidades dos infiltrados levantou a hipótese da reação inflamatória não ser mediada por clones linfocitários específicos para o parasita, mas sim, por clones auto-reativos que reconheceriam antígenos próprios. Desta forma, o processo inflamatório crônico e a conseqüente destruição tissular passaram a ser considerados como resultado de um processo autoagressivo (GIRONES & FRESNO, 2003; LEON & ENGMAN, 2003). No contexto de autoimunidade, diversos antígenos tissulares foram descritos nas duas últimas décadas como elementos alvo dos linfócitos T e B autorreativos, e diversos mecanismos, não excludentes, foram propostos como responsáveis pela indução de autorreatividade (LEVITUS *et al.*, 1991). Assim, foi sugerido que a perda de tolerância às estruturas próprias durante a infecção pelo *T. cruzi* seria o resultado: I - da persistente resposta inflamatória local; II - da intensa ativação policlonal dos linfócitos nas fases aguda e crônica (MINOPRIO *et al.*, 1989a; MINOPRIO *et al.*, 1989b; VAN VOORHIS & EISEN, 1989); III - da reatividade cruzada entre o parasita e antígenos próprios órgãos-específicos (SADIGURSKY *et al.*, 1982; CUNHA-NETO *et al.*, 1995). A hipótese de autoagressão foi considerada durante algumas décadas como a mais provável para explicar a patologia chagásica (RIBEIRO-DOS SANTOS & ROSSI, 1985).

Entretanto, foi reavaliada a participação do parasita como elemento alvo dos processos inflamatórios tissulares. Isto foi resultado dos avanços tecnológicos que permitiram a detecção *in situ* de antígenos ou DNA do parasita. Assim, estudos em humanos mostram que a intensidade da miocardite se correlaciona diretamente com os níveis de antígenos de *T. cruzi* no coração (HIGUCHI *et al.*, 1997). Por outro lado, utilizando técnicas de PCR foi detectada a presença do *T. cruzi* no esôfago unicamente naqueles pacientes chagásicos que apresentavam um quadro clínico de patologia digestiva (VAGO *et al.*, 1996).

A miocardite chagásica crônica apresenta-se como um processo dinâmico, o qual se reativa periodicamente em focos que evoluem para a fibrose, podendo-se observar lesões em diferentes fases de evolução (ANDRADE *et al.*, 2000). A fibrose é proeminente, e todos os tipos de padrão de fibrose descritos (focal, difuso, intersticial, perivascular e plexiforme) podem ser encontrados, até mesmo em um mesmo corte histológico (JU & DIXON, 1996).

Embora os mecanismos envolvidos na formação da fibrose tenham sido pouco estudados na Doença de Chagas, estudos experimentais têm revelado a participação de colágenos dos tipos III e I, mas com uma quantidade bem aumentada de colágeno do tipo IV e da fibronectina (ANDRADE *et al.*, 1989). Experimentalmente, foi demonstrada regressão de

fibrose miocárdica após tratamento curativo parasitologicamente (ANDRADE *et al.*, 1991). A fibrose contribui para a rigidez miocárdica e é um fator decisivo no mecanismo de insuficiência cardíaca (JU & DIXON, 1996). Estudos de biópsia miocárdica em portadores de Doença de Chagas revelaram que pacientes assintomáticos, na fase crônica, podem apresentar lesões avançadas de inflamação e fibrose (PEREIRA BARRETTO *et al.*, 1986).

Nessa linha de raciocínio autores consideram a fibrose como um possível substrato para o desenvolvimento e a progressão da insuficiência cardíaca, das arritmias e para a morte súbita (LOPES *et al.*, 1970). Assim, o processo etiopatogênico, envolve uma relação multifatorial entre aspectos relacionados ao agente etiológico (seu polimorfismo e tropismo, os constituintes antigênicos, a carga parasitária) e aqueles relativos ao hospedeiro (como gênero, auto-imunidade e constituição genética) (BRODSKY & BARRAL-NETO, 2000; KIERSZENBAUM, 2003).

1.5. A Resposta Imune

1.5.1. Sistema imune e Doença de Chagas Experimental

As citocinas são proteínas solúveis produzidas pelas células que controlam o comportamento ou as propriedades de outras células, principalmente aquelas envolvidas na resposta imune (ABBAS *et al.*, 2005). Os linfócitos TCD4 podem ser agrupados em subpopulações funcionais de acordo com seu padrão de produção predominante de citocinas (MOSMANN *et al.*, 1986). A subpopulação definida como Th1 secreta Interleucina-2 (IL-2), TNF- α e IFN- γ , induzindo preferencialmente resposta imune mediada por células, e a população Th2 produz IL-4, IL-5 e IL-13, auxiliando desta forma a resposta imune humoral, uma vez que estas citocinas atuam na mudança de isotipos das imunoglobulinas (BOOM *et al.*, 1988; COFFMAN, 1988).

Células capazes de secretar citocinas tanto dos padrões Th1 como Th2 são denominadas Th0 (ABBAS *et al.*, 2005). As células T reguladoras (Treg) são linfócitos T CD4 que secretam IL-10 e TGF- β e inibem a resposta proliferativa de outras populações de linfócitos T CD4 (GROUX *et al.*, 1997).

Grande contribuição ao entendimento da resposta imune no curso da infecção chagásica tem sido dada através do modelo murino, uma vez que muitos de seus aspectos podem ser diretamente correlacionados com a doença em humanos. A ativação de macrófagos por citocinas parece ser fundamental no controle do parasita e tratamento *in vitro* de macrófagos com IFN- γ resulta em um aumento da morte de amastigotas intracelulares

(GOLDEN & TARLETON). Ainda, animais que carecem de imunidade adquirida, tais como os camundongos RAG-Knockout, são capazes de reduzir a proliferação do parasita através da produção de IL-12 e IFN- γ (SARDINHA *et al.*, 2006). A proteção imune contra o *T. cruzi* parece ser dependente da produção de óxido nítrico (VESPA *et al.*, 1994). Já no início da infecção, células NK produzem IFN- γ e direcionam um mecanismo microbicida frente ao *T. cruzi*, ao induzir a síntese de NO nas células macrocíticas (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992b). Assim como o IFN- γ , o TNF- α também é capaz de induzir a ativação de macrófagos (SILVA *et al.*, 1991), enquanto que, o TGF- β (SILVA *et al.*, 1991) e a IL-10 inibem esta ativação (SILVA *et al.*, 1992).

Após ativação da resposta imune específica, linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ ativam vários mecanismos efetores frente ao *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN, 1998). As citocinas secretadas pelos linfócitos T CD4⁺ com padrão de diferenciação funcional Th1 atuam ativando mecanismos protetores, demonstrados através de experimentos de transferência de clones de linfócitos Th1 (KUMAR & TARLETON, 2001). Além da produção de IFN- γ , a ação dos linfócitos T CD4⁺ inclui o auxílio aos linfócitos B na produção de anticorpos específicos, os quais têm um papel fundamental na eliminação dos parasitas extracelulares no modelo murino, sendo os anticorpos predominantes contra *T. cruzi* os de classe IgG2a e IgG2b (SPINELLA *et al.*, 1992; KUMAR & TARLETON, 1998), que conferem proteção no sangue e tecidos ao propiciarem a remoção dos tripomastigotas por células fagocitárias como polimorfonucleares, macrófagos e outras células do sistema fagocítico mononuclear, que expressam receptores para a porção Fc de IgG (ALCANTARA & BRENER, 1978; TAMBOURGI *et al.*, 1989).

1.5.2. Mediadores da resposta imune: Citocinas e Óxido Nítrico na Doença de Chagas Experimental

As citocinas podem desempenhar diversas funções, atuando como mediadores da imunidade natural, que são estimuladas por agentes infecciosos, pelos fagócitos mononucleares, e pelos estímulos em resposta ao reconhecimento antigênico específico pelos linfócitos T. A estimulação das células inflamatórias em resposta ao reconhecimento de antígenos específicos pelos linfócitos T promove o crescimento, a diferenciação e a ativação de linfócitos que estão envolvidos na resistência a microrganismos e muitas vezes na lesão de tecidos do hospedeiro (ABBAS *et al.*, 2005).

Muitos autores têm proposto que o padrão de resistência ou susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* está relacionado ao tipo de citocinas produzidas, com participação destacada das citocinas Th1, responsáveis por promover a resistência (SILVA *et al.*, 1992; HOFT *et al.*,

1993; MINOPRIO *et al.*, 1993; REED *et al.*, 1994). Assim, a resistência ao parasita dependeria de citocinas tais como o IFN- γ , TNF- α e IL-12, enquanto IL-10, IL-4 e TGF- β promoveriam a susceptibilidade (SAVINO *et al.*, 2007).

O IFN- γ tem sido correlacionado com a resistência e o controle do parasita na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (JAMES *et al.*, 1982; PLATA *et al.*, 1984; WIRTH *et al.*, 1985; PLATA *et al.*, 1987; REED, 1988). Diversos modelos têm demonstrado que camundongos resistentes secretam quantidades significantes de IFN- γ , enquanto que, camundongos suscetíveis secretam predominantemente IL-4 e IL-10 (SILVA *et al.*, 1992; HOFT *et al.*, 1993; MINOPRIO *et al.*, 1993; REED *et al.*, 1994). O IFN- γ está envolvido na ativação de macrófagos potencializando a produção de radicais de oxigênio e nitrogênio, ambos dotados de potente atividade microbica (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992a). Tem sido relatado que o NO produzido em animais infectados está relacionado à resistência e ao controle da parasitemia (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994). O IFN- γ também está envolvido na mudança de classe de imunoglobulina para IgG2a e IgG3 (SNAPPER & PAUL, 1987) e induz nos macrófagos aumento de expressão de receptores para a porção Fc de IgG (WILSON & FINBLOOM, 1992). Esta citocina é ainda responsável indiretamente por promover a diferenciação de células CD4⁺ Th0 na direção Th1, ao inibir a proliferação de células Th2 (SEDER & PAUL, 1994) e por ser um importante estimulador da secreção de IL-12 por macrófagos ativados (D'ANDREA *et al.*, 1993).

O TNF- α é uma citocina produzida por macrófagos, células T, células NK e outras populações celulares. Esta citocina é um mediador da imunidade natural e adquirida, com um amplo espectro de funções, destacando seu envolvimento no processo inflamatório no qual promove o recrutamento e ativação de fagócitos. Quando age sobre os macrófagos, induz a sua ativação, estimulando a produção de NO (GREEN *et al.*, 1990; LANGERMANS *et al.*, 1992). O TNF- α tem um papel importante no controle da infecção murina pelo *T. cruzi*, ativando macrófagos para a destruição intracelular do parasita (SILVA *et al.*, 1995). Entretanto, o TNF- α também parece estar envolvido na caquexia e na morte durante a fase aguda, sendo um elemento fundamental da reação inflamatória tissular (ROGGERO *et al.*, 2002). Estudo prévio sugeriu que TNF- α não sinergiza com IFN- γ no aumento da capacidade tripanocida (GOLDEN & TARLETON, 1991), porém, outro estudo apontou essas duas citocinas como sinérgicas na ativação de macrófagos aumentando a destruição de parasitas intracelulares (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992b).

A IL-10, citocina desativadora de macrófagos, é indiretamente responsável por diminuir a produção de IFN- γ e serve para controlar os efeitos potencialmente lesivos da

ativação de macrófagos sobre os tecidos do hospedeiro (FIORENTINO *et al.*, 1991). Os linfócitos CD4⁺ (Th2), os linfócitos B1 e os queratinócitos (O'GARRA *et al.*, 1992) são, juntamente com os macrófagos, responsáveis pela produção de IL-10 (MOSMANN & MOORE, 1991). A IL-10 inibe a expressão de moléculas co-estimuladoras como B7 (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991). Também é responsável pela diminuição da síntese de IL-2 (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991), IFN- γ (HSU *et al.*, 1990), IL-12 (D'ANDREA *et al.*, 1993) e está envolvida na supressão da proliferação de células T (DE WAAL MALEFYT *et al.*, 1991; TAGA & TOSATO, 1992). Ensaios *in vitro* demonstram que a IL-10 é capaz de inibir a destruição intracelular do *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992; SILVA *et al.*, 1992). Camundongos "knockout" de IL-10 controlam mais eficientemente a infecção por *T. cruzi*, reduzindo os níveis de parasitismo e determinando um aumento significativo na secreção de IFN- γ , NO, TNF- α e IL-12 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996; HUNTER *et al.*, 1997). Entretanto, a despeito deste efeito protetor, os animais deficientes em IL-10 sucumbem mais rapidamente à infecção pelo *T. cruzi*, o que é um provável resultado do efeito descontrolado das citocinas pro-inflamatórias na ausência de IL-10 (HUNTER *et al.*, 1997).

A IL-4 é uma citocina que atua em diferentes estágios de ativação, proliferação e diferenciação das células B. Na proliferação destas células, esta citocina, que pode ser secretada pelas células T CD4⁺ e mastócitos, atua como fator co-estimulador juntamente com o ligante de CD40 (BANCHEREAU *et al.*, 1991). A IL-4 está envolvida na diferenciação de linfócitos T na direção Th2 (SEDER & PAUL, 1994). Juntamente com a IL-10 e o TGF- β tem sido considerada uma citocina que promove a suscetibilidade dos camundongos na infecção pelo *T. cruzi*. Níveis alterados de IL-4 têm sido detectados no baço de camundongos infectados com *T. cruzi* ao longo da fase crônica, mas não durante a fase aguda (ZHANG & TARLETON, 1996). Em outras infecções por parasitas intracelulares, tais como, a leishmaniose e a hanseníase, a resposta exacerbada de IL-4 leva a um agravamento da doença (SALGAME *et al.*, 1991; SEDER & PAUL, 1994).

Assim como as citocinas, o NO (óxido nítrico) é um mediador da resposta imune frente ao *T. cruzi*. Essa molécula é um potente agente microbicida produzido por macrófagos ativados (MARLETTA *et al.*, 1988; MAYER *et al.*, 1989; HEVEL *et al.*, 1991 WHITE & MARLETTA, 1991; MULLIGAN *et al.*, 1991 WHITE & MARLETTA, 1991). Em modelos experimentais, a inibição farmacológica da iNOS inibe a capacidade microbicida do macrófago e promove aumento da parasitemia (SILVA *et al.*, 1995; MARTINS *et al.*, 1998). Achados têm demonstrado que a resistência à infecção pelo *T. cruzi* está associada com a capacidade dos linfócitos produzirem IFN- γ (MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992b), os quais

ativam os macrófagos a produzirem NO, a fim de controlar a multiplicação intracelular do *T. cruzi* (GAZZINELLI *et al.*, 1992; VESPA *et al.*, 1994).

Macrófagos murinos expressam altos níveis de iNOS e produzem grandes quantidades de NO quando estimulados simultaneamente com IFN- γ e LPS *in vitro* (CUNHA *et al.*, 1993). Estudos experimentais mostraram que o NO é um importante mediador da imunidade anti-*T. cruzi* durante a infecção aguda (VESPA *et al.*, 1994), porém, recentemente foi associado à desnervação do plexo mioentérico do cólon de camundongos infectados (ARANTES *et al.*, 2004). Entretanto, pouco se conhece de seus efeitos durante a fase crônica da infecção, especialmente no tecido cardíaco.

A imunopatogênese envolvida na cardiopatia chagásica é complexa e ainda não foi totalmente elucidada. Acredita-se que o parasita apresenta um papel fundamental durante as fases aguda e crônica da doença, provavelmente dependente do tipo de cepa presente na infecção. A interação entre parasito e mediadores do sistema imune seria talvez o principal fator responsável pelos danos tissulares nas células infectadas, favorecendo a persistência da inflamação cardíaca e a fibrose reparativa subsequente, levando a uma perda funcional importante do órgão ao longo dos anos. Diferentes fundos genéticos experimentais são potentes ferramentas para elucidar tais mecanismos e direcionar novas estratégias de intervenção na doença humana.

2. Justificativa

A Doença de Chagas no modelo murino manifesta-se de forma semelhante à observada na infecção em humanos, sendo influenciada pelo background genético e pela cepa infectante, desenvolvendo uma variedade de quadros que na sua grande maioria são acompanhados de uma fase aguda sintomática que evolui para a fase crônica. Assim como no homem, na infecção murina o *T. cruzi* infecta quase todos os tipos celulares, sendo, de maior importância os da musculatura cardíaca e da musculatura esquelética. Os padrões de resistência e susceptibilidade a infecção pelo *T. cruzi* têm sido amplamente estudados no que se refere ao camundongo. Nos camundongos susceptíveis se observa um elevado índice de parasitemia e, na sua grande maioria, sucumbem precocemente à infecção aguda. No outro extremo, encontram-se os camundongos considerados resistentes, que majoritariamente e, dependendo do inóculo, desenvolvem baixos índices de parasitemia e mortalidade.

Por isso, o uso de modelos experimentais murinos na elucidação dos mecanismos imunopatológicos envolvidos na infecção chagásica trazem grandes avanços ao entendimento da doença humana.

A importância de mediadores inflamatórios como citocinas e óxido nítrico ainda permanecem obscuras na Doença de Chagas. Desta forma, o presente trabalho, avaliou a infecção por duas cepas de *T. cruzi* com diferentes tropismos tissulares em modelos experimentais com diferentes características genéticas.

3. Hipótese

As lesões cardíacas observadas na Doença de Chagas experimental são dependentes das características genéticas do animal, do tropismo das cepas infectante e dos mediadores imunológicos envolvidos na infecção.

4. Objetivo Geral

Avaliar as lesões cardíacas e mediadores imunológicos na fase aguda e crônica após infecção experimental em animais com diferentes características genéticas infectados por duas diferentes cepas de *T. cruzi*.

4.1. Objetivos específicos

- Quantificar o parasitismo tissular nos animais BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-} infectados com as cepas Y ou Colombiana de *T. cruzi* nas fases aguda e crônica da Doença de Chagas experimental;
- Quantificar o infiltrado inflamatório no tecido cardíaco desses animais;
- Quantificar a fibrose no tecido cardíaco desses animais;
- Quantificar a produção de citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-4 e IL-10) no baço desses animais.

5. Casuística e Métodos

5.1. Casuística

No presente trabalho foram estudados 60 animais machos; destes, 20 animais eram da linhagem C57Bl/6, 20 animais eram C57Bl/6 deficientes em iNOS (C57Bl/6 iNOS^{-/-}) e 20 animais eram da linhagem BALB-c. Para cada grupo de animais foram inoculadas 3000 formas tripomastigotas, por via subcutânea. Dos 20 animais C57Bl/6, 10 foram infectados com a cepa Y e 10 foram infectados com a cepa Colombiana. Entre os camundongos C57Bl/6 iNOS^{-/-}, 10 foram infectados com a cepa Y e 10 animais foram infectados com a cepa Colombiana. Dos 20 animais BALB-c, 10 foram infectados com a cepa colombiana e 10 com a cepa Y. Metade dos animais (10 animais de cada grupo) foram eutanasiados no 15º dia para obtenção da fase aguda e os demais no 90º dia de infecção para avaliação da fase crônica. Na tabela abaixo pode-se observar a distribuição dos animais.

Tabela 1 - Distribuição da casuística conforme grupo de animais, cepa e fase da infecção

<i>Número de animais</i>	<i>Grupo</i>	<i>Cepa</i>	<i>Fase da infecção</i>
5	C57Bl/6	Y	Aguda
5	C57Bl/6	Colombiana	Aguda
5	C57Bl/6	Y	Crônica
5	C57Bl/6	Colombiana	Crônica
5	C57Bl/6 iNOS ^{-/-}	Y	Aguda
5	C57Bl/6 iNOS ^{-/-}	Colombiana	Aguda
5	C57Bl/6 iNOS ^{-/-}	Y	Crônica
5	C57Bl/6 iNOS ^{-/-}	Colombiana	Crônica
5	BALB-c	Y	Aguda
5	BALB-c	Colombiana	Aguda
5	BALB-c	Y	Crônica
5	BALB-c	Colombiana	Crônica

5.2. Confirmação da Infecção dos animais – Parasitemia

O exame parasitológico direto dos animais infectados foi realizado no 7º dia de infecção para a cepa “Y” e no décimo dia de infecção para a cepa “colombiana”.

O exame parasitológico foi realizado segundo o protocolo abaixo:

- 1º. Assepsia da cauda de cada animal com gaze embebida em álcool etílico a 70%;
- 2º. Corte de aproximadamente 3mm da extremidade distal da cauda e coleta da segunda gota de sangue sobre lâmina de vidro para microscopia;
- 3º. Cobertura da gota de sangue sobre a lâmina com uma lamínula;
- 4º. Exame ao microscópio de luz com objetiva de 40x;

Após constatar a parasitemia, os animais destinados a fase crônica da doença receberam tratamento com 8,33mg de Benzonidasol/ para cada ml de água correspondendo a 20 comprimidos diluídos em 250ml de água estéril (Rochagan, Roche, Brasil), via oral a partir do 15º dia da infecção por 7 a 10 dias.

O procedimento de eutanásia foi realizado após administração de 20 UI de heparina; os camundongos foram eutanasiados por inalação de CO₂ em câmara de previamente preenchida com o CO₂. Foi coletado sangue pelo seio venoso orbital com posterior necropsia, através de incisão dorsolateral, coletando-se o baço para cultura de células e o coração para estudo *in situ* através de incisão ventral das cavidades torácica e abdominal. As demais vísceras de interesse foram coletadas e armazenadas para análises posteriores.

Os animais foram mantidos no biotério da Disciplina de Biologia Celular da UFTM em gaiolas plásticas de 414 mm x 168 mm, em sala especial, com renovação constante de ar, a uma temperatura entre 20 e 25° C e umidade entre 45 e 55%. A alimentação foi feita com ração comercial de composição conhecida (Nuvilab-CR1, NUVITAL, Brasil). A água para beber foi oferecida *ad libitum*. O alimento, a água para beber e a serragem, que serviu de forragem para as gaiolas, passaram pelo processo de esterilização em autoclave antes de serem oferecidos aos animais. Durante o período de experimento, os animais foram supervisionados diariamente para verificação de eventuais óbitos.

5.3. Aspectos éticos

Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com as normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA (ANDERSEN, 2004; MEZADRI *et al.*, 2004). O Projeto de Pesquisa do presente

trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM (CEP/UFTM), protocolado com o número 50.

5.4. Obtenção do *Trypanosoma cruzi* para inóculo em camundongos

Para produzir a infecção nos camundongos foram utilizados tripomastigotas sangüíneos provenientes de camundongos Swiss, obtidos por sangria do plexo venoso retro orbital (WAYNFORTH & FLECKNELL, 1992), com auxílio de uma pipeta Pasteur umedecida com heparina. O número de parasitos foi determinado em 50 campos em um volume de 5µL de sangue entre lâmina e lamínula (BRENER, 1962) e o inóculo foi ajustado para a concentração de 3×10^3 tripomastigotas sangüíneos/ml administrado por via subcutânea.

5.5. Obtenção de antígenos de *Trypanosoma cruzi* para cultura de células do baço

Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram cultivadas em meio Schneider (Sigma EUA), suplementado com L-glutamina, carbonato de cálcio, e 20% de soro fetal bovino, para o preparo de antígenos brutos do parasito. As culturas foram mantidas em estufa a 29°C. No final da fase logarítmica do crescimento, os parasitos foram coletados, e lavados 3 vezes por centrifugação (800xG/min, -4°C) com PBS (solução salina tamponada com fosfato). Os parasitos foram contados em Câmara de Neubauer e ressuspensos em água estéril, a uma concentração de 10^8 parasitos/mL. A suspensão foi submetida a 5 ciclos de congelação e descongelação para a lise completa, sendo em seguida, aliquotado e armazenado em freezer -70°C e usado nas culturas de células esplênicas.

5.6. Cultura de células esplênicas

O baço dos camundongos foi coletado e transferido para uma placa de Petri contendo meio RPMI 1640 (GIBCO, Nova Zelândia). O órgão foi macerado e as células em suspensão foram lavadas 3 vezes por centrifugação (400xG, 15 min 8°C). As células foram contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas para 2×10^6 células/mL em meio RPMI completo, contendo 50mM de Hepes (GIBCO-EUA), 5% de soro fetal bovino inativado (EUROBIO-FRANÇA), 2mM de L-glutamina (GIBCO-EUA) e 40µg/mL de gentamicina (ARISTON-BRASIL). Um mililitro da suspensão de células

foi distribuída em cada poço de cultura de placa de 24 poços (CORNING-EUA) e incubados sem adição de estímulo e com adição de 5 µg/mL de antígenos de *T. cruzi*. As culturas foram mantidas por 24 e 72 horas em estufa com 5% de CO₂ a 37°C. Os sobrenadantes foram coletados e armazenados em freezer a -70°C até análise.

5.7. Dosagem de citocinas por ELISA dos sobrenadantes de cultura de células do baço

As citocinas presentes nos sobrenadantes de culturas de células dos baços dos animais foram dosadas por ensaio imunoenzimático (ELISA), tipo sanduiche, utilizando pares de anticorpos comercialmente disponíveis. Placas de polipropileno de alta afinidade, com 96 poços de fundo chato (NUNC, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais (100µl) contra cada uma das citocinas, IFN-γ, TNF-α, IL-10 e IL-4 (diluição:1:250; BD OptEIATM,) (BD Pharmingen, EUA) diluídos em tampão de sensibilização (pH 9,5 para IFN-γ e IL-4; para TNF-α e IL-10 foi utilizado pH 6,5) overnight a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS-Tween a 0,05% (Solução Salina tamponada com fosfato adicionada de 0,05% de Tween-20 – SIGMA, EUA) e bloqueadas por 1 hora em temperatura ambiente, com 200µL por poço de solução PBS-FBS 10% (solução salina tamponada com fosfato adicionada de 10% de soro fetal bovino). Em seguida, foram lavadas com PBS-Tween 0,05%. As amostras dos sobrenadantes de cultura foram distribuídas em diluições 1:2, com volume final de 100µL, em PBS-FBS 10%. A curva padrão de 1000 a 15,625 pg/mL de cada citocina foi utilizada como padrão de referência e colocadas em duplicata nas fileiras 11 e 12. As amostras e padrões foram incubados a temperatura ambiente por 2 horas e as placas foram lavadas novamente com PBS-Tween 0,05%. Preparou-se uma solução contendo o anticorpo secundário anti-citocina conjugado com biotina (1:250) (BD Pharmingen, EUA) e Streptoavidina-*Horseadish* Peroxidase (1:250) (BD Pharmingen, EUA), diluídos em PBS-FBS 10%. Adicionou-se 100µL desta solução incubando-se por 1 hora a 37°C. As placas foram então lavadas com PBS-Tween 0,05%, e adicionados 100µL da solução de revelação TMB (Tetra-Metil-Benzidina) (BD Pharmingen, EUA). As placas foram mantidas por 30 minutos em temperatura ambiente, protegidas da luz. A solução de TMB foi composta de 5mL da solução A, contendo peróxido de hidrogênio, e de 5 mL da solução B, contendo 3,3', 5,5' tetrametilbenzidina, para cada placa. Após este tempo a reação foi parada com uma solução de ácido sulfúrico 0,4M e as placas foram

lidas em leitor de microplacas com o filtro de 450nm (BIORAD 2550 READER EIA, EUA). A concentração das citocinas foi determinada por análise de regressão, comparando com a absorbância obtida nas amostras com aquelas da curva padrão, realizadas em cada placa para a citocinas em questão e expressas em pg/mL.

5.8. Processamento das lâminas

Os fragmentos do coração foram fixados em formaldeído a 10% tamponado por pelo menos 24 horas. Após a fixação, foram submetidos ao processo de desidratação em uma série crescente de alcoóis etílicos, diafanização em xilol e inclusão em parafina, posicionando os fragmentos com seu eixo longitudinal perpendicular ao plano de microtomia. Obtendo-se então, cortes transversais, e, para cada coração, dez cortes seriados com 5µm de espessura. Os cortes foram aderidos às lâminas com o adesivo polilisina e submetidos à secagem. Em seguida foram realizadas as colorações de rotina. As lâminas de número 1 foram coradas pela Hematoxilina e Eosina (solução aquosa de stock de eosina y e floxina a 1% adicionada a ácido acético glacial e álcool a 95%) (HE) (MICHALANY, 1980). Nas lâminas de número 2 foram realizadas as colorações pelo picrossírius, as lâminas de número 3 foram utilizadas para a técnica de imuno-histoquímica para *T. cruzi*.

5.9. Quantificação do infiltrado inflamatório

Para a quantificação do infiltrado inflamatório, foram utilizadas as lâminas de fragmento cardíaco coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE). As imagens para análise dos cortes de coração dos camundongos foram capturadas utilizando uma câmera de vídeo digital (Evolution MP 5.0 – color – Media Cibernetic) acoplada a um microscópio de luz (Nikon – Eclipse 50i) que envia as imagens para um computador (Pentium dual core duo) para serem capturadas no programa “Image – Pro Plus” (MediaCybernetics). As imagens assim capturadas foram visualizadas em dois monitores, e gravadas para posterior utilização com os programas de análise de imagem “Image J”. Essas imagens foram calibradas através da lâmina (Leica) com régua graduada em dois milímetros divididos em unidades de 0,01mm (dez micrômetros) para a objetiva de dez vezes.

Para analisar o infiltrado inflamatório no coração foi utilizado um sistema teste de contagem de pontos em uma área teste pré-determinada (MANDARIM-DE-LACERDA, 2003). Para calcular o número de áreas teste ou campos, foi utilizada a

fórmula de HALLY (1964), com o qual se calculou o erro padrão relativo (EPR) onde V_v = densidade de volume da estrutura em análise e n = número de pontos a serem contados.

$$EPR = \sqrt{\frac{(1 - V_v)}{n}} \quad \text{Onde,} \quad V_v = \frac{P_p}{P_T} \quad P_p = \text{a razão de pontos que atingem o coração onde há infiltrado inflamatório (miocardite) e } P_T = \text{número de pontos teste} = 100.$$

O n calculado foi corrigido pela seguinte fórmula:

$$n_{\text{corrigido}} = \frac{n_{\text{calculado}}}{V_v} \quad n_{\text{corrigido}} = 384 * 0,04 = 9600 \text{ pontos}$$

Utilizamos o Erro Padrão Relativo igual a 10.000 pontos. Assim, analisamos ao acaso, 100 imagens, com cada imagem contendo 100 pontos com tamanho de $234,88 \mu\text{m} \times 234,88 \mu\text{m}$, onde cada ponto corresponde a $550 \mu\text{m}^2$, totalizando uma área total de estudo de $5.500.000 \mu\text{m}^2$ (Figura 1).

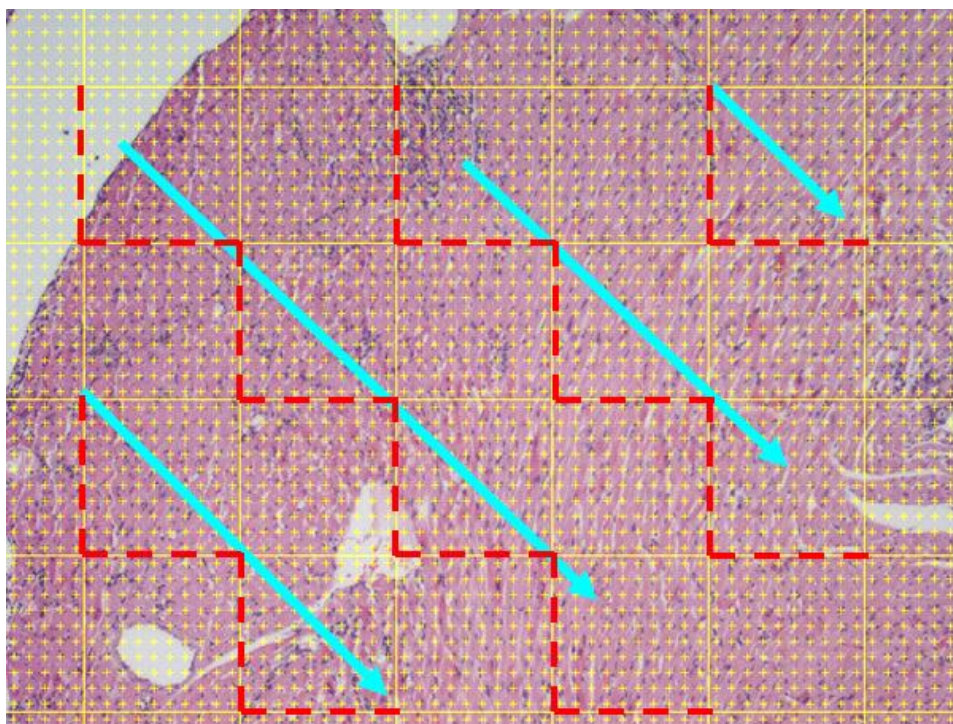


Figura 1 – Morfometria para quantificação de infiltrado inflamatório. As setas azuis indicam a direção de escolha dos campos, e os pontilhados vermelhos os campos selecionados, em um total de dez campos. Objetiva de 10X.

Para calcular a percentagem de infiltrado inflamatório foi utilizada a seguinte formula: $\%M = ((\sum \text{pontos} * 550) / 5.500.000) * 100$ onde $\%M$ = percentagem

de miocardite, Σ = somatória do número de pontos que coincidiram com o infiltrado inflamatório vezes o valor de $550 \mu\text{m}^2$ que corresponde a área por ponto dividido pela área total de análise que corresponde a $5.500.000 \mu\text{m}^2$. Este resultado foi multiplicado por 100 para obter a percentagem.

Para análise da miocardite, empregou-se o critério de "Dallas" (ARETZ, 1987). Por definição, o diagnóstico de miocardite é feito quando três ou mais células inflamatórias estivessem presentes no interstício, ocasionando lesão nos miocardiócitos adjacentes (Figura 2).

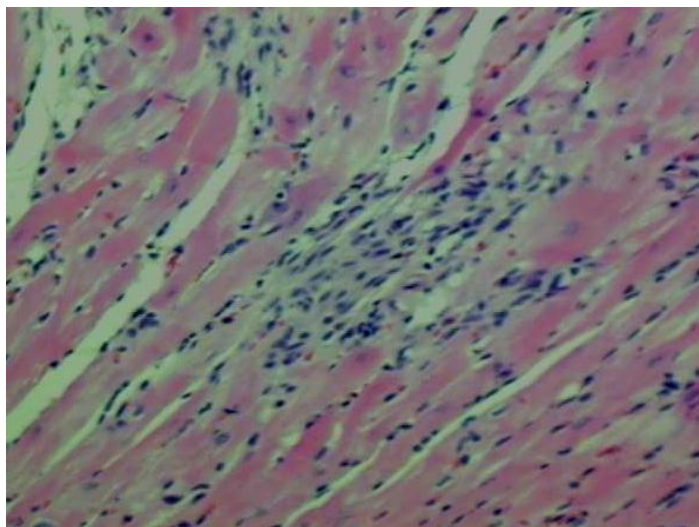


Figura 2 - Infiltrado inflamatório no tecido cardíaco segundo critério de Dallas. Observado na objetiva de 40X.

5.10. Quantificação da Fibrose

A avaliação morfométrica do tecido conjuntivo fibroso foi realizada nos cortes do coração, fixados e emblocados em parafina, corado pelo picrossírius (solução aquosa saturada e ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3b, *Sirius red F3B-Bayer*) com contra coloração pela hematoxilina por um minuto. As lâminas foram analisadas por morfometria digital, em microscópio de luz polarizada em uma objetiva de 10x com aumento final de X400. A morfometria foi feita utilizando o Sistema Analisador de Imagem Automático KS 300 – “Carl Zeiss” (Figura 3). O campo a ser quantificado era capturado por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e ao computador para digitalização da imagem. Na imagem polarizada o tecido conjuntivo fibroso apresentava-se birrefringente que era marcado pelo observador e obtinha-se o percentual de fibrose por área do campo a ser quantificado. A fibrose foi quantificada em 20 campos que correspondem, aproximadamente, a toda a área do corte.

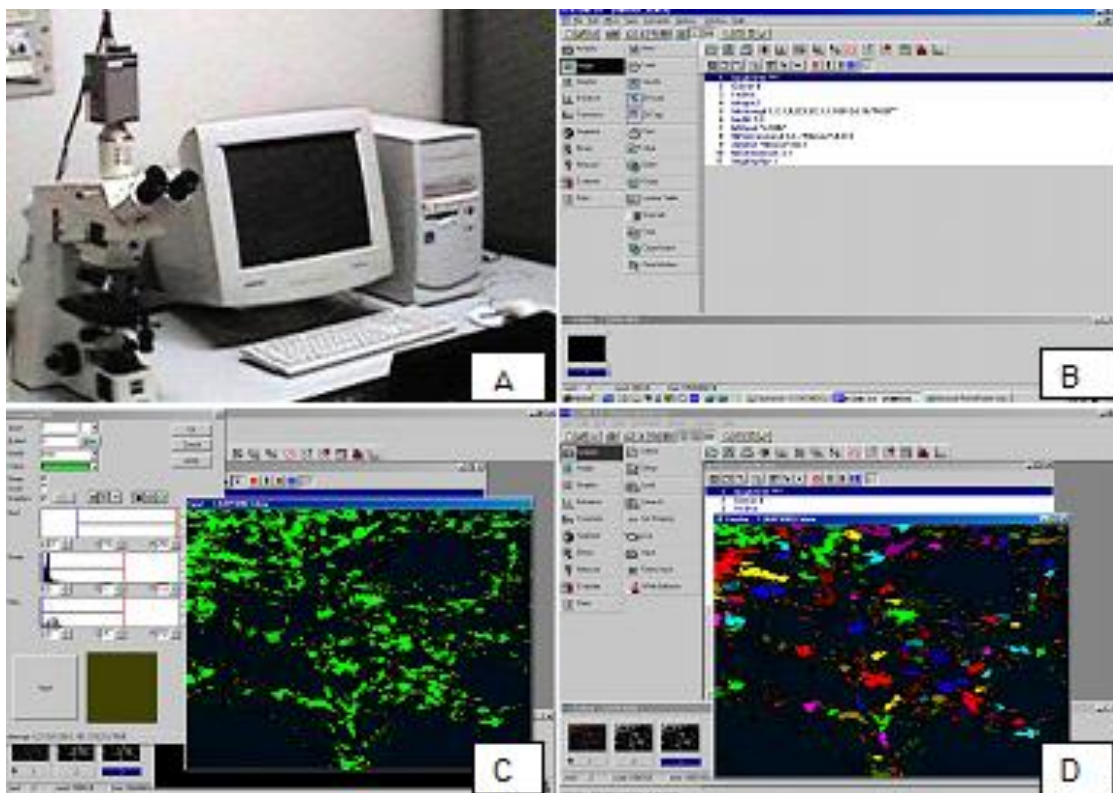


Figura 3 - Sistema computadorizado de quantificação de fibrose. Morfometria computadorizada microscópica automática.

A. observa-se o microscópio de luz acoplado a uma câmera conectada ao computador. **B.** Observam-se as etapas seguidas pelo programa KS 300 da Carl Zeiss. **C.** a captura da imagem a ser quantificada com luz polarizada. **D.** o resultado da quantificação em porcentagem da imagem capturada.

5.11. Imunohistoquímica

A imunohistoquímica para detecção de ninhos de *T. cruzi* foi realizada nos cortes de coração dos camundongos infectados, cujos fragmentos foram fixados em formol. Após bloqueio da peroxidase endógena pelo tratamento com H_2O_2 em metanol, as lâminas foram lavadas e incubadas com solução PBS contendo 2% de PBS-BSA. Em seguida, cada corte foi incubado com o anticorpo anti- *T. cruzi* produzido em coelho, na concentração 1:250, incubado durante 2 horas à temperatura ambiente (37°C). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e novamente incubadas por 2 horas com o anticorpo secundário (proteína A conjugada com peroxidase) na diluição 1:500. As lâminas foram lavadas e reveladas com 25 μ L de H_2O_2 (0,05%) 1mg/mL DAB (1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol-Diaminobenzidina) em quanto tampão tris-HCl pH 7,4. A reação foi interrompida lavando-se as lâminas em água corrente. Os cortes foram contra corados, com hematoxilina e as lâminas foram então montadas para análise em microscópio de luz comum.

5.12. Densidade Parasitária

A densidade parasitária do número de ninhos de amastigotas por mm^2 foi realizada através da contagem desses ninhos em todo o corte do coração de cada animal. A quantificação da área do fragmento do coração foi realizada capturando toda a imagem do coração com o auxílio de um scanner HP Scanjet G 4050 (USA) e o programa Adobe Photoshop CS2 em um computador Pentium dual core duo. O tamanho de cada imagem corresponde a 10mm^2 . As imagens assim capturadas foram visualizadas e gravadas para posterior utilização com o programa de análise de imagem “ImageJ”, onde foi obtidas as mensurações, cujos valores foram expressos em mm^2 (Figura 4).

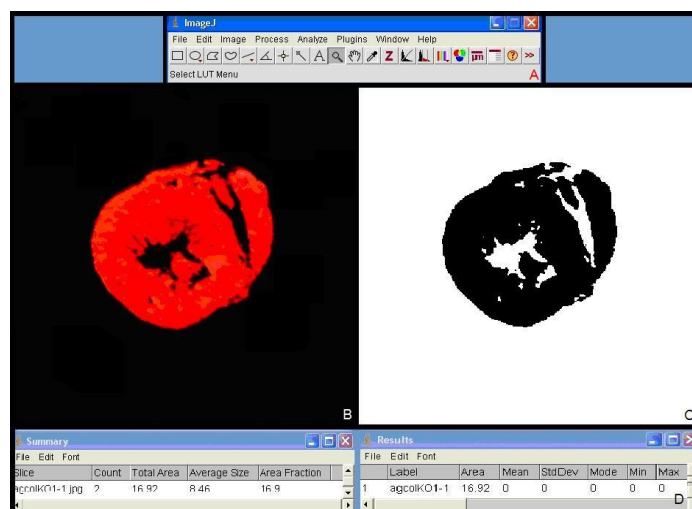


Figura 4 - Sistema de quantificação da área do tecido cardíaco.

A. programa ImageJ; Em B. imagem de corte do coração; Em C. imagem transformada em 8 bits e utilizado o comando *threshold* que transforma a imagem em branco e preto, permitindo o cálculo da área pelo programa; Em D. o resultado do cálculo

5.13. Análises estatísticas

A análise estatística foi realizada por meio do programa *Graphpad Prism 5.0* (graphpad software - EUA). A verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelos testes de Kolmogorov-Smirnov. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição normal foram expressas em média $\pm$ desvio padrão e aquelas que apresentaram distribuição não normal foram expressos em mediana com valores mínimos e máximos e percentis. Para comparação de dois grupos (BALB-c versus C57Bl/6 e C57Bl/6 versus C57Bl/6 *iNOS*^{-/-}) foi utilizado o teste “*t*” não pareado para os dados com distribuição normal e teste de Mann Whitney para os dados com distribuição não normal. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

6. Resultados

6.1. Ninhos de Amastigotas

O parasitismo tissular foi avaliado pela contagem de ninhos de *T. cruzi* no miocárdio pela técnica de imunohistoquímica indireta, nos camundongos BALB-c versus C57Bl/6 e C57Bl/6 versus C57Bl/6 iNOS^{-/-} infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* e nas diferentes fases da Doença de Chagas experimental (PRANCHA 1A e 1B).

Na fase aguda da infecção com a cepa Y foi observado números estatisticamente maiores de ninhos de amastigotas nos animais C57Bl/6 em relação aos animais BALB-c e aos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} ($p = 0,0083$, $p = 0,0260$ respectivamente; Mann Whitney) (FIGURA 5A). Nos animais infectados com a cepa Colombiana observou-se que os camundongos C57Bl/6 apresentaram quantidades significativamente maiores de ninhos que os animais BALB-c. Entretanto, os C57Bl/6 iNOS^{-/-} apresentaram números de ninhos significativamente menor que os C57Bl/6 ($p = 0,015$ e $p = 0,0159$ respectivamente; Mann Whitney) (FIGURA 5B).

Na fase crônica da infecção com a cepa Y, não foi detectado ninhos de amastigotas em nenhum dos grupos estudados (FIGURA 5C). Nessa mesma fase da infecção com a cepa Colombiana, embora tenha sido encontrados ninhos de *T. cruzi*, não foi observada diferença estatística entre os grupos analisados (FIGURA 5D).

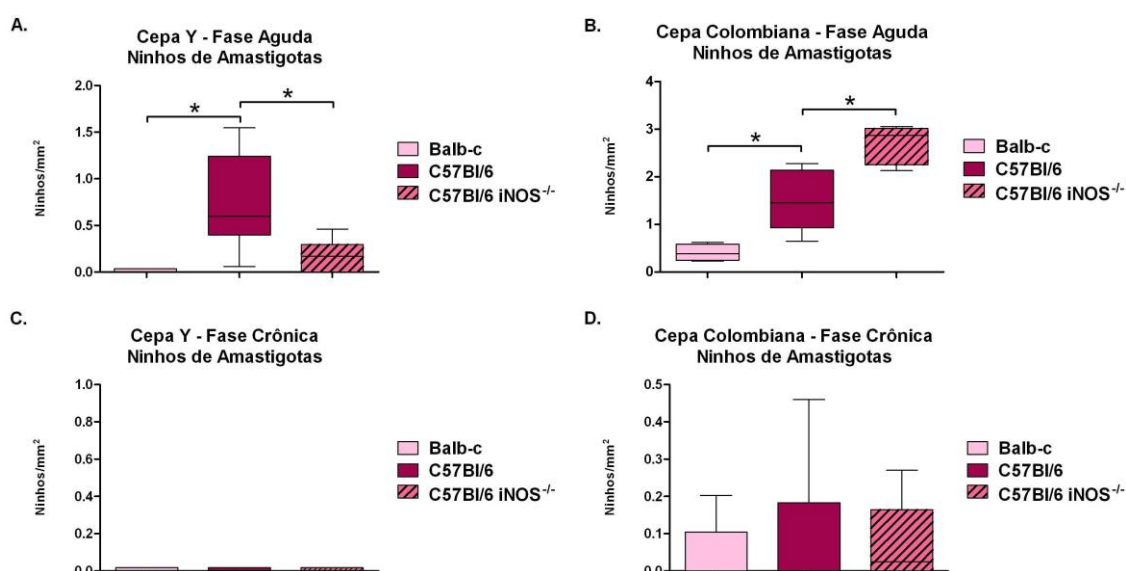


Figura 5 - Ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-}. **A.** Cepa Y, fase AGUDA; **B.** Cepa COLOMBIANA, fase AGUDA; **C.** Cepa Y, fase CRÔNICA; **D.** Cepa COLOMBIANA, fase CRÔNICA. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * ($p < 0,05$), teste de Mann Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

6.2. Infiltrado inflamatório

O processo inflamatório cardíaco foi avaliado nos camundongos BALB-c versus C57Bl/6 e C57Bl/6 versus C57Bl/6 iNOS^{-/-} infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* e nas diferentes fases da Doença de Chagas experimental (PRANCHA 1C e 1D).

Na fase aguda da infecção com a cepa Y foi observado percentagem de infiltrado significativamente maior nos animais BALB-c em relação aos animais C57Bl/6 ($p=0,004$; Mann Whitney). Não foi encontrado diferença significativa entre os animais C57Bl/6 em relação aos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} (FIGURA 6A). Na infecção com a cepa Colombiana não foram observadas diferenças estatisticamente significantes, pois os grupos apresentaram homogeneidade no percentual de infiltrado inflamatório (FIGURA 6B).

Na fase crônica da infecção com a cepa Y não foram observadas diferenças significativas no percentual de infiltrado inflamatório entre os grupos (FIGURA 6C). Já nos animais infectados com a cepa Colombiana foi observado um percentual significativamente maior de infiltrado inflamatório nos animais C57Bl/6 em relação aos animais BALB-c ($p=0,0087$; Mann Whitney) (FIGURA 6D).

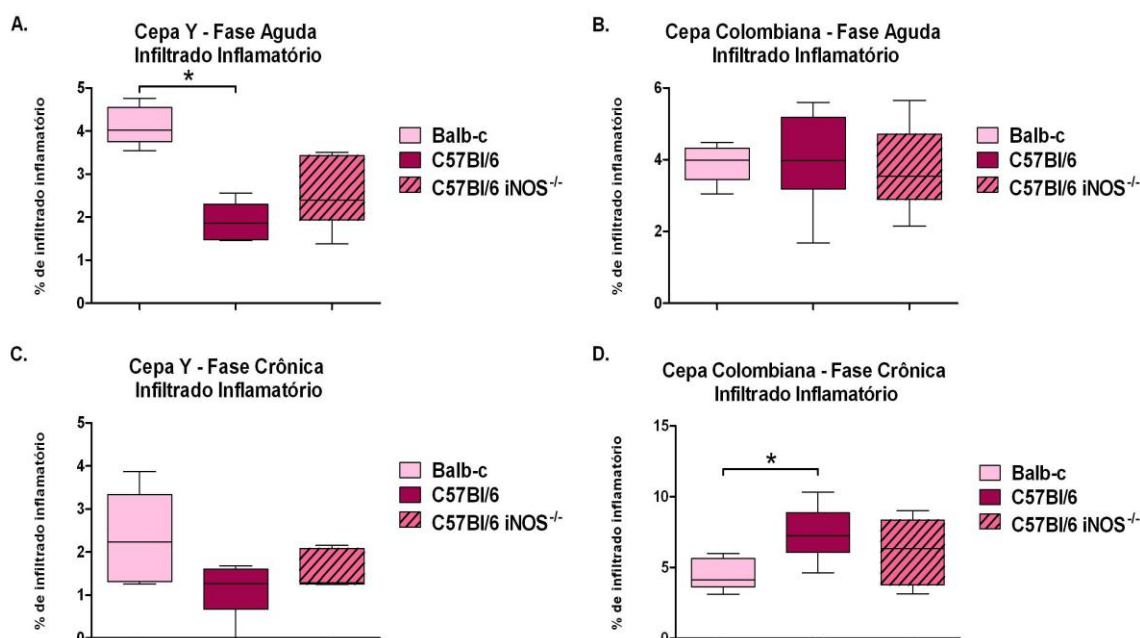


Figura 6 – % de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco de BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-}.

A. Cepa Y, fase AGUDA; **B.** Cepa COLOMBIANA, fase AGUDA; **C.** Cepa Y, fase CRÔNICA; **D.** Cepa COLOMBIANA, fase CRÔNICA. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de Mann Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

6.3. Fibrose

A fibrose cardíaca foi avaliada por morfometria digital utilizando-se cortes de tecido cardíaco dos camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-} corados pelo picrosírius e analisado na luz polarizada (PRANCHA 1E-H).

Na infecção aguda pela cepa Y não foi observada diferenças entre os animais BALB-c e C57Bl/6, nem tão pouco entre C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-} (FIGURA 7A). No entanto, quando infectados com a cepa Colombiana os animais BALB-c apresentaram percentagem de fibrose significativamente maiores que os animais C57Bl/6 ($p=0,0145$; “t” não pareado) (FIGURA 7B).

Na fase crônica da infecção com a cepa Y não foram encontrada diferenças estatisticamente significantes entre os grupos (FIGURA 7C). No entanto, quando infectados com a cepa Colombiana os animais BALB-c apresentaram percentual significativamente maior de fibrose que os animais C57Bl/6 ($p=0,0004$; “t” não pareado) (FIGURA 7D).

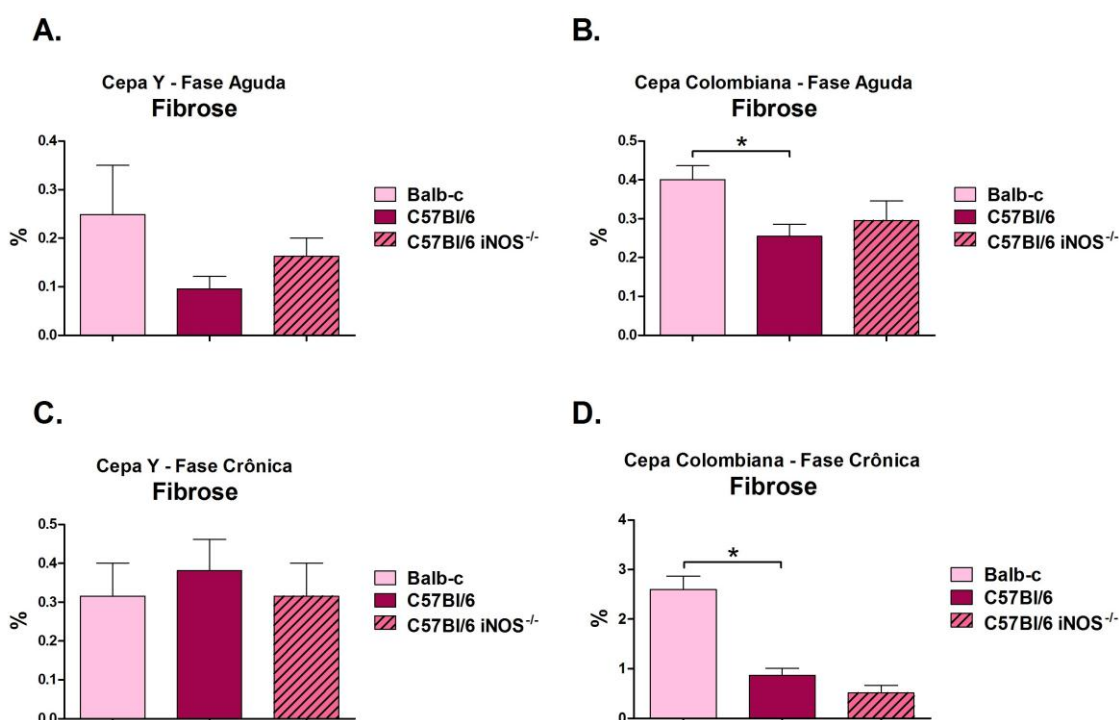


Figura 7 - % de Fibrose no tecido cardíaco de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-}.

A. Cepa Y, fase AGUDA; **B.** Cepa COLOMBIANA, fase AGUDA; **C.** Cepa Y, fase CRÔNICA; **D.** Cepa COLOMBIANA, fase CRÔNICA. Diferenças estatisticamente significantes estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de “t” não pareado. As barras representam a média e as linhas verticais representam o erro padrão da média.

6.4. Produção de Citocinas

A produção de citocinas pelas células do baço foi determinada após cultura sem estímulo e estimulada com antígenos de *T. cruzi* dos camundongos BALB-c versus C57Bl/6 e C57Bl/6 versus C57Bl/6 iNOS^{-/-} infectados com diferentes cepas de *T. cruzi* e nas diferentes fases da Doença de Chagas experimental.

Na fase aguda da infecção com a cepa Y, na cultura não estimulada os níveis de IFN- γ foram significativamente maiores nos animais C57Bl/6 em relação aos C57Bl/6 iNOS^{-/-} ($p=0,0043$; Mann Whitney). Da mesma forma, estes animais apresentaram maiores níveis de IFN- γ que os animais BALB-c, embora essa diferença não tenha sido estatisticamente significativa ($p=0,059$; Mann Whitney) (FIGURA 8A). Não foram observadas diferenças significativas nas culturas estimuladas com Ag-Tc, em nenhum dos grupos analisados. Nos animais infectados com a cepa Colombiana não foi observada diferença entre os grupos na cultura sem estímulo, embora existam níveis elevados dessa citocina nos camundongos BALB-c em relação ao C57Bl/6 quanto o C57Bl/6 em relação ao C57Bl/6 iNOS^{-/-} ($p=0,055$ e $p=0,056$, respectivamente; Mann Whitney). Após estímulo com Ag-Tc foi observado níveis significativamente maiores nos animais BALB-c em relação aos animais C57Bl/6 ($p=0,0079$; Mann Whitney). Não foi observado diferenças significantes entre os animais C57Bl/6 em relação ao C57Bl/6 iNOS^{-/-} (FIGURA 8B).

Na fase crônica da infecção com a cepa Y houve produção significativamente maior de IFN- γ pelos animais C57Bl/6, na cultura estimulada com Ag-Tc, comparados aos animais BALB-c ($p=0,0022$; Mann Whitney) o mesmo não foi observado ao comparar os animais C57Bl/6 em relação aos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-}. Não foi observada diferença estatística na produção de IFN- γ nas culturas sem estímulos nesses animais (FIGURA 8C). Na infecção com a cepa Colombiana os níveis de IFN- γ foram significativamente maiores nos animais BALB-c em relação aos C57Bl/6, tanto na cultura não estimulada quanto na estimulada com Ag-Tc ($p=0,0087$ e $p=0,002$, respectivamente; Mann Whitney). A produção de IFN- γ entre os animais C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-} apresentou diferenças estatísticas na cultura com estímulo ($p=0,026$; Mann Whitney), porém, o mesmo, não foi observado na cultura não estimulada (FIGURA 8D).

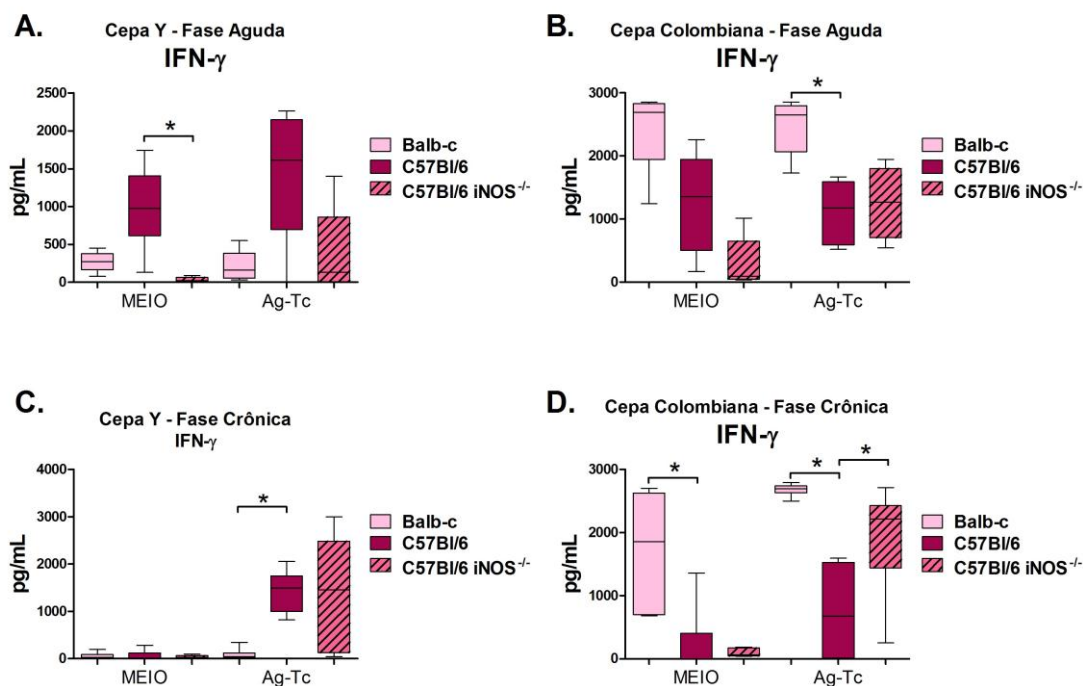


Figura 8 - Níveis de IFN- γ (pg/mL) em sobrenadantes de cultura do baço de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-} não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de *T. cruzi* (Ag-Tc). Cerebra Y, fase AGUDA; **B.** Cerebra COLOMBIANA, fase AGUDA; **C.** Cerebra Y, fase CRÔNICA; **D.** Cerebra COLOMBIANA, fase CRÔNICA. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * ($p < 0,05$), teste de Mann Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.

Ao analisar a produção de TNF- α na fase aguda da infecção com a cepa Y, não foram observadas diferenças estatísticas entre os grupos, embora os animais BALB-c apresentaram níveis mais elevados de TNF- α , tanto na cultura não estimulada, quanto na estimulada com Ag-Tc ($p=0,35$ e $p=0,27$, respectivamente) (FIGURA 9A). Nos animais infectados com cepa Colombiana, nesta mesma fase, foi observado que na cultura estimulada com Ag-Tc houve produção de TNF- α significativamente maiores pelos animais BALB-c em relação aos animais C57Bl/6 ($p=0,0079$; Mann Whitney). Não foi observada diferença estatística na cultura sem estímulo (FIGURA 9B).

Na cultura não estimulada na fase crônica da infecção com a cepa Y não foi observada diferença significativa na produção de TNF- α , contudo, na cultura estimulada com Ag-Tc a produção de TNF- α pelos animais C57Bl/6 foi significativamente maior que a dos animais BALB-c ($p=0,018$; Mann Whitney). O mesmo, não foi observado quando se comparou os animais C57Bl/6 em relação aos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} (FIGURA 9C). Ao comparar os animais C57Bl/6 em relação aos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} não foram encontradas diferenças em nenhuma das condições de cultura,

embora, na cultura estimulada, foi observada maior produção de TNF- α nos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} (p=0,0585; Mann Whitney) (FIGURA 9D).

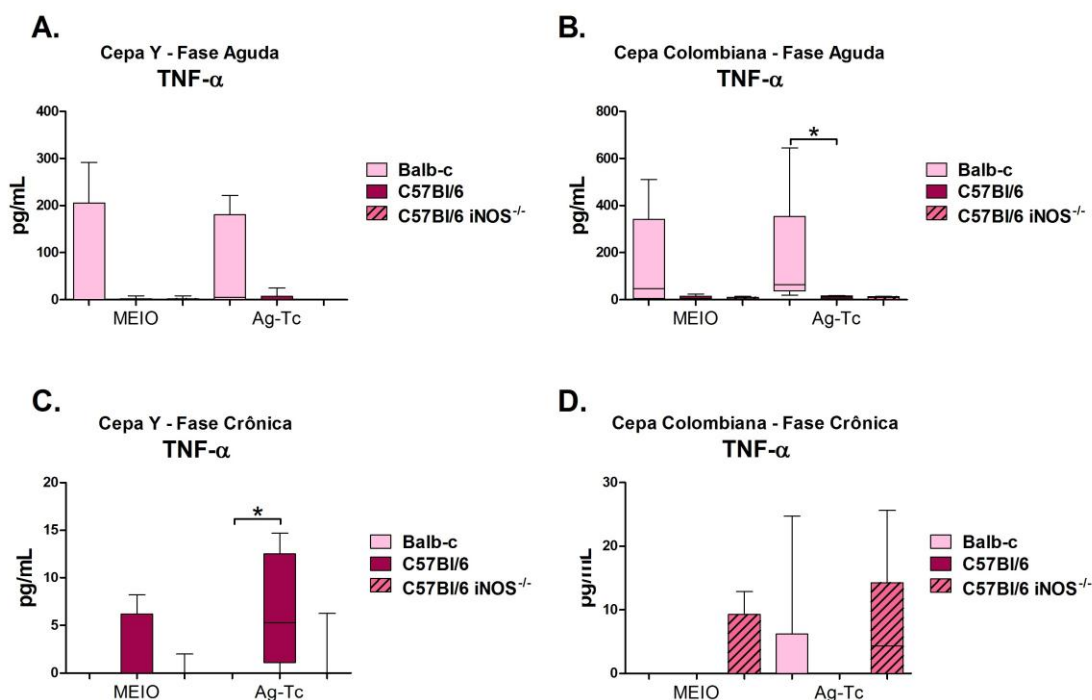


Figura 9 - Níveis de TNF- α (pg/mL) em sobrenadantes de cultura do baço de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-} não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de *T.cruzi* (Ag-Tc). **A.** Cepa Y, fase AGUDA; **B.** Cepa COLOMBIANA, fase AGUDA; **C.** Cepa Y, fase CRÔNICA; **D.** Cepa COLOMBIANA, fase CRÔNICA. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * (p<0,05), teste de Mann Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%

Na fase aguda da infecção com a cepa Y, a produção de IL-4 na cultura sem estímulo não apresentou diferença estatística entre os grupos, embora os animais C57Bl/6 apresentaram uma maior produção de IL-4 (p=0,057; Mann Whitney). No entanto, na cultura com estímulo Ag-Tc, foi observado que esses mesmos animais apresentaram níveis significativamente maiores de IL-4 quando comparado aos animais BALB-c e C57Bl/6 iNOS^{-/-} (p=0,0128 e p=0,0074 respectivamente; Mann Whitney) (FIGURA 10A). Nos animais infectados com a cepa Colombiana na cultura não estimulada foi observada uma produção significativamente maior de IL-4 pelos animais C57Bl/6 em relação aos animais BALB-c, (p=0,0053; Mann Whitney). Entretanto, comparando os animais C57Bl/6 com os animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} essa diferença não foi observada. Na cultura estimulada por Ag-Tc, não foi observada diferença significativa entre os grupos (Figura 10B).

Na fase crônica da infecção com a cepa Y foi observado que, na cultura não estimulada, os animais C57Bl/6 produziram níveis de IL-4 significativamente maiores quando comparados aos animais BALB-c ($p=0,039$; Mann Whitney). No entanto, na cultura estimulada com Ag-Tc, não foi observada diferença significativa entre os grupos (FIGURA 10C). Nos animais infectados com a cepa Colombiana não houve diferença significativa na cultura sem estímulo. No entanto, na cultura estimulada com Ag-Tc foram observados níveis de IL-4 significativamente maiores nos animais C57Bl/6 em relação aos animais BALB-c ($p=0,0073$; Mann Whitney), (Figura 10D).

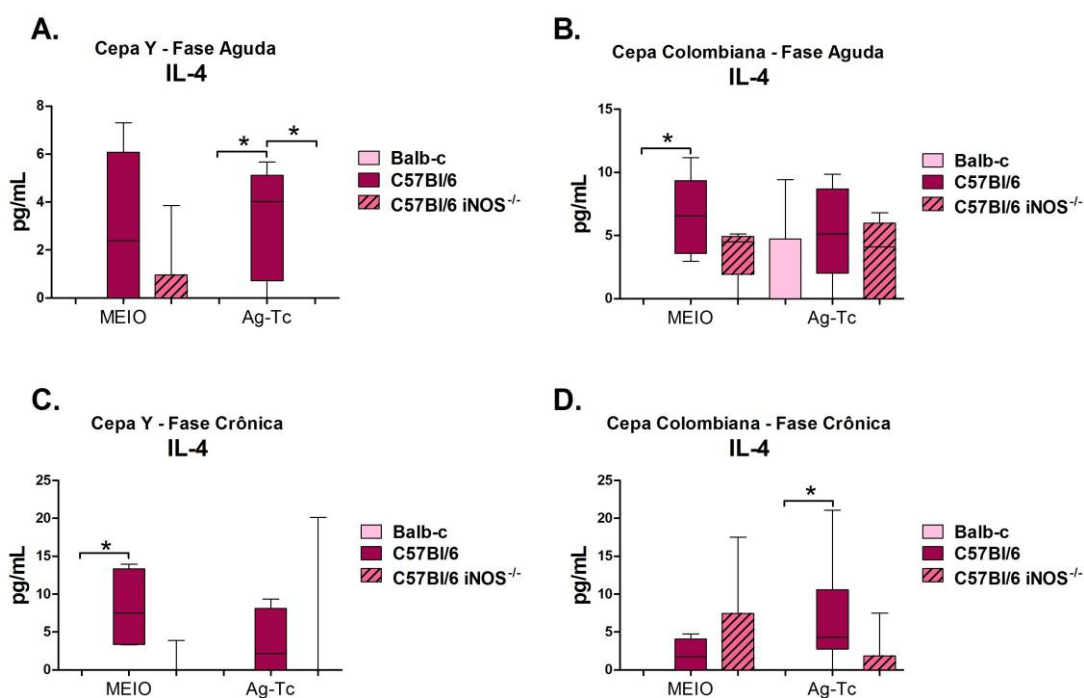


Figura 10 - Níveis de IL-4 (pg/mL) em sobrenadantes de cultura de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-} não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de *T.cruzi* (Ag-Tc). **A.** Cepa Y, fase AGUDA; **B.** Cepa COLOMBIANA, fase AGUDA; **C.** Cepa Y, fase CRÔNICA; **D.** Cepa COLOMBIANA, fase CRÔNICA. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de Mann Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%

Ao analisar a IL-10, na fase aguda da infecção pela cepa Y, foi observado que na cultura sem estímulo os animais C57Bl/6 produziram níveis significativamente maiores de IL-10 que os animais BALB-c ($p=0,0128$; Mann Whitney). Não foi observada diferença estatística entre os animais C57Bl/6 e os animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} nessa mesma condição de cultura (FIGURA 11A). Nos animais infectados com a cepa Colombiana, foi observada uma produção estatisticamente maior de IL-10 pelos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} em relação aos animais C57Bl/6, tanto na cultura não estimulada, quanto na estimulada com Ag-Tc ($p=0,0079$ e $p=0,0079$ respectivamente; Mann

Whitney). Na cultura estimulada foi observado também níveis maiores de IL-10 pelos animais C57Bl/6 em relação aos animais BALB-c ($p=0,0112$; Mann Whitney) (FIGURA 11B).

Na fase crônica da infecção pela cepa Y houve um aumento significativo na produção de IL-10 pelos animais C57Bl/6 $iNOS^{-/-}$ em relação aos animais C57Bl/6, tanto na cultura sem estímulo, assim como, após estimulação com Ag-Tc ($p=0,0021$ e $p=0,026$ respectivamente; Mann Whitney). Ao analisar os animais C57Bl/6 em relação aos animais BALB-c, foi observada uma produção significativamente maior de IL-10 pelos animais C57Bl/6 nas duas condições de cultura ($p=0,0021$ e $p=0,0022$ respectivamente; Mann Whitney) (FIGURA 11C). De forma semelhante, nos animais infectados com a cepa Colombiana durante a fase crônica o grupo C57Bl/6 $iNOS^{-/-}$ produziu níveis significativamente maiores de IL-10 quando comparados aos animais C57Bl/6 nas duas condições de cultura, tanto na ausência de Ag-Tc, quanto na presença do mesmo ($p=0,0062$ e $p=0,0050$ respectivamente; Mann Whitney) (FIGURA 11D).

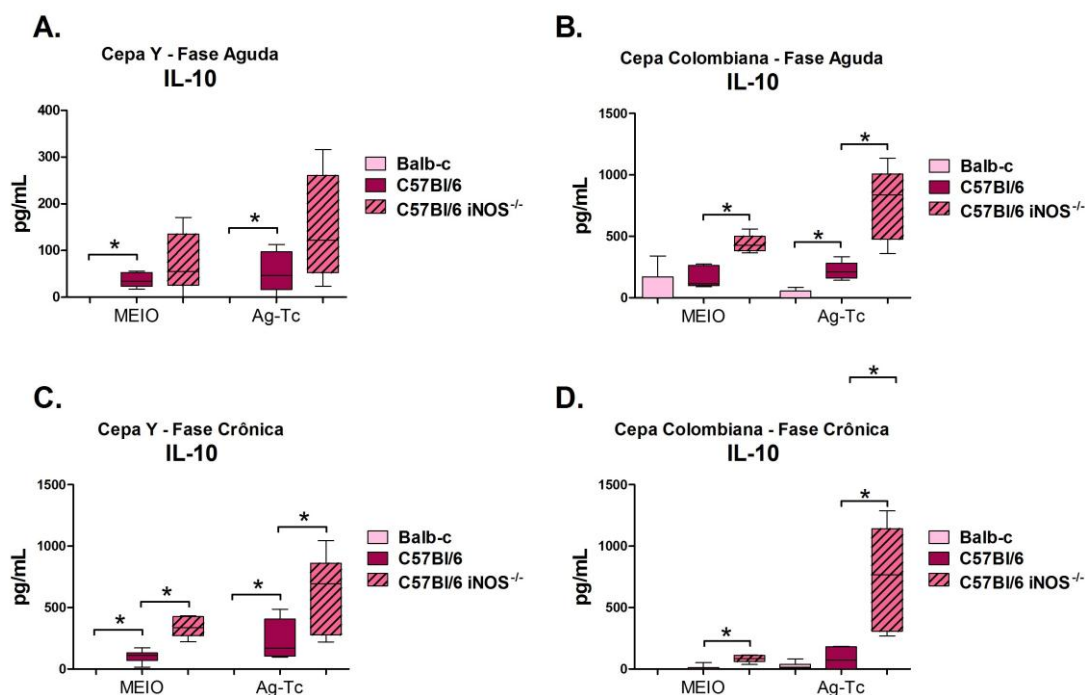
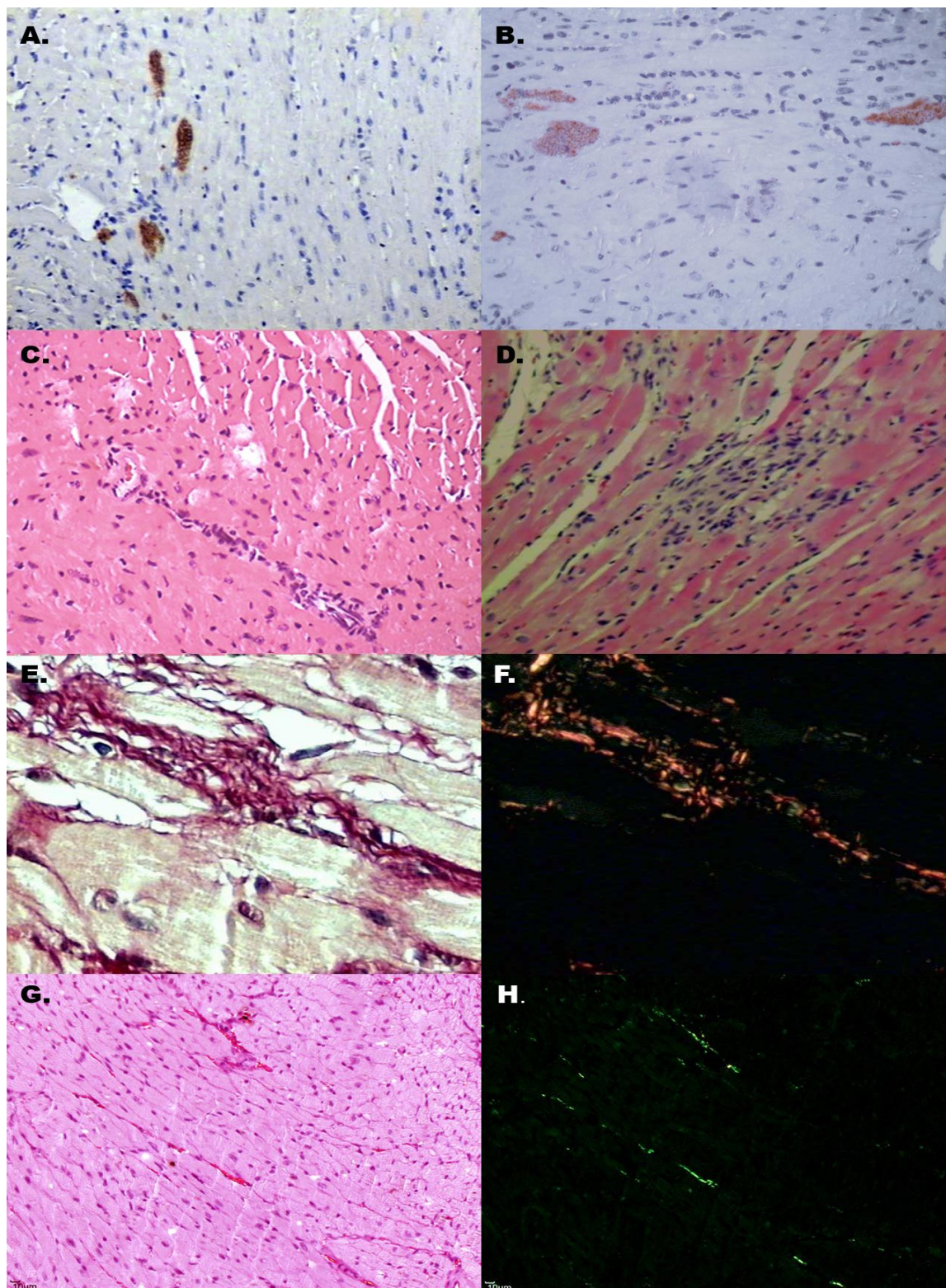


Figura 11 - Níveis de IL-10 (pg/mL) em sobrenadantes de cultura do baço de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 $iNOS^{-/-}$ não estimulados (MEIO) ou estimulados com antígeno de *T.cruzi* (Ag-Tc). **A.** Cepa Y, fase AGUDA; **B.** Cepa COLOMBIANA, fase AGUDA; **C.** Cepa Y, fase CRÔNICA; **D.** Cepa COLOMBIANA, fase CRÔNICA. Diferenças estatisticamente significativas estão marcadas com * ($p<0,05$), teste de Mann Whitney. As linhas horizontais representam as medianas, as barras representam os percentis 25-75% e as linhas verticais representam os percentis 10-90%.



Prancha 1 - Cortes histológicos de coração de camundongos BALB-c, C57Bl/6 e C57Bl/6 iNOS^{-/-}:

(A) Imunohistoquímica evidenciando ninho de *T. cruzi*, em animais C57Bl/6 na fase aguda (10X). (B) Imunohistoquímica evidenciando ninho de *T. cruzi*, em animais C57Bl/6 iNOS^{-/-}, na fase aguda (10X). (C) Infiltrado inflamatório no animal BALB-c, infectado com a cepa Y na fase aguda, (HE- 10X). (D) Infiltrado inflamatório no animal C57Bl/6, infectado com a cepa Colombiana na fase crônica (HE-10X). (E) Fibrose no animal BALB-c infectado com a cepa Colombiana na fase crônica (Picrosírius sob luz comum- 40X) (F) Mesmo campo visto sob luz polarizada (40X). (G) Fibrose no animal C57Bl/6 infectado com a cepa Colombiana na fase crônica (Picrosírius sob luz comum- 10X). (H) Mesmo campo visto sob luz polarizada (10X).

7. Discussão

No presente trabalho, foi estudado o comportamento de camundongos ditos susceptíveis e resistentes à infecção pelo *T. cruzi* relacionando a contribuição do óxido nítrico e de citocinas no desenvolvimento da inflamação, fibrose cardíaca nas fases aguda e crônica da infecção experimental com as cepas Y e Colombiana de *T. cruzi*.

Na Doença de Chagas, sabe-se que fator lesivo inicial é o parasitismo de miocardiócitos pelo *T. cruzi*. Em nossos resultados os animais C57Bl/6 apresentam maior número de formas amastigotas no tecido cardíaco na fase aguda em relação aos animais BALB-c, de forma independente da cepa inoculada, embora com maior densidade parasitária na cepa Colombiana. Camundongos BALB-c e C57Bl/6 têm sido usados como modelos de susceptibilidade e resistência a microorganismos intracelulares (APPELBERG *et al.*, 1994; HEINZEL *et al.*, 1998), embora, na infecção com *T. cruzi* esta dicotomia não seja claramente perceptível, e pareça estar intimamente relacionada com a cepa do parasito (WRIGHTSMAN *et al.*, 1982; ANDRADE *et al.*, 1985; SILVA *et al.*, 1992). Fatores como a genética do hospedeiro, expressão de moléculas relacionadas com inflamação e a carga parasitária também têm sido vistas como definidoras do curso da infecção (ROWLAND *et al.*, 1992; MARINHO *et al.*, 1999; HALL *et al.*, 2000).

De forma interessante no presente estudo, foi demonstrado maior cardiotropismo nos animais C57Bl/6, mesmo quando infectados com a cepa macrofagotrópica. Contudo, nos animais deficientes em NO foi observado que durante a infecção aguda com a cepa Y, esses, apresentaram menor parasitismo tissular cardíaco que os C57Bl/6, provavelmente, devido ao tropismo desta cepa pelo sistema fagocítico mononuclear, que nestes animais está privado de seu principal mecanismo microbicida, facilitando a multiplicação do parasita. Estudos anteriores, de detecção de DNA parasitário, já sugeriram que o cardiotropismo da cepa Colombiana é influenciado pela genética do camundongo, onde os BALB-c apresentam reduzida presença de material genético parasitário no coração e os C57Bl/6 apresentam elevado cardiomitropismo, apesar de sua resistência à infecção (ANDRADE *et al.*, 2002).

Embora estudos experimentais mostrem que o NO é um importante mediador da imunidade anti-*T. cruzi* durante a infecção aguda (VESPA *et al.*, 1994), e recentemente essa molécula foi associada à desnervação do plexo mioentérico do cólon de

camundongos infectados (ARANTES *et al.*, 2004), pouco se conhece de seus efeitos durante a fase crônica da infecção, especialmente no tecido cardíaco. No presente estudo, na infecção pela cepa Colombiana, observa-se um aumento significativo de ninhos no tecido cardíaco nos animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} que apresentam números de ninhos significativamente maiores que o animal C57Bl/6. Esses resultados se justificam, uma vez que, a cepa Colombiana apresenta parasitemia de evolução lenta, e com nítido miotropismo, sobretudo, com envolvimento de musculatura esquelética (ANDRADE *et al.*, 2000). Na fase crônica da infecção foram observados ninhos apenas nos animais infectados com a cepa Colombiana, embora em número reduzido, reforçando desta forma, sua natureza miotrópica. Diferenças na composição genética das diferentes cepas de *T. cruzi* seriam um dos maiores componentes determinantes do tropismo tissular (ANDRADE *et al.*, 1999). Estudos clássicos já haviam demonstrado que a cepa Y de *T. cruzi* se comporta diferentemente da cepa Colombiana em relação à virulência, tropismo e dano cardíaco, estando à cepa Y relacionada com tropismo pelo macrófago e maior virulência na fase aguda da infecção, e a cepa Colombiana com miotropismo e com patogenicidade na fase crônica (ANDRADE & RAMALHO, 1966; KUMAR *et al.*, 1969; MELO & BRENER, 1978; ANDRADE, 1990).

Apesar do número reduzido de ninhos de amastigotas cardíacos na fase aguda, demonstrado em nossos resultados, os animais BALB-c infectados com a cepa Y, apresentaram elevado percentual de infiltrado inflamatório, fenômeno não observado na infecção pela cepa Colombiana. Estudos anteriores, já haviam demonstrado baixa carga parasitária no coração de camundongos BALB-c e elevado infiltrado inflamatório cardíaco (ANDRADE *et al.*, 2002). Por outro lado, camundongos C57Bl/6 com presença de parasitos no coração apresentaram menor miocardite (ANDRADE *et al.*, 2002). No presente estudo, na fase crônica, os animais C57Bl/6 apresentaram aumento de miocardite, apesar dos poucos ninhos, fenômeno já relatado em estudos realizados em humanos (ANDRADE & RAMALHO, 1966).

Foi observado neste trabalho, que a capacidade da produção de NO não parece ser o fator determinante na miocardite destes animais, uma vez que, os animais C57Bl/6 iNOS^{-/-} apresentaram percentuais de miocardite semelhantes aos C57Bl/6, independente de cepa ou da fase em que se encontravam. Estudos anteriores, já apontavam que a ausência de iNOS não era fator determinante na intensidade da miocardite na infecção experimental aguda (BORGES *et al.*, 2009).

No presente estudo, os animais BALB-c apresentaram maior intensidade de

1 fibrose cardíaca que os C57Bl/6, tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da infecção
2 com a cepa Colombiana. A fibrose representa um dos mais importantes achados que
3 compromete a função contrátil cardíaca durante a fase crônica da infecção. Acredita-se
4 que seu desenvolvimento ocorra por substituição do tecido lesado, cumprindo a função
5 de preenchimento (LOPES & CHAPADEIRO, 1997). Na Doença de Chagas, existe
6 uma perda da massa contrátil, além de, uma desorganização das miocélulas, e esses
7 fatores estão associados à insuficiência cardíaca congestiva (LOPES & CHAPADEIRO,
8 1997). Com a evolução da inflamação, células presentes no tecido conjuntivo como
9 fibroblastos, começam a sintetizar colágeno para substituir o tecido lesado, formando
10 assim, a fibrose. A fase aguda da infecção é caracterizada por alguns autores por não
11 apresentar fibrose, ou a mesma ser cicatricial (LOPES *et al.*, 1981).

12 Com relação à influência do NO, no desenvolvimento de fibrose não foi
13 observada diferença entre os animais C57Bl/6 e os C57Bl/6 iNOS^{-/-}, mostrando que,
14 essa molécula não desempenha um papel chave no desenvolvimento de fibrose na
15 infecção chagásica experimental. Resultados semelhantes já foram observados pelo
16 nosso grupo na infecção chagásica aguda com cepa Colombiana (BORGES *et al.*,
17 2009). O NO têm sido apontado como uma molécula potencialmente anti-fibrótica, que
18 uma vez manifesta, poderia atenuar o desenvolvimento da fibrose observada nos casos
19 mais graves da cardiopatia chagásica crônica. Por outro lado, o NO está envolvido na
20 indução de apoptose, o que poderia contribuir para a destruição de miocélulas (SAM *et al.*,
21 2001).

22 Diferenças na susceptibilidade à infecção podem estar relacionadas com
23 diferenças quantitativas e qualitativas de mecanismos imunológicos (SUNNEMARK *et al.*,
24 1996; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 1998; POWELL *et al.*, 1998; ANDRADE *et al.*,
25 2002; ROGGERO *et al.*, 2002). O comportamento de camundongos BALB-c e C57Bl/6
26 frente à infecção com *T.cruzi* seria determinado pelo perfil de citocinas, influenciando a
27 carga parasitária apresentada nestes animais (ROGGERO *et al.*, 2002).

28 No presente estudo foi demonstrado que a produção IFN- γ não está diretamente
29 relacionada à susceptibilidade ou resistência do hospedeiro, e sim, com a cepa do
30 parasita. Foi observado que, na infecção com a cepa Y, tanto na fase crônica quanto na
31 fase aguda, os animais C57Bl/6 se mostraram melhores produtores de IFN- γ . Em
32 contrapartida, na infecção com a cepa Colombiana os animais BALB-c mudam de
33 comportamento e se mostram melhores produtores de IFN- γ . Em modelo de infecção
34 com cepa cardiotrópica não foi observada diferenças na produção de IFN- γ na fase

aguda da infecção (15 dias) entre camundongos BALB-c e C57Bl/6, embora os C57Bl/6 produzissem quantidades significativamente maiores de TNF- α e os BALB-c de IL-10 (ROGGERO *et al.*, 2002). Estudos prévios demonstraram uma produção equivalente de IFN- γ por esplenócitos de camundongos resistentes e susceptíveis à infecção chagásica, embora a produção de IL-4 na fase aguda tenha sido maior naqueles susceptíveis (NABORS & TARLETON, 1991; HOFT *et al.*, 1993). Outro estudo demonstrou que a IL-12 e o IFN- γ seriam essenciais na resistência ao *T.cruzi* na fase aguda da infecção (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001).

Quanto ao papel da iNOS na produção de IFN- γ pelos animais C57Bl/6 foi observado em nosso estudo, que na infecção com a cepa Y, esta cepa tem um importante papel na fase aguda da infecção, onde sua ausência causa redução na produção de IFN- γ . Esta tendência a menores níveis não é reflexo de deficiência destes animais em produzir IFN- γ , uma vez que, relatos anteriores demonstram, que estes, conservam esta capacidade (HESSE *et al.*, 2000). De maneira oposta, o efeito da iNOS na infecção com a cepa Colombiana é percebida apenas na fase crônica da infecção, onde os camundongos C57Bl/6 iNOS^{-/-} produzem níveis significativamente mais elevados de IFN- γ . Esta superprodução, talvez, seja reflexo de uma tentativa do sistema imune de controlar o parasitismo na ausência de NO.

A produção de TNF- α no presente estudo foi maior na fase aguda que na crônica da infecção. Estudos *in vitro* já demonstraram o importante papel do TNF- α no controle da replicação parasitária intramacróforo, especialmente na fase aguda da infecção (WIRTH & KIERSZENBAUM, 1988; SILVA *et al.*, 1995; LIMA *et al.*, 1997). Ao mesmo tempo, níveis elevados de TNF- α , estão também associados com destruição tissular, caquexia e morte (TRUYENS *et al.*, 1995; HOLSCHER *et al.*, 2000; ROGGERO *et al.*, 2002; PEREZ *et al.*, 2005).

Em nosso estudo, foi observado que os animais BALB-c foram os melhores produtores de TNF- α , na fase aguda, independente da cepa. Foi observado que a ausência de iNOS não modificou o padrão de produção de TNF- α pelos camundongos C57Bl/6. Citocinas pró-inflamatórias, especialmente o TNF- α , estão envolvidas na disfunção miocárdica na fase aguda da Doença de Chagas (CHANDRASEKAR *et al.*, 1998). Já na fase crônica, os camundongos C57Bl/6 foram melhores produtores de TNF- α que os BALB-c na infecção com a cepa Y. Estudos utilizando bloqueio farmacológico do TNF- α na fase crônica da infecção chagásica experimental demonstram que sua ausência potencializa os níveis de IL-10 e reduz os danos

cardíacos, provavelmente por redução do exsudato inflamatório no miocárdio (BILATE *et al.*, 2007; PEREZ *et al.*, 2009). Da mesma forma, este bloqueio diminui a formação de colágenos tipo I e III e metaloproteinases (GURANTZ *et al.*, 2005) e parece não influenciar na expressão de IFN- γ (BILATE *et al.*, 2007).

No presente estudo, foi observada maior produção de colágeno pelos animais BALB-c, tanto na fase aguda, quanto na crônica da infecção, esses animais na fase aguda, se mostraram melhores produtores de TNF- α , citocina relacionada com produção de colágeno. Estudos anteriores já haviam tentado demonstrar que o destino do animal crônico é definido na fase aguda, embora, jogando um papel essencial à carga parasitária (MARINHO *et al.*, 1999). Na fase crônica, foi observada baixa produção de TNF- α em todos os grupos, fato que pode ser reforçado, devido o TNF- α ter um papel importante no controle da parasitemia na fase aguda da infecção (SILVA, 1995).

Neste estudo, foram observados níveis muito baixos de IL-4 em todos os animais, cerca de cem vezes menores que os níveis de IFN- γ . Isso provavelmente explica porque, os animais C57Bl/6, mesmo sendo melhores produtores de IL-4 não reverteram ao padrão de susceptibilidade. Alguns autores, utilizando transferência de clones de células T produtoras de IL-4 e IL-10 mostraram o potencial destas células em reverter um perfil inicial de resistência de camundongos C57Bl/6 para um padrão de susceptibilidade, com alta parasitemia e elevada mortalidade (BARBOSA DE OLIVEIRA *et al.*, 1996).

Da mesma forma, os animais C57Bl/6 em nosso estudo, foram os melhores produtores de IL-10, seguindo paralelamente à produção de IFN- γ quando infectados com a cepa Y. A elevação simultânea de IFN- γ e IL-10 têm sido demonstrada, em estudos de infecções com patógenos intracelulares, tendo a IL-10 nessa situação, uma função benéfica no controle parasitário e na prevenção de danos por inflamação exagerada (BOHN *et al.*, 1994; PIE *et al.*, 1996; ROGGERO *et al.*, 2002). A ausência de iNOS pode ter potencializado a produção de IL-10 em todas as fases, e em ambas as cepas, de maneira independente da produção de IFN- γ . Além de seus efeitos tripanocidas, o NO, também está associado a um mecanismo de imunossupressão na fase aguda infecção experimental pelo *T. cruzi* (MARTINS *et al.*, 1998). No presente estudo, foi observado que este efeito, provavelmente se dá por mecanismos diversos da produção de IL-10, uma vez que a ausência do NO, parece ter potencializado sua produção, em ambas as fases e independente do tropismo da cepa.

A relação inflamação/antiinflamação, refletida pelo balanço IFN- γ /IL-10, nos animais C57Bl/6 e BALB-c, é completada pela presença de fibrose no tecido cardíaco, especialmente na infecção com cepa miotrópica. Foi observado nesse estudo, que os animais melhores produtores de IFN- γ e com baixa produção de IL-10 apresentam elevada fibrose, reflexo provavelmente da destruição contínua de miocélulas, posteriormente reparada pela produção de colágeno. Por outro lado, os animais C57Bl/6, provavelmente, por controlar de forma mais eficaz os efeitos patológicos da inflamação, apresentam menor área de fibrose cardíaca na fase crônica da infecção. Já na infecção com cepa macrofagotrópica não se observou diferenças entre os animais em nenhuma das fases. Estudos prévios, já haviam encontrado percentual semelhante de fibrose cardíaca na fase crônica da infecção chagásica experimental com a cepa cardiotrópica (BILATE *et al.*, 2007). A cepa Colombiana é uma cepa miotrópica e induz inflamação cardíaca com maior intensidade. Trabalhos comparando as cepas Y, Colombiana e São Felipe (12SF) na indução de lesão cardíaca mostraram que a cepa Colombiana produz lesões cardíacas crônicas mesmo com baixo inóculo, em relação às cepas Y e 12SF (CHAPADEIRO *et al.*, 1988; ANDRADE *et al.*, 2006).

Embora a carga parasitária e o exsudato inflamatório tenham variado entre as fases aguda e crônica da infecção, o perfil de produção de citocinas e a fibrose observada nos animais C57Bl/6, C57Bl/6 iNOS^{-/-} e BALB-c frente a cada cepa se mostraram similar nas diferentes fases. Se, por um lado, os animais respondem de forma diversa dependendo do tropismo da cepa, foi demonstrado nesse trabalho, que os fenômenos imunopatológicos vistos na fase crônica já são direcionados desde a fase aguda da infecção.

8. Considerações Finais

Foi encontrado um maior parasitismo tecidual cardíaco na fase aguda, com ambas as cepas, nos animais C57Bl/6. A ausência de iNOS diminuiu os ninhos cardíacos na infecção com a cepa Y e aumentou na infecção com a cepa Colombiana;

Os animais BALB-c infectados com a cepa Y, apresentaram maior miocardite na fase aguda da infecção, que os C57Bl/6. Na fase crônica, os animais C57Bl/6 apresentaram miocardite mais intensa que os BALB-c na infecção com a cepa Colombiana;

A intensidade da fibrose se mostrou diferente entre os animais somente na infecção com a cepa Colombiana, sendo maior nos animais BALB-c e não relacionada com a deficiência de iNOS nos animais C57Bl/6;

Os níveis de IFN- γ foram maiores nos animais C57Bl/6 infectados com a cepa Y, e na infecção com a cepa Colombiana, foi maior nos animais BALB-c. A ausência de iNOS potencializou a produção de IFN- γ na infecção crônica com a cepa Colombiana;

Os níveis de TNF- α foram maiores nos animais BALB-c na fase aguda da infecção com ambas as cepas;

Os níveis de IL-4 foram maiores nos animais C57Bl/6, embora em níveis muito baixos;

Os níveis de IL-10, em todas as fases e, com ambas as cepas, foram maiores nos animais C57Bl/6, e a ausência de iNOS potencializou esta produção.

9. Conclusões

Os animais BALB-c apresentaram maior comprometimento cardíaco em relação aos C57Bl/6, provavelmente como reflexo do desequilíbrio entre citocinas pró-inflamatórias e antiinflamatórias, sendo mais evidente na infecção com a cepa Colombiana. A ausência do óxido nítrico parece não influenciar diretamente no desenvolvimento das lesões cardíacas.

Referências

ABBAS, A.; LICHTMAN, A.; POBER, J. **Cellular and molecular immunology**. 6. Philadelphia. 2005. p.553

ABRAHAMSOHN, I. A.; COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp Parasitol**. 84 (2); 231-44; 1996.

ABRAHAMSOHN, I. A. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res**. 31 (1); 117-21; 1998.

ALCANTARA, A.; BRENER, Z. The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. **Acta Trop**. 35 (3); 209-19; 1978.

ANDERSEN, M. L. **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**. São Paulo. Universidade Federal de São Paulo, 2004.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. **Mol Biochem Parasitol**. 100 (2); 163-72; 1999.

ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E.; PENA, S. D.; MACEDO, A. M. *Trypanosoma cruzi*: role of host genetic background in the differential tissue distribution of parasite clonal populations. **Exp Parasitol**. 100 (4); 269-75; 2002.

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

ANDRADE, S. G.; GRIMAUD, J. A.; STOCKER-GUERRET, S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am J Trop Med Hyg**. 40 (3); 252-60; 1989.

ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 85 (1); 17-27; 1990.

ANDRADE, S. G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A. S.; GRIMAUD, J. A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 86 (2); 187-200; 1991.

ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Revista da Sociedade de Medicina Tropical**. 31 27-35; 1997.

ANDRADE, S. G.; PIMENTEL, A. R.; DE SOUZA, M. M.; ANDRADE, Z. A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg**. 63 (1-2); 64-70; 2000.

ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; SOBRAL, K. S.; MAGALHAES, J. B.; GUEDES, R. S.; GUERREIRO, M. L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biodemes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev Soc Bras Med Trop**. 39 (1); 1-8; 2006.

ANDRADE, V.; BARRAL-NETTO, M.; ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz J Med Biol Res**. 18 (4); 499-506; 1985.

ANDRADE, Z. A.; RAMALHO, C. M. P. Miocardite chagásica. Estudo morfológico de 38 casos comprovados pelo encontro de parasitos nas secções histológicas. **Gaz. Med. Bahia**. 66 55-67; 1966.

ANDRADE, Z. A. Mechanism of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. **Ciba Found Symp**. 99 214-233; 1983.

ANDRADE, Z. A.; SILVA, H. R. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 90 (4); 521-2; 1995.

APPELBERG, R.; CASTRO, A. G.; PEDROSA, J.; SILVA, R. A.; ORME, I. M.; MINOPRIO, P. Role of gamma interferon and tumor necrosis factor alpha during T-cell-independent and -dependent phases of *Mycobacterium avium* infection. **Infect Immun**. 62 (9); 3962-71; 1994.

ARANTES, R. M.; MARCHE, H. H.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Am J Pathol**. 164 (4); 1361-8; 2004.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. **Doença de Chagas: Manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro. Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, 2000. p.366

ARETZ, H. T. Myocarditis: the Dallas criteria. **Hum Pathol**. 18 (6); 619-24; 1987.

- AUGUSTO-PINTO, L.; TEIXEIRA, S. M.; PENA, S. D.; MACHADO, C. R. Single-nucleotide polymorphisms of the *Trypanosoma cruzi* MSH2 gene support the existence of three phylogenetic lineages presenting differences in mismatch-repair efficiency. **Genetics**. 164 (1); 117-26; 2003.
- BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. A.; ROCHA, M. O.; MOREIRA, M. C.; LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M., *et al.* IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology? **Braz J Med Biol Res**. 31 (1); 127-31; 1998.
- BANCHEREAU, J.; DEFRANCE, T.; GALIZZI, J. P.; MIOSSEC, P.; ROUSSET, F. Human interleukin 4. **Bull Cancer**. 78 (3); 299-306; 1991.
- BARBOSA DE OLIVEIRA, L. C.; CUROTTO DE LAFAILLE, M. A.; COLLET DE ARAUJO LIMA, G. M.; DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I. Antigen-specific IL-4- and IL-10-secreting CD4+ lymphocytes increase in vivo susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **Cell Immunol**. 170 (1); 41-53; 1996.
- BILATE, A. M.; SALEMI, V. M.; RAMIRES, F. J.; DE BRITO, T.; RUSSO, M.; FONSECA, S. G., *et al.* TNF blockade aggravates experimental chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Microbes Infect**. 9 (9); 1104-13; 2007.
- BOHN, E.; HEESEMANN, J.; EHLERS, S.; AUTENRIETH, I. B. Early gamma interferon mRNA expression is associated with resistance of mice against *Yersinia enterocolitica*. **Infect Immun**. 62 (7); 3027-32; 1994.
- BOOM, W. H.; LIANO, D.; ABBAS, A. K. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes. II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B lymphocytes. **J Exp Med**. 167 (4); 1350-63; 1988.
- BORGES, C. R.; RODRIGUES JUNIOR, V.; DOS REIS, M. A.; CASTELLANO, L. R.; CHICA, J. E.; PEREIRA, S. A., *et al.* [Role of nitric oxide in the development of cardiac lesions during the acute phase of experimental infection by *Trypanosoma cruzi*]. **Rev Soc Bras Med Trop**. 42 (2); 170-4; 2009.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop**. 4 389- 396; 1962.
- BRENER, Z.; CHIARI, E. [Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*.]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**. 5 220-4; 1963.
- BRENER, Z. (Comparative Studies of Different Strains of *Trypanosoma Cruzi*.). **Ann Trop Med Parasitol**. 59 19-26; 1965.

- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. **Annu Rev Microbiol.** 27 347-82; 1973.
- BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL-NETO, M. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 2000. p.431
- BRISSE, S.; DUJARDIN, J. C.; TIBAYRENC, M. Identification of six *Trypanosoma cruzi* lineages by sequence-characterised amplified region markers. **Mol Biochem Parasitol.** 111 (1); 95-105; 2000.
- BRODSKY, C. L.; BARRAL-NETO, M. **Resposta Imune Humana na Doença de Chagas**.in *Trypanosoma Cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 2000. 170-174.
- BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. **Annu Rev Microbiol.** 49 175-200; 1995.
- CHAGAS, C. nova espécie morbida do homem, produzida por um trypanosoma (*Trypanosoma cruzi*). **Brazil Médico.** 22 1909.
- CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; COLSTON, J. T.; FREEMAN, G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducible nitric oxide synthase in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am J Pathol.** 152 (4); 925-34; 1998.
- CHAPADEIRO, E.; BERALDO, P. S.; JESUS, P. C.; OLIVEIRA JUNIOR, W. P.; JUNQUEIRA JUNIOR, L. F. [Cardiac lesions in Wistar rats inoculated with various strains of *Trypanosoma cruzi*]. **Rev Soc Bras Med Trop.** 21 (3); 95-103; 1988.
- COFFMAN, R. L. Immunoregulation by helper T cell subsets. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 83 Suppl 1 264-7; 1988.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 104 Suppl 1 31-40; 2009.
- CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N., *et al.* Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 92 (8); 3541-5; 1995.
- CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; XU, D.; CHARLES, I.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S. Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine macrophages. **Eur J Immunol.** 23 (6); 1385-8; 1993.

D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N. M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. **J Exp Med.** 178 (3); 1041-8; 1993.

DALMASSO, A. P.; JARVINEN, J. A. Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. **Infect Immun.** 28 (2); 434-40; 1980.

DE FREITAS, J. M.; AUGUSTO-PINTO, L.; PIMENTA, J. R.; BASTOS-RODRIGUES, L.; GONCALVES, V. F.; TEIXEIRA, S. M., *et al.* Ancestral genomes, sex, and the population structure of *Trypanosoma cruzi*. **PLoS Pathog.** 2 (3); e24; 2006.

DE WAAL MALEFYT, R.; HAANEN, J.; SPITS, H.; RONCAROLO, M. G.; TE VELDE, A.; FIGDOR, C., *et al.* Interleukin 10 (IL-10) and viral IL-10 strongly reduce antigen-specific human T cell proliferation by diminishing the antigen-presenting capacity of monocytes via downregulation of class II major histocompatibility complex expression. **J Exp Med.** 174 (4); 915-24; 1991.

DIAS, J. C. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review. **Rev Soc Bras Med Trop.** 22 (3); 147-56; 1989.

DIAS, J. C. [Globalization, inequity and Chagas disease]. **Cad Saude Publica.** 23 Supl 1 S13-22; 2007.

FEDERICI, E. E.; ABELMANN, W. H.; NEVA, F. A. Chronic and Progressive Myocarditis and Myositis in C3h Mice Infected with *Trypanosoma Cruzi*. **Am J Trop Med Hyg.** 13 272-80; 1964.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. The Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of posaconazole in a murine model of acute Chagas' disease is less dependent on gamma interferon than that of benznidazole. **Antimicrob Agents Chemother.** 51 (4); 1359-64; 2007.

FIORENTINO, D. F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T. R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. **J Immunol.** 147 (11); 3815-22; 1991.

FREITAS, J. L. P.; LION, N. F.; TARTARI, J. T. A. Resultados de uma investigação sobre moléstia de Chagas realizada no município de Marília e outros, com estudo clínico de dois casos agudos da doença. **Rev. Hosp. Clin. Fac. Med. Univ. São Paulo.** 8 81-92; 1953.

GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L.; SHER, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur J Immunol.** 22 (10); 2501-6; 1992.

GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends Parasitol.** 19 (1); 19-22; 2003.

GOLDEN, J. M.; TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. **Exp Parasitol.** 72 (4); 391-402; 1991.

GONCALVES DA COSTA, S. C.; LAGRANGE, P. H.; HURTREL, B.; KERR, I.; ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. **Ann Immunol (Paris).** 135C (3); 317-32; 1984.

GREEN, S. J.; MELLOUK, S.; HOFFMAN, S. L.; MELTZER, M. S.; NACY, C. A. Cellular mechanisms of nonspecific immunity to intracellular infection: cytokine-induced synthesis of toxic nitrogen oxides from L-arginine by macrophages and hepatocytes. **Immunol Lett.** 25 (1-3); 15-9; 1990.

GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; DE VRIES, J. E., *et al.* A CD4⁺ T-cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses and prevents colitis. **Nature.** 389 (6652); 737-42; 1997.

GURANTZ, D.; YNDESTAD, A.; HALVORSEN, B.; LUNDE, O. V.; OMENS, J. H.; UELAND, T., *et al.* Etanercept or intravenous immunoglobulin attenuates expression of genes involved in post-myocardial infarction remodeling. **Cardiovasc Res.** 67 (1); 106-15; 2005.

HALL, B. S.; TAM, W.; SEN, R.; PEREIRA, M. E. Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite *Trypanosoma cruzi* promotes resistance to intracellular infection. **Mol Biol Cell.** 11 (1); 153-60; 2000.

HEINZEL, F. P.; RERKO, R. M.; HUJER, A. M. Underproduction of interleukin-12 in susceptible mice during progressive leishmaniasis is due to decreased CD40 activity. **Cell Immunol.** 184 (2); 129-42; 1998.

HESSE, M.; CHEEVER, A. W.; JANKOVIC, D.; WYNN, T. A. NOS-2 mediates the protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a Th2 model of granulomatous disease. **Am J Pathol.** 157 (3); 945-55; 2000.

- HEVEL, J. M.; WHITE, K. A.; MARLETTA, M. A. Purification of the inducible murine macrophage nitric oxide synthase. Identification as a flavoprotein. **J Biol Chem.** 266 (34); 22789-91; 1991.
- HIGUCHI, M. D.; RIES, M. M.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G., *et al.* Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg.** 56 (5); 485-9; 1997.
- HOFT, D. F.; LYNCH, R. G.; KIRCHHOFF, L. V. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 151 (12); 7038-47; 1993.
- HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect Immun.** 66 (3); 1208-15; 1998.
- HOLSCHER, C.; MOHRS, M.; DAI, W. J.; KOHLER, G.; RYFFEL, B.; SCHAUB, G. A., *et al.* Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. **Infect Immun.** 68 (7); 4075-83; 2000.
- HSU, D. H.; DE WAAL MALEFYT, R.; FIORENTINO, D. F.; DANG, M. N.; VIEIRA, P.; DE VRIES, J., *et al.* Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. **Science.** 250 (4982); 830-2; 1990.
- HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M., *et al.* IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** 158 (7); 3311-6; 1997.
- JAMES, S. L.; KIPNIS, T. L.; SHER, A.; HOFF, R. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. **Infect Immun.** 35 (2); 588-93; 1982.
- JU, H.; DIXON, I. M. Extracellular matrix and cardiovascular diseases. **Can J Cardiol.** 12 (12); 1259-67; 1996.
- 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.** 116 (5); 1208-11; 1976.

KIERSZENBAUM, F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. **FEMS Immunol Med Microbiol.** 37 (1); 1-11; 2003.

KUMAR, R.; KLINE, I. K.; ABELMANN, W. H. Experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis: relative effects upon the right and left ventricles. **Am J Pathol.** 57 (1); 31-48; 1969.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. The relative contribution of antibody production and CD8+ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 20 (5); 207-16; 1998.

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol.** 166 (7); 4596-603; 2001.

LANGERMANS, J. A.; VAN DER HULST, M. E.; NIBBERING, P. H.; VAN FURTH, R. Endogenous tumor necrosis factor alpha is required for enhanced antimicrobial activity against *Toxoplasma gondii* and *Listeria monocytogenes* in recombinant gamma interferon-treated mice. **Infect Immun.** 60 (12); 5107-12; 1992.

LEON, J. S.; ENGMAN, D. M. The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease. **Front Biosci.** 8 e315-22; 2003.

LEVITUS, G.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; VAN REGENMORTEL, M. H.; LEVIN, M. J. Humoral autoimmune response to ribosomal P proteins in chronic Chagas heart disease. **Clin Exp Immunol.** 85 (3); 413-7; 1991.

LIMA, E. C.; GARCIA, I.; VICENTELLI, M. H.; VASSALLI, P.; MINOPRIO, P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect Immun.** 65 (2); 457-65; 1997.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W. L.; ALMEIDA, A. O.; ABRAÃO, D. Peso do coração e tipo de morte no chagásico crônico. **Rev Inst Med Trop São Paulo.** 12 (5); 293-97; 1970.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; ANDRADE, Z. A.; ALMEIDA, H. O.; ROCHA, A. [Pathological anatomy of hearts from asymptomatic Chagas disease patients dying in a violent manner]. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 76 (2); 189-97; 1981.

LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. **Anatomia patológica da doença de Chagas humana.** in Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. Rio de Janeiro, Fiocruz. 1997. 67-84.

MACEDO, A. M.; MARTINS, M. S.; CHIARI, E.; PENA, S. D. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: a new tool for characterization of strains and clones. **Mol Biochem Parasitol.** 55 (1-2); 147-53; 1992.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 99 (1); 1-12; 2004.

MADY, C.; PEREIRA BARRETTO, A. C. P. Biópsia endomiocárdica na forma indeterminada da doença de Chagas. **Arq. Bras. Cardiol.** 36 387; 1981.

MANDARIM-DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da Academia Brasileira de Ciências.** 75 469-486; 2003.

MARIN-NETO, J. A.; CUNHA-NETO, E.; MACIEL, B. C.; SIMOES, M. V. Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation.** 115 (9); 1109-23; 2007.

MARINHO, C. R.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; GRISOTTO, M. G.; ALVAREZ, J. M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infect Immun.** 67 (1); 308-18; 1999.

MARLETTA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S. Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate. **Biochemistry.** 27 (24); 8706-11; 1988.

MARTINS, G. A.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Immunol Lett.** 63 (2); 113-20; 1998.

MAYER, B.; SCHMIDT, K.; HUMBERT, P.; BOHME, E. Biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca^{2+} -dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. **Biochem Biophys Res Commun.** 164 (2); 678-85; 1989.

MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J Parasitol.** 64 (3); 475-82; 1978.

MENEZES, H. [Histological lesions in vaccinated mice with nonvirulent strain of *Trypanosoma cruzi*]. **Rev Bras Med.** 25 (3); 160-5; 1968.

MEZADRI, T. J.; THOMÁZ, V. A.; AMARAL, V. L. L. **Animais de laboratório: cuidados na iniciação experimental**. Florianópolis. UFSC, 2004.

MICHAILOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol.** 159 (5); 1723-33; 2001.

MICHALANY, J. **Métodos selecionados de colorações e de impregnações argênticas**.in Técnica Histológica em Anatomia Patológica. São Paulo, Pedagogia e Universitária. 1980. 123-180.

MILES, M. A.; LANHAM, S. M.; DE SOUZA, A. A.; POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 74 (2); 221-37; 1980.

MINOPRIO, P.; BANDEIRA, A.; PEREIRA, P.; MOTA SANTOS, T.; COUTINHO, A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine T. cruzi infection. **Int Immunol.** 1 (2); 176-84; 1989a.

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

MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M. C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A., *et al.* Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **J Immunol.** 151 (8); 4200-8; 1993.

MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 77 (11); 6810-4; 1980.

MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J Immunol.** 136 (7); 2348-57; 1986.

MOSMANN, T. R.; MOORE, K. W. The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. **Immunol Today.** 12 (3); A49-53; 1991.

MULLIGAN, M. S.; HEVEL, J. M.; MARLETTA, M. A.; WARD, P. A. Tissue injury caused by deposition of immune complexes is L-arginine dependent. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 88 (14); 6338-42; 1991.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol.** 22 (2); 301-7; 1992a.

MUNOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunol Lett.** 33 (1); 35-40; 1992b.

NABORS, G. S.; TARLETON, R. L. Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** 146 (10); 3591-8; 1991.

O'GARRA, A.; CHANG, R.; GO, N.; HASTINGS, R.; HAUGHTON, G.; HOWARD, M. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. **Eur J Immunol.** 22 (3); 711-7; 1992.

PACKCHANIAN, A. On the Cultivation of Seven Species of Trypanosomes in Vitro. **Science.** 80 (2079); 407-408; 1934.

PEREIRA BARRETTO, A. C.; MADY, C.; ARTEAGA-FERNANDEZ, E.; STOLF, N.; LOPES, E. A.; HIGUCHI, M. L., *et al.* Right ventricular endomyocardial biopsy in chronic Chagas' disease. **Am Heart J.** 111 (2); 307-12; 1986.

PEREZ, A. R.; TAMAE-KAKAZU, M.; PASCUTTI, M. F.; ROGGERO, E.; SERRA, E.; REVELLI, S., *et al.* 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.** 77 (16); 1945-59; 2005.

PEREZ, A. R.; FONTANELLA, G. H.; NOCITO, A. L.; REVELLI, S.; BOTTASSO, O. A. Short treatment with the tumour necrosis factor-alpha blocker infliximab diminishes chronic chagasic myocarditis in rats without evidence of *Trypanosoma cruzi* reactivation. **Clin Exp Immunol.** 157 (2); 291-9; 2009.

PIE, S.; MATSIOTA-BERNARD, P.; TRUFFA-BACHI, P.; NAUCIEL, C. Gamma interferon and interleukin-10 gene expression in innately susceptible and resistant mice during the early phase of *Salmonella typhimurium* infection. **Infect Immun.** 64 (3); 849-54; 1996.

PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; PONS, F. G.; FALCOFF, E.; EISEN, H. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Eur J Immunol.** 14 (10); 930-5; 1984.

PLATA, F.; GARCIA-PONS, F.; WIETZERBIN, J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. **Ann Inst Pasteur Immunol.** 138 (3); 397-415; 1987.

POWELL, M. R.; MORGAN, J.; GUARNER, J.; COLLEY, D. G. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 20 (10); 463-71; 1998.

PRATA, A. [Classification of Chagas' infection in humans]. **Rev Soc Bras Med Trop.** 23 (2); 109-13; 1990.

RASSI, A. **Clínica: fase aguda.** in *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan. 1979. 249-264.

REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J Immunol.** 140 (12); 4342-7; 1988.

REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H.; MORRISSEY, P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J Immunol.** 153 (7); 3135-40; 1994.

RIBEIRO-DOS SANTOS, R.; ROSSI, M. A. **Imunopatologia.** in CARDIOPATIA CHAGASICA. BELO HORIZONTE, FUNDACAO CARLOS CHAGAS. 1985. 10-22.

ROGGERO, E.; PEREZ, A.; TAMAE-KAKAZU, M.; PIAZZON, I.; NEPOMNASCHY, I.; WIETZERBIN, J., *et al.* 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.** 128 (3); 421-8; 2002.

ROMANHA, A. J.; DA SILVA PEREIRA, A. A.; CHIARI, E.; KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. **Comp Biochem Physiol B.** 62 (2); 139-42; 1979.

ROWLAND, E. C.; LOZYKOWSKI, M. G.; MCCORMICK, T. S. Differential cardiac histopathology in inbred mouse strains chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Parasitol.** 78 (6); 1059-66; 1992.

SADIGURSKY, M.; ACOSTA, A. M.; SANTOS-BUCH, C. A. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. **Am J Trop Med Hyg.** 31 (5); 934-41; 1982.

SALGAME, P.; ABRAMS, J. S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R. L., *et al.* Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. **Science.** 254 (5029); 279-82; 1991.

SAM, F.; SAWYER, D. B.; XIE, Z.; CHANG, D. L.; NGOY, S.; BRENNER, D. A., *et al.* Mice lacking inducible nitric oxide synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death late after myocardial infarction. **Circ Res.** 89 (4); 351-6; 2001.

SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. **J Exp Med.** 140 (1); 38-53; 1974.

SARDINHA, L. R.; ELIAS, R. M.; MOSCA, T.; BASTOS, K. R.; MARINHO, C. R.; D'IMPERIO LIMA, M. R., *et al.* Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** 74 (4); 2031-42; 2006.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D. M.; MENDES-DA-CRUZ, D. A.; SILVA-MONTEIRO, E.; PEREZ, A. R.; AOKI MDEL, P., *et al.* Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Cytokine Growth Factor Rev.** 18 (1-2); 107-24; 2007.

SEDER, R. A.; PAUL, W. E. Acquisition of lymphokine-producing phenotype by CD4+ T cells. **Annu Rev Immunol.** 12 635-73; 1994.

SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R.; REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). **J Exp Med.** 174 (3); 539-45; 1991.

SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.; REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J Exp Med.** 175 (1); 169-74; 1992.

SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect Immun.** 63 (12); 4862-7; 1995.

SNAPPER, C. M.; PAUL, W. E. Interferon-gamma and B cell stimulatory factor-1 reciprocally regulate Ig isotype production. **Science**. 236 (4804); 944-7; 1987.

SOUTO, R. P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Mol Biochem Parasitol**. 62 (1); 45-52; 1993.

SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. 83 (2); 141-52; 1996.

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi*: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. **Exp Parasitol**. 74 (1); 46-56; 1992.

SUNNEMARK, D.; ULFGREN, A. K.; ORN, A.; HARRIS, R. A. Cytokine production in hearts of *Trypanosoma cruzi*-infected CBA mice: Do cytokine patterns in chronic stage reflect the establishment of myocardial pathology? **Scand J Immunol**. 44 (5); 421-9; 1996.

TAFURI, W. L. Patogenia da Doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop**. 29 (4); 194-199; 1987.

TAGA, K.; TOSATO, G. IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. **J Immunol**. 148 (4); 1143-8; 1992.

TAMBOURGI, D. V.; KIPNIS, T. L.; DIAS DA SILVA, W. *Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells. **Exp Parasitol**. 68 (2); 192-201; 1989.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L.; DOWNS, M. O. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 94 (8); 3932-7; 1997.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F. J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 83 (1); 115-9; 1986.

TIBAYRENC, M.; BRENIERE, S. F. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal zymodemes. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 83 Suppl 1 249-55; 1988.

TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; BLOOM, B. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. **Exp Parasitol.** 45 (2); 160-8; 1978.

TRISCHMANN, T. M.; BLOOM, B. R. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** 35 (2); 546-51; 1982.

TRUYENS, C.; TORRICO, F.; ANGELO-BARRIOS, A.; LUCAS, R.; HEREMANS, H.; DE BAETSELIER, P., *et al.* The cachexia associated with *Trypanosoma cruzi* acute infection in mice is attenuated by anti-TNF-alpha, but not by anti-IL-6 or anti-IFN-gamma antibodies. **Parasite Immunol.** 17 (11); 561-8; 1995.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. D.; CORREA-OLIVEIRA, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet.** 348 (9031); 891-2; 1996.

VAN VOORHIS, W. C.; EISEN, H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J Exp Med.** 169 (3); 641-52; 1989.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect Immun.** 62 (11); 5177-82; 1994.

VIANA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica na moléstia de Chagas. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 3 276; 1911.

WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. **Experimental and surgical technique in the rat.** 2.London. London:Academic Press, 1992. p.328

WILSON, K. C.; FINBLOOM, D. S. Interferon gamma rapidly induces in human monocytes a DNA-binding factor that recognizes the gamma response region within the promoter of the gene for the high-affinity Fc gamma receptor. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 89 (24); 11964-8; 1992.

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F.; SONNENFELD, G.; ZLOTNIK, A. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** 49 (1); 61-6; 1985.

WIRTH, J. J.; KIERSZENBAUM, F. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. **J Immunol.** 141 (1); 286-8; 1988.

WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. **Infect Immun.** 36 (2); 637-44; 1982.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur J Immunol.** 26 (1); 102-9; 1996.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J Infect Dis.** 180 (2); 480-6; 1999.

ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R., *et al.* Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol.** 28 (1); 105-12; 1998.

ZINGALES, B.; STOLF, B. S.; SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; BRIONES, M. R. Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94 Suppl 1 159-64; 1999.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O., *et al.* A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 104 (7); 1051-4; 2009.

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](#)