



Paulo Marcos da Matta Guedes

Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Departamento de Parasitologia
Programa de Pós-graduação em Parasitologia
Belo Horizonte, MG
2006

Paulo Marcos da Matta Guedes

Correlação entre as lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*

Tese de Doutorado desenvolvida no Laboratório de Biologia do *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas do Departamento de Parasitologia e no Núcleo de Pesquisas Biológicas, ICEB/UFOP, apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Parasitologia, ICB/UFMG, como pré-requisito ao título de doutor.

Orientadora: Profa. Lúcia Maria da Cunha Galvão
Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG

Co-orientadora: Profa. Maria Terezinha Bahia
Departamento de Ciências Biológicas DCBI/ICEB/UFOP

Colaboradores: Prof. Dr. Kenneth J. Gollob Depto. Bioquímica e Imunologia/ICB/UFMG; Prof. Dr. Marcelo V. Caliarí Depto. Patologia/ICB/UFMG; Prof. Dr. Egler Chiari Depto. Parasitologia/ICB/UFMG; Profs. Dra. Marta de Lana e Dra. Cláudia Martins Carneiro, Escola de Farmácia/UFOP; Prof. Dr. Luis C. C. Afonso Depto. Ciências Biológicas/NUPEB/UFOP

Apoio Financeiro: Pronex/CNPq/FAPEMIG, CNPq e FAPEMIG

**Belo Horizonte, MG
2006**

“Felix qui potuit rerum cognoscere causas”

Publio Virgilio Marone (70-19 a.C.) (Georgias livro II – verso 490).

Aos meus pais (Maria de Lourdes e José Antônio), irmãos (Dé e Tim) e as minhas tias (Laide e Dinda) que me deram o apoio familiar que é indispensável para vencer qualquer desafio.

À Professora Lúcia Galvão, sempre disposta a ajudar, uma pessoa muito justa e com um grande coração a quem agradeço muito e confio o meu futuro na pesquisa.

À Professora Maria Terezinha Bahia, responsável por toda a minha formação em doença de Chagas, desde os ensinamentos para a realização das técnicas mais básicas, à produção científica e orientações, e a vibração com as descobertas científicas.

À Professora Marta de Lana, por discussões científicas e pela experiência que enriqueceram as minhas pesquisas.

Ao Professor Egler Chiari, pelo seu jeito sincero e justo demonstrando que a verdade e a sinceridade são o melhor caminho, pela sua vasta experiência de vida a qual pude compartilhar e aprender muito.

À Professora Claudia Martins Carneiro, pela ampla ajuda recebida em necropsias e avaliações histológicas, confecção de pôsteres.

Ao Professor Marcelo Caliaro pelo auxílio na análise morfométria dos tecidos.

Ao Professor Kenneth J. Gollob, Priscila Vianna, Tatiana e Soraia por ser tão bem recebido em seu laboratório e pela realização da citometria de fluxo.

Ao Professor Luiz Carlos Crocco Afonso, pelo apoio na realização da linfoproliferação e RT-PCR, correções de inglês, por ser tão prazeroso e me sentir em casa trabalhando em seu laboratório, pela amizade.

À Vanja Maria Veloso, não sei o que dizer, como agradecer por tudo. Além da ampla ajuda recebida uma grande amizade foi construída desde o início do meu mestrado. Apoio em todos os momentos difíceis e sempre dando força para continuar, uma verdadeira lição de vida tive com você, terei sempre um grande carinho por você onde estiver.

Ao Eduardo pelo auxílio na realização da RT-PCR.

Ao Ivo Caldas, Geovan Crepalde, Lívia Diniz, agradeço pelo cuidado com os animais e auxílio em coletas e realização de técnicas. Obrigado, acima de tudo pela amizade.

A todas as pessoas que convivi no laboratório de Parasitologia da UFOP, Sérgio, Fabiane, Helen, Daniela, Jaqueline, Rafael, Lílian e Tassiane.

Aos amigos Jones, André, Gustavo, Nogueira, que me deram abrigo no cafofo em BH e que tornaram as disciplinas cursadas e a estada em BH tão recompensantes, agradáveis e muito divertidas.

Ao Sheler pela realização de técnicas imunohistoquímica, HE e tricrômico de Masson.

Ao Afonso pelo cultivo de formas tripomastigotas para a realização da citometria de fluxo e por ser muito bem recebido no laboratório de Biologia *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. Pela amizade e pelas conversas.

Aos grandes amigos da República Espigão, que tenho o orgulho e a felicidade de fazer parte desta família há sete anos.

À Cida e a Sumara por ajudarem sempre a resolver tantos problemas, com bolsa, material de laboratório, aulas, etc.

A Maria pelo processamento de todo o material para a histopatologia da minha tese, e por me aturar todo esse tempo.

Ao Alan e aos amigos do GIDE, pelos conhecimentos transmitidos, pela amizade e os cafezinhos.

Aos funcionários do Biotério, Marcos, Cláudio, José Henrique, Cristina, Jorge, Selma, Rosário pela amizade e pelo cuidado com que trataram os cães.

Ao Departamento de Parasitologia, ICB/UFMG por parte de minha formação, em um dos melhores e mais tradicionais cursos de Parasitologia do país.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Parasitologia do ICB/UFMG por poder compartilhar de seus conhecimentos, e principalmente, as experiências com as quais formam-se grandes parasitologistas, pesquisadores.

Ao Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas ICEB/UFOP e seus professores pelos ensinamentos, a experiência e amizades, pelas portas sempre abertas.

RESUMO

Com a finalidade de compreender melhor a gênese das lesões na miocardiopatia chagásica crônica humana, cães da raça *Beagle* foram infectados com cepas do *Trypanosoma cruzi* que apresentam diferentes graus de virulência e patogenicidade. Foram analisadas características biológicas inerentes as cepas do parasito (polimorfismo de formas tripomastigotas, infectividade *in vitro*, curva de parasitemia) e aspectos da resposta imune do hospedeiro (cinética de produção de imunoglobulinas IgA, IgM, IgG, IgG1 e IgG2; produção de anticorpos líticos; proliferação de células mononucleares do sangue periférico/CMSP; dosagem de citocinas *in situ* no linfonodo cervical e no átrio direito), tais aspectos foram correlacionados com as alterações cardíacas (cardiomegalia, inflamação e fibrose presentes no miocárdio) durante as fases aguda (eutanásia: 30 dias após a infecção) e crônica (dois anos após a infecção). As cepas Y e ABC do *T. cruzi* que apresentaram alta infectividade *in vitro*, quando foram inoculados em cães, produziram níveis de parasitemia mais elevados que aqueles observados com a cepa Berenice-78. Todos os animais infectados mostraram o mesmo perfil de resposta proliferativa CMSP. Não houve diferença nos níveis de anticorpos dos isotipos IgA, IgM e de anticorpos líticos nos animais infectados com as três cepas do *T. cruzi*. Entretanto, os anticorpos IgA juntamente com IgM podem ser utilizados como marcadores de fase aguda da infecção. Os níveis de anticorpos detectados na sorologia convencional (SC) e na citometria de fluxo (CF) (IgG total e IgG2) foram similares e detectados a partir de 15 dias da inoculação na maioria dos animais infectados. Por outro lado, altos níveis de IgG1 foram detectados na SC e na CF nos soros dos animais infectados com a cepa Berenice-78, enquanto foram ausentes ou detectados em níveis baixos naqueles infectados com as cepas Y e ABC, e negativos nos animais não infectados. Durante a fase aguda, todos os animais infectados apresentaram linfadenopatia e esplenomegalia e somente 50% (cepas Y e ABC) e 25% (Berenice-78) dos animais infectados apresentaram discreta cardiomegalia. Também foi observada severa miocardite em todos os animais infectados. Na fase crônica, somente 50% e 25% dos animais infectados com as cepas Berenice-78 e ABC, respectivamente, apresentaram linfadenopatia. No entanto, todos animais permaneceram com esplenomegalia, porém menos intensa que na fase aguda. A cardiomegalia, a inflamação e a fibrose foram observadas em 100%, 50% e 100% dos animais infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC, respectivamente. A produção de IFN- γ , TNF e IL-10 *in situ* (linfonodo cervical e átrio direito) durante a fase aguda foi similar em todos os animais infectados. Entretanto, durante a fase crônica os níveis de produção destas citocinas foram semelhantes nos linfonodos dos animais infectados enquanto na musculatura cardíaca somente aqueles infectados com a cepa Berenice-78 produziram IL-10. Esses dados sugerem que a alta

produção de IgG1 e IL-10 *in situ* (resposta anti-inflamatória) durante esta fase podem estar correlacionadas com a forma indeterminada da doença, enquanto a baixa produção de IgG1 e IL-10 estariam associadas a forma cardíaca da doença.

ABSTRACT

For the better understanding of the lesions genesis in the human chronic chagasic myocardiopathy, *Beagle* dogs were infected with *Trypanosoma cruzi* strains that showed different virulence and pathogenicity. Biological characteristics of the parasite strains were analyzed (trypomastigote polymorphism, *in vitro* infectivity, parasitemia curve) and host immune response (kinetics production of IgA, IgM, IgG, IgG1 and IgG2; lytic antibodies; proliferation of peripheral blood mononuclear cells/PBMC; *in situ* cytokine quantification in the cervical lymph node and right atrium) correlating with the heart alterations (cardiomegaly, inflammation and fibrosis) during the acute (euthanasia: 30 days after the infection) and chronic phases (two years after the infection). The Y and ABC *T. cruzi* strains, that presented high *in vitro* infectivity, were inoculated in dogs and caused higher parasitemia levels than Berenice-78 strain. The same profile of PBMC proliferation was observed in all infected animals, however, the Y infected animals showed higher levels of proliferation than Berenice-78 infected animals. There were no differences in lytic antibodies, IgA and IgM levels in the animals infected with three *T. cruzi* strains. However, IgA in association IgM might be used as marker of acute phase of the disease. The conventional serology antibodies (CSA) levels and live anti-trypomastigote antibodies (LATA) (total IgG and IgG2) were similar and detected up to 15 days after the start of the infection in most animals. On the other hand, high IgG1 levels were detected in CSA and LATA in Berenice-78 infected animals, while they were absent or detected in low levels in infected animals Y and ABC strains, and not detected in uninfected animals. In the acute phase all infected animals showed lymphadenopathy and splenomegaly and only 50% (Y and ABC strains) and 25% (Berenice-78) of the infected animals showed discrete cardiomegaly. The histopathologic analysis showed a severe myocarditis in all infected animals during the acute phase. In the chronic phase, only 50% and 25% of the Berenice-78 and ABC infected animals showed lymphadenopathy, respectively, and all animals showed splenomegaly less intense than in the acute phase. During the chronic phase cardiomegaly, inflammation and fibrosis were also observed in 100%, 50% and 100% of the Y, Berenice-78 and ABC infected animals, respectively. IFN- γ , TNF and IL-10 *in situ* production (lymph node cervical and right atrium) during the acute phase was similar in all infected animals. However, the production of these cytokines during the chronic phase were similar in the lymph nodes of the infected animals while cardiac area only Berenice-78 infected animals produced IL-10. The data indicated that high levels of IgG1 and IL-10 high *in situ* production (anti-inflammatory response) during the chronic phase of the infection could be correlated with the indeterminate form of the disease, while the low IgG1 and IL-10 production would be associated to cardiac form of the disease.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	1
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	2
1.2 Infectividade <i>in vitro</i> e polimorfismo de formas tripomastigotas sanguíneas.....	3
1.3 Mecanismos imunopatogênicos envolvidos na doença de Chagas	3
1.4 Resposta imune na infecção chagásica	4
1.5 Doença de Chagas experimental: aplicabilidade do modelo cão	7
1.6 Resposta imune no modelo canino.....	9
2. JUSTIFICATIVA	12
3. OBJETIVOS	14
3.1 Objetivo geral.....	15
3.2 Objetivos específicos.....	15
4. MATERIAIS E MÉTODOS	16
4.1 Delineamento experimental.....	17
4.2 Cepas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
4.3 Polimorfismo e Infectividade das cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i>	18
4.4 Animais.....	19
4.5 Infecção dos animais	19
4.6 Análise da produção de imunoglobulinas	19
4.6.1 Dosagem de IgA, IgM e IgG total e das subclasses (IgG1 e IgG2) por ELISA	21
4.6.2 Dosagem de IgG total e subclasses (IgG1, IgG2) pela citometria de fluxo.....	21
4.6.3 Cinética da produção de anticorpos líticos	22
4.7 Proliferação de células mononucleares do sangue periférico.....	23
4.8 Necrópsia dos animais e coleta do material	24
4.9 Histopatologia.....	24
4.9.1 Técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E)	24
4.9.2 Quantificação da inflamação na área cardíaca	25
4.9.3 Técnica de Tricrômico de Masson.....	25
4.9.4 Análise quantitativa da área ocupada por tecido conjuntivo fibroso	25
4.10 Produção de citocinas <i>in situ</i> pela RT-PCR.....	26
4.10.1 Extração de RNA.....	26
4.10.2 Síntese de cDNA	27
4.10.3 Realização da PCR e quantificação de citocinas	27
4.11 Análise estatística.....	28

5. RESULTADOS	29
5.1 Parâmetros biológicos	30
5.1.1 Polimorfismo e infectividade das cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i>	30
5.1.2 Curva de parasitemia	32
5.2 Parâmetros Imunológicos.....	33
5.2.1 Quantificação da produção de IgA e IgM totais.....	33
5.2.2 Quantificação da produção de IgG total e subclasses (IgG1 e IgG2).....	35
5.2.3 Quantificação da produção de anticorpos lífticos.....	38
5.2.4 Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico.....	38
5.3 Histopatologia.....	42
5.3.1 Avaliação da presença de linfadenopatia, esplenomegalia, cardiomegalia e de alterações no sistema digestivo	42
5.3.2 Avaliação da presença de inflamação e fibrose na área cardíaca.....	45
5.4 Produção de citocinas <i>in situ</i> pela técnica de RT-PCR.....	49
5.4.1 Produção de IFN- γ , TNF e IL-10 no linfonodo cervical	49
5.4.2 Produção de IFN- γ , TNF e IL-10 no átrio direito	52
5.5 Aspectos imunológicos e alterações anatomopatológicas	55
6. DISCUSSÃO.....	60
7. CONCLUSÕES.....	77
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	79

LISTA DE ABREVIATURAS

12 SF	Cepa São Felipe 12
AATV	Anticorpo anti-tripomastigota vivo
AL	Anticorpo lítico
ASC	Anticorpos da sorologia convencional
Be-78	Cepa Berenice-78
BSA	Soro albumina bovina
caB	Anticorpo monoclonal (IgG) anti-B canino
caCD4	Anticorpo monoclonal (IgG) anti-CD4 canino
caCD8	Anticorpo monoclonal (IgG) anti-CD8 canino
caMAC	Anticorpo monoclonal (IgG) anti-macrófago canino
CARD	Forma cardíaca
CHu	Complemento humano
CMSP	Células mononucleares do sangue periférico
Con-A	Concanavalina-A
CF	Citometria de fluxo
CP	Curva de parasitemia
CTCM	<i>Culture tissue complete medium</i>
DAB	Diaminobenzidina
DIG	Forma digestiva
DNA	Ácido desoxirribonucléico
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FA	Fase aguda
FACS	<i>Fluorescenc Activated Cell Sorter</i>
FC	Fase crônica
FE	Ficoeritrina-estreptovidina
H&E	Hematoxilina e eosina
HEPES	Ácido, N – 2 – hidroxietilpiperazina – N’ – 2 etanosulfônico
IE	Índice de estimulação
IF	Isotiocianato de fluoresceína
IFI	Reação de imunofluorescência indireta
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M

IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
IL-10	Interleucina 10
IND	Forma indeterminada
kDa	kilodaltons
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	<i>Liver infusion tryptose</i>
LMCo	Lise mediada pelo complemento
MChCr	Miocardite chagásica crônica
NK	Células <i>Natural killer</i>
NO	Óxido nítrico
OPD	Ortofenilenodiamino
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato
PBS-T	Salina tamponada com fosfato acrescida de 0,05% Tween-20
PCR	Reação em cadeia da polimerase
pH	Potencial hidrogeniônico
PMP	Pico máximo de parasitemia
PP	Parasitemia patente
PPP	Período pré-patente
RT-PCR	<i>Reverse transcriptase-polymerase chain reaction</i>
SC	Sorologia convencional
SFB	Soro fetal Bovino
TCD4 ⁺	Linfócito T helper
TCD8 ⁺	Linfócito T citolítico
TGF-β	Fator de transformação de crescimento beta
Th1	T helper tipo 1
Th2	T helper tipo 2
TNF-α	Fator de necrose tumoral alfa

Tabela 1 – Distribuição por sexo dos cães <i>Beagle</i> utilizados para a avaliação das fases aguda e crônica da doença de Chagas.....	20
Tabela 2 - Presença de esplenomegalia em cães da raça <i>Beagle</i> infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i> e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.	44
Tabela 3 - Presença de linfadenopatia cervical em cães da raça <i>Beagle</i> infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i> e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.....	44
Tabela 4 - Presença de cardiomegalia em cães da raça <i>Beagle</i> infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i> e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.	44
Tabela 5 - Miocardite em cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i> e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.	46
Tabela 6 - Fibrose no miocárdio de cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i> e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.	46
Tabela 7 – Aspectos imunológicos e anatomopatológicos de cães <i>Beagle</i> quatro semanas após a infecção (fase aguda) com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i>	59
Tabela 8 – Aspectos imunológicos e anatomopatológicos de cães <i>Beagle</i> 100 semanas após a infecção (fase crônica) com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do <i>T. cruzi</i>	59

- Gráfico 1** - Polimorfismo de formas tripomastigotas sanguíneas encontradas durante o pico de parasitemia da fase aguda da infecção de camundongos Swiss inoculados com as cepas Y (7º dia de infecção), Berenice-78 (14º dia de infecção) e ABC (12º dia de infecção) do *T. cruzi*.30
- Gráfico 2** - Percentagem de células VERO contendo amastigotas 48h após a infecção com $12,5 \times 10^4$ tripomastigotas de cultura celular das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.31
- Gráfico 3** - Número de amastigotas por célula 48h após a infecção com $12,5 \times 10^4$ tripomastigotas de cultura celular das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.32
- Gráfico 4** - Curvas de parasitemia de cães da raça *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.33
- Gráfico 5** - Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* determinados pela ELISA no soro de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. A) IgA total, B) IgM total.34
- Gráfico 6** - Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* determinados pela ELISA no soro de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. A) IgG total, B) IgG1 e C) IgG2.36
- Gráfico 7** - Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* determinados pela citometria de fluxo no soro de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. A) IgG total, B) IgG1 e C) IgG2.37
- Gráfico 8** - Porcentagem de anticorpos líticos determinados pela LMCo no soro de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.38

Gráfico 9 - Estimulação de células mononucleares do sangue periférico, *in vitro*, com antígeno de formas tripomastigotas durante as fases aguda e crônica da infecção de cães da raça *Beagle* inoculados com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, ABC e Berenice-78 do *T. cruzi* e animais não infectados como grupo controle.....40

Gráfico 10 - Análise comparativa entre os perfis imunológicos determinados por ELISA (A), citometria de fluxo (B) e proliferação de células mononucleares do sangue periférico (C) realizadas 60 semanas após a infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*.40

Gráfico 11 - Correlação entre a proliferação de células mononucleares do sangue periférico e a produção de IgG1 determinado por ELISA (A) e pela citometria de fluxo (B) realizadas 60 semanas após a infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*.41

Gráfico 12 - Correlação entre o peso do órgão e o peso do animal durante as fases aguda e crônica da infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*: A) baço B) linfonodo e C) coração.....43

Gráfico 13 - Intensidade de inflamação (A) e fibrose (B) no miocárdio durante as fases aguda e crônica da infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*.....48

Gráfico 14 – Análise semi-quantitativa da expressão de mRNA das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 no linfonodo cervical durante as fases aguda (A) e crônica (B) da infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*.51

Gráfico 15 – Análise semi-quantitativa da expressão de mRNA das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 no átrio direito durante as fases aguda (A) e crônica (B) da infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*.54

Gráfico 16 – Níveis de anticorpos específicos da subclasse IgG1 anti-*T. cruzi* determinados pela A) ELISA e pela B) citometria de fluxo no soro de cães *Beagle* coletados 100 semanas após a infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.56

Gráfico 17 – Análise semi-quantitativa da expressão de mRNA das citocinas IFN- γ e IL-10 no átrio direito durante a fase crônica (100 semanas após a inoculação) da infecção com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*.57

Figura 1 - Células da linhagem VERO infectadas com $12,5 \times 10^4$ tripomastigotas de cultura celular das cepas Y (A), Berenice-78 (B) e ABC (C) do *T. cruzi* mostrando as formas amastigotas após 48h de infecção.31

Figura 2 – Histologia do átrio direito de cães *Beagle* **controles não infectados** sacrificados com a mesma idade dos animais infectados durante as fases aguda **A)** HE, e crônica da infecção **B)** HE, **C)** tricrômico de Masson; e cortes histológicos de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal das cepas **Berenice-78** do *T. cruzi*, **D)** fase aguda: inflamação intensa, degeneração hialina discreta e parasitos. **E)** fase crônica, degeneração hialina discreta e **F)** fase crônica, fibrose discreta; **Y** do *T. cruzi* fase aguda, **G)** processo inflamatório intenso, degeneração hialina moderada; **H)** fase crônica, inflamação discreta, degeneração hialina moderada. **I)** fase crônica, fibrose moderada; **ABC** do *T. cruzi* fase aguda, **J)** processo inflamatório intenso, degeneração hialina moderada; **L)** fase crônica, inflamação discreta, degeneração hialina moderada. **M)** fase crônica, fibrose moderada ($\times 40$).47

Figura 3 – Expressão de citocinas (TNF, IFN- γ e IL-10) no linfonodo cervical de cães *Beagle* não infectados e infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Y, ABC e Berenice-78 do *T. cruzi* determinado por RT-PCR. A) fase aguda, B) fase crônica. O gene constitutivo do HPRT foi utilizado como controle positivo da reação.50

Figura 4 – Expressão de citocinas (TNF, IFN- γ e IL-10) no átrio direito de cães *Beagle* não infectados e infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas das cepas Y, ABC e Berenice-78 do *T. cruzi* determinado por RT-PCR. A) fase aguda, B) fase crônica. O gene constitutivo do HPRT foi utilizado como controle positivo da reação.....53

Figura 5 – Hipótese I - Esquema ilustrativo da atividade lítica (A) e citofílica (B) da subclasse IgG1 controlando a parasitemia. Havendo um controle eficiente da parasitemia através da lise por proteínas do complemento ou da fagocitose por macrófagos mediada por IgG1 resultaria em um menor parasitismo e destruição tecidual durante a infecção pelo *T. cruzi*.69

Figura 6 – Hipótese II - Esquema ilustrativo da subclasse IgG1 não tendo atividade lítica ou citofílica ocorrendo competição por sítios de ligação com IgG2 em proteínas importantes do hospedeiro durante a infecção pelo *T. cruzi*. (A) Havendo a produção de IgG1 ocorreria menor quantidade de destruição de fibras cardíacas (B) Sem a produção de IgG1, haveria uma maior quantidade de ligação de IgG2 ao miocárdio e a destruição tecidual seria intensa.69

Quadro 1 – Avaliação imunológica e clínica comparativa da doença de Chagas em pacientes e em modelos experimentais (canino e murino)..76

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas (Chagas, 1909) normalmente resulta em uma longa associação parasito-hospedeiro e pode gerar principalmente, inflamação na musculatura cardíaca, dilatação do esôfago ou cólon e anormalidades no sistema nervoso central (Moncayo, 1999; Tafuri, 1970 e 1987). Na década passada, a implantação de medidas de controle vetorial em muitas áreas endêmicas determinou uma redução na transmissão vetorial, pelo *Triatoma infestans*, o que proporcionou decréscimo substancial na incidência da doença de Chagas na América Latina (Moncayo, 2003; WHO, 2002). Entretanto, 13 milhões de indivíduos nas Américas Central e do Sul ainda encontram-se infectados por esse parasito (WHO, 2005).

A fase aguda da doença de Chagas é assintomática na maioria dos casos, entretanto, pode manifestar-se com febre e sinais de doença aguda apresentando edema subcutâneo, enfartamento ganglionar, hepatoesplenomegalia, miocardite aguda acompanhada de cardiomegalia (Salgado *et al.*, 1962; Salgado, 1980; Rassi, 1979; Rassi Jr. *et al.*, 2000).

Na fase crônica, os pacientes podem apresentar diferentes manifestações clínicas, dependentes tanto de fatores inerentes ao parasito quanto ao hospedeiro vertebrado. Os fatores relevantes inerentes ao parasito são: a variabilidade entre as cepas, a virulência, a antigenicidade, o tropismo e o tamanho do inóculo. Em relação ao hospedeiro vertebrado, fatores como idade, sexo e o perfil da resposta imune parecem modular diferenças nas manifestações clínicas (Dias, 2000). Nesta fase, a maior parte dos pacientes chagásicos permanece assintomática por um longo período, o que caracteriza a forma indeterminada da doença.

A cardiopatia chagásica crônica é a maior causa de morbidade da doença de Chagas manifestando-se em cerca de 30 a 40% dos pacientes na faixa etária entre 20-50 anos. Estes podem apresentar prognóstico e evolução variáveis, desde pequenas alterações eletrocardiográficas até a insuficiência cardíaca ou progredindo para uma eventual morte súbita (Coura *et al.*, 1983; Dias, 1992). Ainda pode ser observado aumento global da área cardíaca, tendo como fatores a destruição direta do tecido muscular cardíaco devido ao parasitismo pelo *T. cruzi*, fibrose e auto-imunidade. Aproximadamente 10% dos pacientes desenvolvem a forma digestiva, apresentando dilatações e alterações funcionais principalmente no esôfago e no cólon, devido a lesões no sistema nervoso autônomo intramural, parasitismo tecidual e ação do sistema imune (Tafuri, 1970; Tafuri, 1987; Dias, 1992).

1.2 Infectividade *in vitro* e polimorfismo de formas tripomastigotas sanguíneas

Características biológicas como a infectividade *in vitro* e o polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* parecem influenciar o aparecimento de alterações anatomopatológicas cardíacas nos hospedeiros. A presença de formas tripomastigotas sanguíneas finas e largas foi descrita por Chagas (1909) e confirmada por outros autores posteriormente (Brenner & Chiari, 1963; Brenner *et al.*, 1976; Marques de Araújo & Chiari, 1988). Cepas que apresentaram predomínio de formas delgadas produziram parasitemias mais elevadas em camundongos infectados quando comparadas àquelas que tinham predomínio de formas largas (Lana & Chiari, 1986; Marques de Araújo & Chiari, 1988). Foi descrita a elevada infectividade *in vitro* para a cepa Y, predomínio de formas delgadas, e baixa infectividade para a cepa CI com predominância de formas largas (Brenner *et al.*, 1976; Bertelli *et al.*, 1977; Bertelli & Brenner, 1980). A apresentação de variações morfológicas provavelmente implica em diferentes características imunogênicas, fisiológicas e bioquímicas destas cepas do parasito que influenciam a patogenicidade gerada ao hospedeiro. Porém, poucos trabalhos relacionam estas características à destruição cardíaca observada em animais experimentalmente infectados.

1.3 Mecanismos imunopatogênicos envolvidos na doença de Chagas

A patogênese da fase crônica da doença de Chagas e os mecanismos imunopatológicos que promovem as lesões nos tecidos não estão, ainda, bem elucidados. A dificuldade em detectar-se o parasito no miocárdio levou à postulação de teorias auto-imunes para explicar o desenvolvimento das lesões inflamatórias miocárdicas. Algumas hipóteses têm sido sugeridas para explicar estas lesões como, o resultado de reação de auto-imunidade envolvendo auto-anticorpos ou linfócitos T auto-reativos derivados de mimetismo molecular de antígenos do parasito e do hospedeiro, ou a ativação *bystander* não envolvendo antígenos do *T. cruzi*, induzida por antígenos procedentes de lesões teciduais (Leon *et al.*, 2001; Kierszenbaum, 1999; Cossio *et al.*, 1974; Anselmi *et al.*, 1966). Na infecção humana pelo *T. cruzi* os auto-anticorpos contra antígenos do tecido cardíaco, de músculo esquelético e tecido nervoso foram assinalados (Kierszenbaum, 1999). O mimetismo molecular entre antígenos do parasito e do hospedeiro com formação de auto-anticorpos foi descrito para miosina cardíaca, proteína P ribossomal, queratina, receptores β -adrenérgicos e de muscarina, proteínas associadas a microtúbulos do citoesqueleto e proteínas neuronais, dentre outros (Lopez-Bergami *et al.*, 2001; Levin *et al.*, 1989; Cunha-Neto *et al.*, 1996; Kerner *et al.*, 1991, Petry & Eisen 1989). Recentemente, foi demonstrada a reatividade contra auto-antígeno Cha (proteína presente em

mamíferos) em humanos e camundongos infectados com o *T. cruzi* (Girones *et al.*, 2001). Rowland *et al.* (1992, 1995) e Tibbetts *et al.* (1994) demonstraram que a infecção em camundongos, com a cepa Brasil do *T. cruzi* induziu a formação de auto-anticorpos contra tecido cardíaco. Porém, a formação desses auto-anticorpos não foi detectada na infecção experimental em camundongos utilizando a cepa Guayas, sugerindo que a genética do *T. cruzi*, juntamente com a predisposição genética do hospedeiro, influenciariam a formação de mecanismos auto-ímmunes durante a fase crônica da doença de Chagas.

Diferentes autores têm demonstrado a participação ativa do parasito na patogênese da cardiopatia chagásica crônica humana (Barbosa *et al.*, 1986; Higuchi *et al.*, 1993; Higuchi, 1995). Uma correlação positiva, entre a inflamação e a presença de *T. cruzi* no tecido cardíaco e a sua ausência em locais sem inflamação, foi descrita por Belloti *et al.* (1996) e Higuchi (1995) por meio da técnica de imunoperoxidase. A presença de DNA nuclear do parasito também tem sido detectada em tecidos cardíacos de pacientes com lesões inflamatórias severas, entretanto, não foram detectadas seqüências de DNA do *T. cruzi* em tecido cardíaco de pacientes assintomáticos ou soronegativos por PCR e hibridização com sondas internas específicas (Jones *et al.*, 1993). A persistência do *T. cruzi* no miocárdio também foi demonstrada por Ñez *et al.* (1999) que amplificaram DNA em biópsias miocárdicas de pacientes portadores das formas indeterminada ou cardíaca. Resultados concordantes foram obtidos por Lages-Silva *et al.* (2001) e Vago *et al.* (1996) que amplificaram seqüências do DNA do cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi* em tecidos do esôfago de pacientes com megaesôfago, sendo observada correlação entre a inflamação tecidual e a presença do parasito. A presença do parasito parece ser importante para desencadear o processo de formação da miocardite chagásica crônica. Na maioria dos casos, não é possível fazer uma correlação entre a intensidade da lesão e a quantidade de antígeno e/ou DNA do *T. cruzi*, sugerindo que o parasito dependendo de características genéticas inerentes à cepa, é responsável por disparar e manter o processo de patogênese no miocárdio, e que este seria amplificado por mecanismos auto-ímmunes que dependeriam ainda, da predisposição genética do hospedeiro (Girones & Fresno, 2003; Ñez *et al.*, 1999; Belloti *et al.*, 1996; Higuchi, 1995; Rowland *et al.*, 1995; Jones *et al.*, 1993).

1.4 Resposta imune na infecção chagásica

A infecção pelo *T. cruzi* expõe o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado a uma complexa mistura de antígenos do parasito que estimulam a resposta imune celular e humoral do hospedeiro. A presença de linfócitos e macrófagos nos infiltrados inflamatórios pode estar

diretamente relacionada ao processo de fibrose pela produção de citocinas, de fatores de crescimento que induziriam a destruição tecidual e ativariam a fibrogênese (Reis *et al.*, 1997). Assim, a identificação e a quantificação da cinética do infiltrado inflamatório, de células presentes no sangue periférico e o estudo destes mecanismos são essenciais ao entendimento da história natural da doença de Chagas. Também, será importante para o entendimento dos mecanismos de patogênese da doença, a avaliação da indução de imunoglobulinas e de fatores solúveis ou citocinas que agem como sinalizadores para a realização de inúmeras funções celulares em infecções por diferentes populações do *T. cruzi*.

Nessa direção, Higuchi *et al.* (1993) demonstraram que a maioria das células presentes no infiltrado inflamatório de pacientes com formas cardíacas são células T CD8⁺, com reduzido número de células T CD4⁺. Dados semelhantes foram obtidos por Tostes Junior *et al.* (1994) demonstrando que na miocardite chagásica crônica (MChCr) parte do exsudato é constituído por células T CD4⁺ e T CD8⁺, sendo estas últimas mais numerosas. Foi observado que linfócitos T CD8⁺ estavam em contato direto com miocardiócitos em destruição sugerindo fortemente uma ação patogênica destas células na MChCr. Os linfócitos T CD4⁺ Th1 específicos podem ter múltiplas funções na resistência ao *T. cruzi* e ainda contribuir como a maior fonte de INF- γ para a ativação de macrófagos. Estes atuam também na diferenciação e ativação de linfócitos T CD8⁺, sendo importantes componentes na resistência ao parasito (Brener & Gazzinelli, 1997).

O mútuo requerimento de linfócitos T CD8⁺ e IFN- γ para a resistência da infecção contra o *T. cruzi* sugere que, a produção do IFN- γ é uma das principais funções das células T CD4⁺. Os linfócitos T CD8⁺ são responsáveis pela citotoxicidade contra células do hospedeiro determinando a citólise e a fibrose, com destruição da miofibra cardíaca na cardiopatia chagásica (Cuña & Cuña, 1995). Entretanto, linfócitos CD8⁺ podem ter papel protetor principalmente durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton, 1991, 1994; Dutra *et al.*, 1997; Brener & Gazzinelli, 1997). Reis *et al.* (2000) quantificaram células inflamatórias T (CD4⁺ e CD8⁺) e antígenos do *T. cruzi* em fragmentos de miocárdio de 19 cardiopatas chagásicos crônicos com insuficiência cardíaca congestiva, pela técnica de imunoperoxidase. O número médio de linfócitos T CD8⁺ foi mais elevado quando comparado a linfócitos T CD4⁺ na razão de CD4⁺/CD8⁺ 0,6 (\pm 0,3).

O balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias, anti-inflamatórias e quimiocinas é um outro fator importante nos mecanismos de patogênese da doença de Chagas ou na resistência a infecção pelo *T. cruzi* em pacientes, podendo ser a principal ferramenta

para controlar a morbidade durante a fase crônica da doença (Dutra *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2003).

Durante a fase aguda da infecção, a produção de citocinas inflamatórias (perfil Th1) ativando macrófagos e estimulando a diferenciação e proliferação de linfócitos TCD8 é importante para limitar a replicação do parasito e auxilia a cura parasitológica em pacientes chagásicos tratados (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998, 2000). Entretanto, um aumento na secreção de IL-10 durante a fase crônica pode estar associado à proteção do hospedeiro contra o processo patológico induzido por citocinas do perfil Th1.

Altos níveis de mRNA para IL-5, IL-10, IL-13 e IFN- γ foram detectados em células mononucleares do sangue periférico de pacientes chagásicos crônicos, independente da forma clínica apresentada, em relação a indivíduos não infectados (Dutra *et al.*, 1997). Por outro lado, alguns autores demonstraram correlação entre a presença de cardiopatia chagásica crônica severa e o perfil de citocinas dos pacientes. A produção de altos níveis de IFN- γ e baixos níveis de IL-10 (resposta do perfil Th1) na musculatura cardíaca e por leucócitos do sangue periférico foi detectada em pacientes que apresentavam a forma cardíaca da doença, enquanto pacientes na forma indeterminada apresentaram a produção de IFN- γ e de altos níveis de IL-10 (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 1999; Correa-Oliveira *et al.*, 1999; Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003, 2005).

No curso da infecção chagásica é observada uma ativação policlonal de linfócitos B e produção de imunoglobulinas. O conhecimento sobre a indução das diversas classes e subclasses de imunoglobulinas por diferentes populações do *T. cruzi* é outro fator importante para o esclarecimento dos mecanismos que agem gerando proteção ao hospedeiro contra o parasito e, ainda podem contribuir melhor para o conhecimento do mecanismo de patogênese da doença de Chagas. Entretanto, são escassos os estudos que focalizam a correlação entre o desenvolvimento e a manutenção das diferentes formas clínicas com o perfil de isotipos e subclasses de imunoglobulinas e seu papel na patogênese e/ou na proteção.

Em humanos ocorre a produção de quatro subclasses de imunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), e o controle na produção destas subclasses é mediado por diferentes citocinas (Kowano *et al.*, 1994). Dados na literatura mostram que IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β (perfil anti-inflamatório) são responsáveis por auxiliar a indução das subclasses IgG1 e IgG3 (Briere *et al.*, 1994, Reed & Scott, 1993), e que IL-12, INF- γ , TNF- α (perfil inflamatório) levam à produção de IgG2, sendo a produção de IgG1 e IgG2 é antagonicamente regulada. Ademais, níveis elevados de IgG1 podem diminuir a ação de IgG2, já que competem por sítios de ligação em epitopos importantes (Kowano *et al.*, 1994; Deplazes *et al.*, 1995). A resposta

mediada por anticorpos, estimulada por citocinas inflamatórias induz principalmente a produção de IgG2. Este anticorpo opsoniza o parasito, importante tanto para a sua destruição pelo complemento, como para a fagocitose por macrófagos. Os anticorpos das subclasses IgG1 e IgG4 têm sua produção desencadeada por citocinas anti-inflamatórias, não ativam o complemento e não se ligam a receptores Fc dos macrófagos. Por outro lado, estes anticorpos estão envolvidos na defesa do hospedeiro mediada por células efectoras não fagocitárias, como mastócitos e eosinófilos (Mosmann & Coffman, 1989; Romagnani, 1991).

A expressão das quatro subclasses de imunoglobulina G anti-*T. cruzi* sugere um balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias associadas, provavelmente a uma estimulação antigênica contínua.

A reatividade de IgG utilizando preparações antigênicas derivadas de formas epimastigotas mostrou títulos elevados de IgG1 e IgG3 nos soros de pacientes chagásicos crônicos (Cerban *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1996). Cerban *et al.* (1993) não observaram nenhuma diferença nos níveis dessas imunoglobulinas entre indivíduos portadores de diferentes formas clínicas da doença. Entretanto, Morgan *et al.* (1996) descreveram níveis mais elevados de anticorpos IgG2 nos soros dos pacientes portadores de formas clínicas cardíaca e cardio-digestiva. Cordeiro *et al.* (2001) analisaram o perfil das subclasses IgG presentes na sorologia convencional (SC) e constituintes dos anticorpos anti-tripomastigotas vivos (AATV) com auxílio da imunofluorescência indireta e da citometria de fluxo, em soros de pacientes chagásicos crônicos portadores das formas indeterminada (IND), cardíaca (CARD) e digestiva (DIG) da doença. As subclasses IgG1 e IgG2 foram os principais anticorpos encontrados na SC, enquanto IgG1 e IgG3 foram predominantes nos AATV. Os baixos níveis de IgG1 e IgG3 nos AATV foram associados aos pacientes que apresentavam a forma CARD e os elevados níveis de IgG1 nos AATV foram encontrados principalmente, em pacientes apresentando a forma IND da doença.

1.5 Doença de Chagas experimental: aplicabilidade do modelo cão

A busca de modelos experimentais que reproduzam com fidelidade as diferentes formas anatomoclínicas da doença de Chagas tem sido exaustivamente pesquisada.

O modelo murino é o mais utilizado nos estudos tanto nas fases aguda como crônica da doença de Chagas, devido à facilidade de manuseio e obtenção, baixo custo e a diversidade de linhagens existentes inclusive isogênicas que possibilitam o estudo de diferentes aspectos da doença (Araujo-Jorge & Castro, 2000) oferecendo resultados mais homogêneos e comparáveis. A existência de linhagens transgênicas e *Knock-out* de genes implicados com a

resistência à infecção têm permitido ampliar os conhecimentos de imunologia e de outros aspectos importantes na complexa relação parasito-hospedeiro. Entretanto, a pequena vida média (aproximadamente dois anos) e o não desenvolvimento de todas as formas clínicas da doença, bem como, a não correspondência entre os traçados eletrocardiográficos nestes animais com os padrões típicos da doença humana têm restringido o seu uso como modelo experimental.

A relevância de estudos que esclareçam os mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da doença de Chagas crônica torna necessária a busca de um modelo experimental que reproduza melhor a doença humana, com a finalidade de compreender os mecanismos envolvidos na formação do processo patológico. O cão, além de ser de fácil manuseio, tem sobrevida entre 15-20 anos. O animal jovem é altamente susceptível à infecção pelo *T. cruzi* desenvolvendo as fases aguda e crônica (forma indeterminada e cardíaca) de maneira similar à infecção humana, inclusive com presença de cardiopatia chagásica crônica fibrosante e difusa. (Pellegrino, 1947; Laranja, 1953; Korberle, 1958). Laranja *et al.* (1949) descreveram a fase crônica da infecção em cães inoculados com sangue de pacientes chagásicos ou com fezes de triatomíneos, com um quadro clínico-patológico e alterações eletrocardiográficas superponíveis às observadas no homem, tanto nas fases aguda como crônica da infecção. Anselmi *et al.* (1965; 1966); Laranja & Andrade (1980); e Andrade & Andrade (1980) também observaram que as alterações do ECG em cães eram semelhantes àquelas observadas em pacientes e acompanhadas de alterações histopatológicas. Andrade *et al.* (1997, 1981) observaram que alterações no ECG estavam presentes em 80% dos cães durante a fase aguda da infecção, e entre os animais sobreviventes foi observada a normalização do ECG, caracterizando a forma indeterminada da doença de Chagas. Machado *et al.* (2001) também observaram a forma indeterminada da doença de Chagas experimental em todos os animais reinfectados com o *T. cruzi*. Bambirra (1982) infectou 21 cães jovens da raça *Pincher* por via intraperitoneal, com 1×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas da cepa Colombiana do *T. cruzi*/kg de peso corporal; os animais desenvolveram a fase aguda semelhante à infecção humana. Os cães que cronificaram permaneceram até oito anos após a infecção na forma indeterminada apresentando os testes de hemocultura e/ou xenocultura e IFI positivos (Lana *et al.*, 1986).

Diversos autores demonstraram que cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi* apresentam não apenas reações sorológicas positivas (IgM, IgG e IgA) indicativas da persistência da infecção; mas também exames parasitológicos (xenodiagnóstico e ou hemocultura) e histopatológicos positivos; bem como manifestações clínicas da doença

(insuficiência cardíaca congestiva com quadro anatomopatológico compatível com a cardiopatia crônica fibrosante). Observou-se sistematicamente o desenvolvimento de uma cardiopatia grave evolutiva, com todos os elementos patológicos, em tudo semelhante a cardiopatia chagásica crônica humana (Andrade, 1984; Tafuri *et al.*, 1988; Lana *et al.*, 1988; 1992; Machado *et al.*, 2001, Bahia *et al.*, 2002).

Koberle (1957) relatou o achado de megas em diversos segmentos do tubo digestivo, bem como das vias biliares, traquéia, árvore brônquica e vias genito-urinárias de cães infectados naturalmente pelo *T. cruzi*. Okumura e Corrêa-Neto (1961) descreveram a forma digestiva da doença de Chagas no modelo canino, porém estes autores foram os únicos a reproduzir a forma digestiva da doença de Chagas no modelo canino, sendo que estes achados necessitam de maiores investigações.

Mais recentemente, foi demonstrado que o cão também é um bom modelo para estudos de quimioterapia da doença de Chagas. Guedes *et al.* (2002) trataram com benznidazol cães sem raça definida, infectados com as cepas Berenice-78, Y e Colombiana do *T. cruzi* e mostraram resultados semelhantes aos obtidos em camundongos, exceto para a cepa Y, que apresentou 100% de sensibilidade em cães tratados durante a fase aguda da doença. O tratamento da fase crônica recente dos animais infectados com a cepa Berenice-78 gerou 37,5% de cura, índice de cura mais baixo do que aqueles obtidos com o tratamento de crianças (55,8% e 62%), provavelmente devido ao período de tratamento utilizado, 45 dias para os cães e 60 dias para as crianças (Andrade *et al.*, 1996; Sosa Estani *et al.*, 1998). Diante desses dados o cão se apresenta como um modelo ideal dentro dos requisitos estabelecidos pelo Comitê de Doença de Chagas do Programa Especial de Treinamento e Pesquisa de Doenças Parasitárias da Organização Mundial de Saúde (WHO, 1984) por:

1. Permitir o isolamento do parasito ao longo da infecção;
2. Apresentar reações sorológicas positivas indicativas da persistência da infecção;
3. Apresentar manifestações clínicas da doença de Chagas crônica;
4. Desenvolver miocardite, miosite e outras alterações patológicas que caracterizam a doença;
5. Induzir resposta imune contra tecido do hospedeiro.

1.6 Resposta imune no modelo canino

A semelhança encontrada nas manifestações clínicas durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas humana em relação àquelas observadas no cão sugere que este animal seja um bom modelo para estudos de imunopatogênese da doença. A cinética de produção de anticorpos (IgA, IgM, IgE e IgG) foi bem descrita no modelo canino e assemelhando-se muito

aos achados em pacientes, contudo não foi correlacionada com a forma clínica observada (Andrade *et al.*, 1981; Lana *et al.*, 1986, 1992; Guedes *et al.*, 2002). Por outro lado, não existem estudos correlacionando a produção de citocinas em cães chagásicos com a gênese das lesões cardíacas, e estudos que determinam o fenótipo das células do sistema imune presentes no infiltrado inflamatório cardíaco e no sangue periférico são escassos (Caliari *et al.*, 2002; Carneiro *et al.*, dados não publicados).

Da mesma forma que em pacientes (Kowano *et al.*, 1994) no modelo canino (Deplazes *et al.*, 1995) há produção de quatro subclasses de imunoglobulina G (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4) que tem controle semelhante na produção destas subclasses de anticorpos.

Em cães naturalmente infectados com *Leishmania infantum*, a produção de IgG1 e IgG2 foi observada em animais sintomáticos e assintomáticos (Deplazes *et al.*, 1995). A IgG1 foi mais correlacionada com cães sintomáticos e IgG2 com àqueles assintomáticos, semelhante ao observado para cães infectados com *Toxoplasma gondii*. Os níveis elevados de IgG1 podem diminuir a ação de IgG2, competindo por sítios de ligação em proteínas importantes, o que leva a uma diminuição na resistência à infecção. Os resultados obtidos por estes autores, em cães experimentalmente infectados com *Toxocara canis*, indicam que a produção de IgG1 e IgG2 é antagonicamente regulada. A IL-10 é responsável por auxiliar a produção dos isotipos IgG1 e IgG3 (Briere *et al.*, 1994), no entanto, o IFN- γ leva a produção de IgG2 em humanos (Kawano *et al.*, 1994). Um controle semelhante na produção de isotipos de imunoglobulinas em cães mediada pela produção de diferentes citocinas também foi descrito por Deplazes *et al.* (1995).

Até o presente, ainda são escassos trabalhos sobre imunofenotipagem no miocárdio de cães infectados pelo *T. cruzi*, e o conhecimento do infiltrado inflamatório presente neste órgão durante as fases aguda e crônica será de grande relevância. Caliari (2001) inoculou seis cães aos 60 dias de idade, via conjuntival, com 2×10^3 tripomastigotas metacíclicos da cepa Berenice-78. Os animais foram necropsiados entre dois e 10 anos após a inoculação, e a análise histopatológica mostrou uma discreta e moderada cardiomiopatia chagásica fibrosante crônica, a qual foi composta predominantemente por linfócitos. O estudo imunohistoquímico de marcadores de superfície CD4 e CD8, em fragmentos do átrio direito dos cães, apresentou uma média de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de $365 \pm 98,12$ e $411 \pm 114,16$, respectivamente. Em três cães o número de células T CD8⁺ foi mais elevado quando comparado a linfócitos T CD4⁺, apenas um cão apresentou o número de células T CD4⁺ discretamente mais elevado que o de células T CD8⁺, nos outros dois animais as populações de ambas as células apresentaram níveis semelhantes.

Os dados obtidos com roedores como modelos experimentais (Sato *et al.*, 1992; Sun & Tarleton, 1993) e em humanos (Reis *et al.*, 1993) revelam um predomínio de linfócitos T CD8⁺ no infiltrado inflamatório crônico. Estes resultados foram reproduzidos também no modelo canino (Caliari, 2001).

Outro aspecto pouco abordado na infecção canina experimental pelo *T. cruzi* é a quantificação e a cinética da produção de imunoglobulinas que têm participação ativa nos mecanismos imunoprotetores, como anticorpos líticos e a dosagem de subclasses de imunoglobulinas. Estes parâmetros vêm sendo amplamente estudados, tanto em infecções experimentais em camundongos quanto na doença humana. Com a finalidade de compreender melhor a ocorrência das alterações na miocardiopatia chagásica humana, o presente trabalho pretendeu verificar também estas características em cães da raça *Beagle*, infectados com cepas do *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de virulência e patogenicidade para o hospedeiro vertebrado.

2. JUSTIFICATIVA

Durante a infecção pelo *T. cruzi* ocorre uma interação dinâmica na relação do parasito com o hospedeiro que envolve múltiplos fatores atuantes na patogênese da doença de Chagas, alguns inerentes ao parasito e outros ao hospedeiro. Estes fatores estão ligados à carga parasitária e genética do parasito influenciando o tropismo, a virulência, os constituintes antigênicos, além daqueles relacionados ao hospedeiro como, idade, sexo e a constituição genética, que irão determinar a formação e a atuação do sistema imunológico. Os mecanismos imunes que controlam a infecção pelo *T. cruzi* têm sido extensivamente estudados nas últimas décadas, demonstrando a participação de componentes celulares e humorais na resistência à infecção, assim como a sua implicação nos mecanismos de formação de lesões.

Os mecanismos imunológicos envolvidos na patogênese da doença de Chagas durante a fase crônica não estão ainda muito bem esclarecidos. Desta forma, a identificação e a quantificação de células do sistema imune, associado aos mecanismos que as envolva como produção de imunoglobulinas e de fatores solúveis (citocinas, moléculas de adesão), que agem como sinalizadores para a realização de inúmeras funções celulares, são essenciais ao entendimento da história natural da doença de Chagas. São ainda raros os estudos que focalizam a correlação entre o desenvolvimento e a manutenção das diferentes formas clínicas em pacientes portadores da doença de Chagas com o perfil de isotipos e subclasses de imunoglobulinas e a produção de citocinas determinando o seu papel na patogênese ou na proteção.

Ainda há a necessidade de um modelo experimental que reproduza melhor a doença humana, especialmente a fase crônica, para que se possa compreender os mecanismos envolvidos na formação das lesões. No modelo canino têm sido reproduzidas as fases aguda e crônica de maneira similar à infecção humana, além da cardiopatia chagásica crônica fibrosante também muito semelhante à doença humana. Além disto, o tratamento de cães com o benznidazol durante as fases aguda e crônica da infecção chagásica experimental forneceram resultados semelhantes àqueles descritos para o tratamento em seres humanos. Dados que reforçam o modelo canino para os estudos sobre quimioterapia da doença de Chagas. Os animais da raça *Beagle* possuem seus parâmetros imunológicos normais muito bem definidos, tornando possível uma comparação desses dados com aqueles de animais infectados pelo *T. cruzi*, além de ser uma raça com características genéticas homogêneas, o que propicia a obtenção de resultados mais reprodutíveis. Desta forma, o estudo dos aspectos que envolvem a resposta imune durante as fases aguda e crônica da doença de Chagas é relevante para compreender como surgem as lesões nas diferentes manifestações clínicas da doença.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

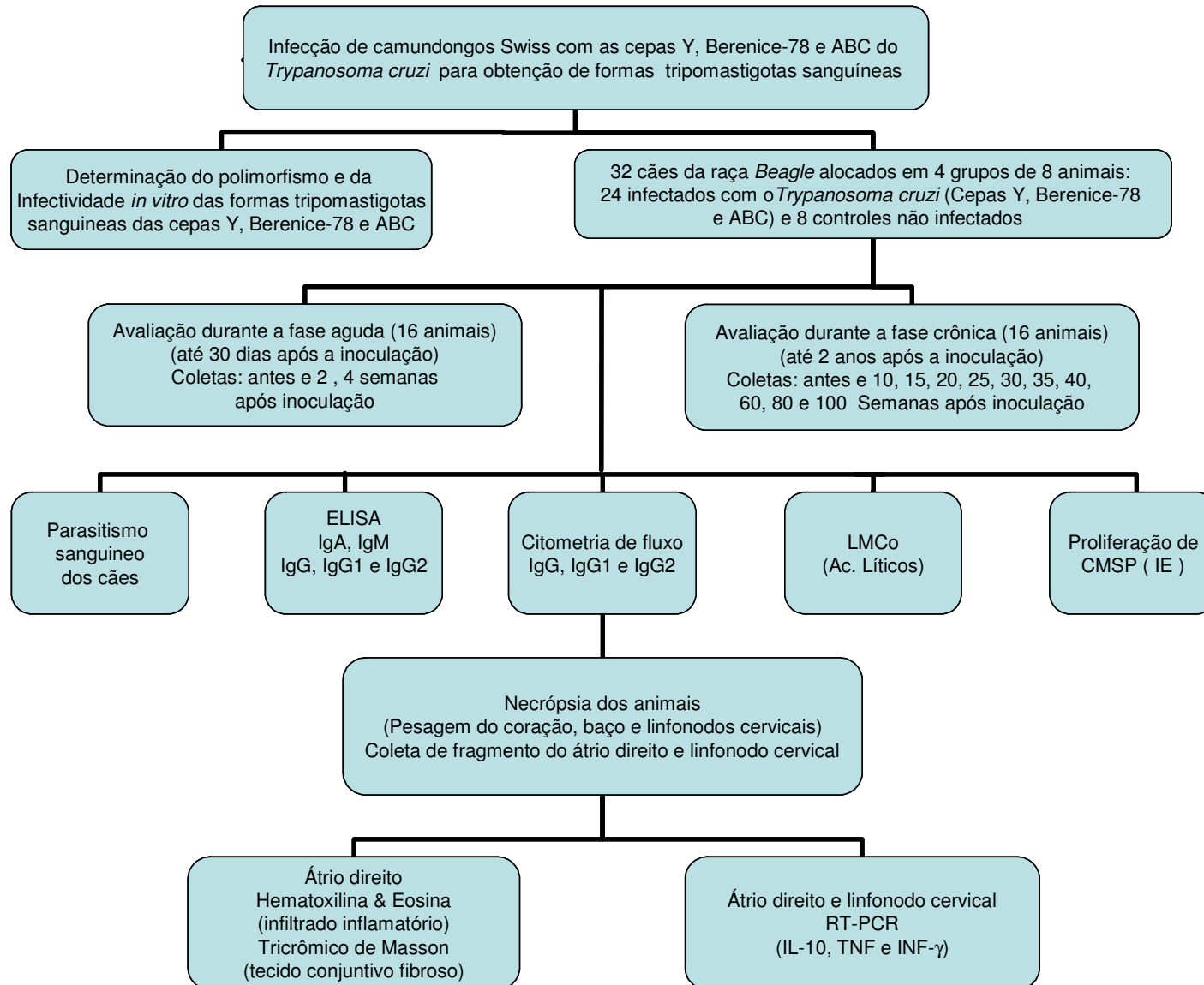
Avaliar a resposta imunológica de cães da raça *Beagle* inoculados com três cepas do *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de virulência e patogenicidade (Y, Berenice-78, e ABC) para o hospedeiro vertebrado durante as fases aguda e crônica da infecção chagásica.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar o polimorfismo das formas sangüíneas presentes nas cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* correlacionando com as alterações anatomopatológicas cardíacas.
- Avaliar a infectividade, *in vitro*, das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.
- Estabelecer a curva de parasitemia no sangue periférico dos cães infectados com as três cepas do *T. cruzi*.
- Avaliar a cinética de produção das imunoglobulinas A (IgA), M (IgM), G (IgG) e suas subclasses IgG1 e IgG2, e de anticorpos líticos nos cães infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi*.
- Analisar a resposta proliferativa das células mononucleares do sangue periférico em animais infectados com as cepas do *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de virulência e patogenicidade.
- Quantificar a cinética de produção de citocinas (IL-10, TNF, INF- γ) *in situ* no coração e nos linfonodos cervicais dos animais infectados pelo *T. cruzi* durante as fases aguda e crônica da infecção.
- Avaliar quantitativamente a área ocupada pela inflamação e por fibrose presentes na musculatura cardíaca nas fases aguda e crônica da infecção.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Delineamento experimental



4.2 Cepas do *Trypanosoma cruzi*

As cepas de *T. cruzi* estudadas neste trabalho foram classificadas como *T. cruzi* II (Anonymous, 1999), linhagem genética mais encontrada no ciclo doméstico da doença de Chagas. A cepa Y, isolada de um indivíduo na fase aguda por Pereira de Freitas em 1950, Marília, SP (Freitas *et al.*, 1953) e, posteriormente estudada e descrita por Silva & Nussenzweig (1953); a cepa Berenice-78 foi isolada em 1978 por xenodiagnóstico da paciente Berenice e, considerado provavelmente, o primeiro caso humano descrito no Brasil (Lana & Chiari, 1986); e a ABC, isolada por xenodiagnóstico de um paciente que apresentava alterações cardíacas e digestivas, procedente do estado de Minas Gerais em 1962 (Brener, 1965).

4.3 Polimorfismo e Infectividade das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*

O estudo do polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas foi realizado por meio do exame microscópico diretamente do sangue a fresco em 12 camundongos Swiss infectados com o *T. cruzi* durante o pico de parasitemia da fase aguda da infecção no 7º dia com a cepa Y, no 14º dia com a cepa Berenice-78 e no 12º dia com a cepa ABC. Foi realizada a coleta de 3µl de sangue de vasos da ponta da cauda e contadas 200 formas tripomastigotas aleatoriamente em microscopia óptica (400×) classificando-as como fina, larga e muito larga (Brener & Chiari, 1963).

A infectividade das cepas do *T. cruzi* foi avaliada semeando-se uma suspensão na concentração de $1,25 \times 10^4$ células da linhagem VERO/poço de lâminas de cultura (*Chamber Slide*, catalog number 177402, Nunc Inc. Illinois, USA). Estas células foram mantidas em meio de cultura DMEM (*GIBCO, Grand Island, New York, USA*), suplementado de 5% de soro fetal bovino inativado a 56°C (*Nutricell*, Campinas, SP, Brasil), 2,5% HEPES pH 7,2 1M, 1% de glutamina 2mM/ml, 0,1% de mercaptotanol 50mM/ml, 0,2% de sulfato de gentamicina 200µg/ml (*Shering-Plough*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ com atmosfera umidificada 95% durante 24h. As temperaturas ideais de infectividade e diferenciação (37°C e 33°C, respectivamente) das cepas de *T. cruzi* estudadas foram determinadas previamente. Em seguida, formas tripomastigotas obtidas de cultura celular das três cepas estudadas foram contadas em câmara de Neubauer e colocadas em cada poço na proporção de 10:1 ($12,5 \times 10^4$ parasitos/poço) em relação às células. Após 24h de contato as células foram lavadas duas vezes com PBS gelado para remover os parasitos que não foram interiorizados e àqueles ainda aderidos à membrana das células. A seguir foram adicionados 400µl de meio de cultura DMEM suplementado com 1% de soro fetal bovino (SFB) em cada poço e as lâminas incubadas a 33°C. Após 48h, o meio de cultura foi removido e as lâminas foram fixadas em Bouin por 15 minutos, lavadas em água corrente e coradas em Giemsa 16-18 horas, diferenciadas em etanol a 70% e clarificadas em baterias de acetona/xilol.

Após a montagem das lâminas (Entellan, Merck), foram contadas 500 células aleatoriamente em microscopia óptica (400×) e determinado o número de células infectadas e o número médio de amastigotas por células.

4.4 Animais

Todos os procedimentos experimentais foram realizados de acordo com o COBEA (Colégio Brasileiro de Experimentação Animal) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade Federal de Ouro Preto. Foram utilizados 32 cães da raça *Beagle* obtidos e mantidos no canil da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP). Os animais foram alocados em grupos de quatro animais, 16 deles foram utilizados para a avaliação da fase aguda e 16 para a fase crônica, sendo quatro controles, não infectados, e quatro infectados com cada uma das três cepas do *T. cruzi*. A distribuição por sexo, cepa utilizada para infecção e fase da doença em que os animais foram eutanaziados encontram-se sumarizados na Tabela 1. Os animais foram alimentados com ração comercial (Mascote para filhotes) e água *ad libitum*. Antes da inclusão no estudo, os animais foram tratados com anti-helmínticos e imunizados com a vacina Vanguard® HTLP 5/CV-L contra cinomose, adenovírus Tipo 2, coronavírus, parainfluenza, parvovirose e leptospirose canina.

4.5 Infecção dos animais

Os animais foram inoculados aos 120 dias de idade com 4×10^3 formas tripomastigotas sangüíneas/kg de peso, via intraperitoneal, obtidos de camundongos *Swiss* infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi* e mantidos no Biotério Central da UFOP. A parasitemia dos animais foi avaliada diariamente, a partir do 5º dia após inoculação, por meio de uma alíquota de 5µl sangue coletada da veia marginal da orelha dos cães e examinada ao microscópio (400×) para a contagem dos parasitos. A quantificação dos parasitos foi realizada de acordo com a técnica descrita por Brener (1962) diariamente até 10 dias após a negatificação para a determinação do período pré-patente (PPP), da curva de parasitemia (CP), do período patente (PP) e do pico máximo de parasitemia (PMP).

4.6 Análise da produção de imunoglobulinas

A coleta de sangue dos animais para a obtenção do soro e análise da produção de imunoglobulinas (IgA, IgM, IgG total, IgG1, IgG2 e anticorpos líticos) foi realizada antes da inoculação, com duas e quatro semanas após a infecção nos animais necropsiados durante a fase aguda da infecção e naqueles acompanhados no curso da infecção crônica com duas, quatro, seis, dez, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80 e 100 semanas.

Tabela 1 – Distribuição por sexo dos cães *Beagle* utilizados para a avaliação das fases aguda e crônica da doença de Chagas.

Nº dos animais	Fase da doença	Cepa	Sexo
1	Aguda	Y	Fêmea
2	Aguda	Y	Fêmea
3	Aguda	Y	Macho
4	Aguda	Y	Macho
5	Aguda	ABC	Fêmea
6	Aguda	ABC	Macho
7	Aguda	ABC	Macho
8	Aguda	ABC	Macho
9	Controle da fase aguda	Não infectado	Fêmea
10	Controle da fase aguda	Não infectado	Macho
11	Controle da fase aguda	Não infectado	Macho
12	Controle da fase aguda	Não infectado	Fêmea
13	Aguda	Berenice-78	Macho
14	Aguda	Berenice-78	Macho
15	Aguda	Berenice-78	Macho
16	Aguda	Berenice-78	Fêmea
17	Crônica	Y	Fêmea
18	Crônica	Y	Fêmea
19	Crônica	Y	Macho
20	Crônica	Y	Macho
21	Crônica	ABC	Fêmea
22	Crônica	ABC	Fêmea
23	Crônica	ABC	Fêmea
24	Crônica	ABC	Fêmea
25	Controle da fase Crônica	Não infectado	Macho
26	Controle da fase Crônica	Não infectado	Fêmea
27	Controle da fase Crônica	Não infectado	Fêmea
28	Controle da fase Crônica	Não infectado	Macho
29	Crônica	Berenice-78	Fêmea
30	Crônica	Berenice-78	Fêmea
31	Crônica	Berenice-78	Macho
32	Crônica	Berenice-78	Macho

4.6.1 Dosagem de IgA, IgM e IgG total e das subclasses (IgG1 e IgG2) por ELISA

A técnica de ELISA foi utilizada para a dosagem de IgA, IgM, IgG total e subclasses (IgG1 e IgG2), conforme descrita por Voller *et al.* (1976). As formas epimastigotas da cepa Y em meio acelular (*Liver Tryptose infusion-LIT*) na fase exponencial de crescimento foram utilizadas como antígeno, e os parasitos foram tratados com uma solução de NaOH 0,15M e mantidos a 4°C sob agitação durante 18h. A seguir, a solução foi neutralizada com HCl 0,15 M (Vitor & Chiari, 1987). Os antígenos foram distribuídos em alíquotas e conservados a -79°C até o momento de uso. As proteínas foram dosadas pelo método de Lowry *et al.* (1951) e posteriormente foi realizada a titulação em bloco visando definir a concentração mínima de proteínas para a sensibilização das placas plásticas de fundo chato com 96 poços (*Catalog number 2595, Costar, Cambridge, USA*). O conjugado utilizado para a dosagem de IgA, IgM e IgG total é uma anti-imunoglobulina total de cão do isotipo IgG obtida de soro imune de cabra e marcada com peroxidase (*Bethyl Laboratories, Montgomery, USA*). Para a dosagem das subclasses de IgG foram utilizados anticorpos anti-IgG canino das respectivas subclasses (IgG1 e IgG2) conjugados com peroxidase (*Bethyl Laboratories, Montgomery, USA*).

As placas foram sensibilizadas adicionando-se em cada poço 100µl do antígeno diluído em uma solução tampão carbonato/bicarbonato pH 9,6, seguida de incubação por 18h a 24h. Após a sensibilização, o excesso da solução antigênica foi removido por uma série de quatro lavagens com solução salina contendo *Tween-20* a 0,05% (PBS-T). Em seguida, após a adição de PBS contendo 5% de SFB, as placas foram incubadas a 37°C por 30min. e foram adicionados 100µl de soro de cão diluídos em PBS-T na concentração de 1:80, e incubadas novamente a 37°C por 45min. Após quatro lavagens foram adicionados 100µl do conjugado diluído em PBS-T e as placas incubadas a 37°C por 45min. Estas foram lavadas e adicionados 100µl de tampão fosfato citrato 0,1M, pH 5,0 contendo 0,03% de ortofenilenodiamino-OPD (*Sigma Chemical Company, St. Louis, USA*) e 0,012% de peróxido de hidrogênio como substrato. As placas foram incubadas por 20min a 37°C no escuro e a reação interrompida com 32µl de uma solução de ácido sulfúrico 2,5M. A leitura das reações foi realizada em espectrofotômetro com filtro de 492nm e os resultados expressos em absorbância. Em todas as placas foram utilizados soros controle positivos e negativos.

4.6.2 Dosagem de IgG total e subclasses (IgG1, IgG2) pela citometria de fluxo

Os soros foram inativados a 56°C durante 30min. As formas tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas de cultura celular da linhagem VERO. Estas células foram descongeladas e semeadas em garrafas estéreis de 75cm² contendo 10ml de meio RPMI (*GIBCO, Grand Island, New York, USA*), suplementado de 5% de soro fetal bovino (SFB) inativado a 56°C por 30min (*Nutricell, Campinas,*

SP, Brasil), 2,5% HEPES pH 7,2 1M, 1% de glutamina 2mM/ml, 0,1% de mercaptotanol 50mM/ml, 0,2% de sulfato de gentamicina 200µg/ml (*Shering-Plough*, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) e incubadas a 37°C em 5% de CO₂ com atmosfera umidificada 95%. As monocamadas semiconfluentes foram inoculadas com formas tripomastigotas da cepa Y e lavadas com PBS pH 7,2 estéril após 24h. Posteriormente (após quatro ou cinco dias da infecção) as formas tripomastigotas presentes no sobrenadante da cultura foram colhidas e contadas para a realização dos experimentos.

A marcação imunofluorescente dos parasitos foi realizada segundo descrito por Martins-Filho *et al.* (1995) modificada para placas de 96 poços com fundo em U (*LINBRO*, *ICN Biomedicals*, *Ohio, USA*). Nestas placas foram colocados 50µl de suspensão contendo $2,5 \times 10^5$ tripomastigotas obtidos de cultura celular/poço adicionados de 50µl dos soros dos animais infectados e controles (1:128) e incubados a 37°C durante 30min. Após incubação com soro, os parasitos foram fixados por 10min a temperatura ambiente com o acréscimo de 100µl de paraformaldeído 4% (diluído em PBS pH 7,2). Em seguida, os parasitos foram lavados duas vezes com 150µl de PBS-10%SFB a $1.000 \times g$ durante 10min a 4°C e re-incubados no escuro a 37°C durante 30min na presença de isotiocianato de fluoresceína (IF) conjugado com anticorpos anti-IgG canino total ou com anticorpos das subclasses (IgG1 e IgG2) anti-IgG canino (*Bethyl Laboratories*, *Montgomery, USA*). Para cada reação colocamos um controle de ligação não específica, onde foram incubados apenas os parasitos e os anticorpos anti-IgG canino/IF. Os parasitos marcados foram novamente lavados duas vezes com 150µl de PBS-10%SFB a $1.000 \times g$ durante 10min a 4°C e re-suspensos em 150µl de PBS/azida com 10% de albumina bovina. As amostras foram mantidas a 4°C ao abrigo de luz até o momento da leitura no citômetro de fluxo (*FACScan-Becton Dickinson*, *San Jose, CA, USA*) e os parasitos marcados foram estocados a 4°C por no máximo 24h antes da análise citofluorométrica.

4.6.3 Cinética da produção de anticorpos líticos

A reação de LMCo foi realizada como descrita por Krettli *et al.* (1979) modificada por Galvão *et al.* (1993). Alíquotas de 50µl de uma suspensão contendo cerca de $6-7 \times 10^6$ tripomastigotas/ml em meio de cultura TC199 suplementado com 10% de SFB e mantidas em banho de gelo foram incubadas com complemento humano (CHu) a 37°C durante 45min para confirmação da resistência total à lise com CHu em ausência de soro imune. Posteriormente, 50µl da suspensão de tripomastigotas foram adicionados em tubos plásticos de 5ml contendo 50µl do soro teste inativado (56°C durante 30min), na diluição de 1:2 e 1:4, e incubados a 37°C por 30min. A seguir, os tubos foram colocados em banho de gelo e 50µl da suspensão de antígeno/anticorpos foram adicionados aos tubos contendo 50µl de CHu e os parasitos contados em câmara de *Neubauer* (Tempo Zero=T₀). Após a contagem, os tubos foram re-incubados a 37°C por 45min,

recolocados em gelo, e os parasitos recontados (Tempo 45min=T45). Os experimentos foram realizados em duplicata e soros de animais não infectados e infectados, usados como controles negativo e positivo, e apenas parasitos com mobilidade contados. Os testes foram considerados positivos quando a percentagem de lise foi superior a 20%.

A percentagem de lise foi calculada da seguinte forma:

$$\% \text{lise} = \frac{100 - \text{N}^\circ \text{ de parasitos no tempo 0 min} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de parasitos no tempo 45 min}}$$

4.7 Proliferação de células mononucleares do sangue periférico

O índice de estimulação das células mononucleares do sangue periférico (CMSP) dos animais necropsiados durante a fase aguda foi avaliado no sangue colhido antes da inoculação, com duas e quatro semanas após a infecção, e naqueles avaliados no curso da fase crônica, com duas, quatro, seis, dez, 15, 20, 25, 30, 40, 60, 80 e 100 semanas após a infecção. A obtenção das células mononucleares do sangue periférico foi realizada em 20ml de sangue estéril coletado com anticoagulante. Para separação do anel de linfócitos, ao sangue heparinizado foi adicionado Ficoll Hpaque (1:1) e centrifugado a $800 \times g$ por 30min a 10°C . O anel de células foi removido e após a adição de meio de cultura RPMI (*GIBCO, Grand Island, New York, USA*) estéril, centrifugado a $110 \times g$ por 10min a 15°C , sendo a seguir re-suspendido em 2ml de meio RPMI suplementado com 20% de SFB inativado a 56°C por 30min (*Nutricell, Campinas, SP, Brasil*), 2,5% HEPES pH 7,2 1M, 1% de glutamina 2mM/ml, 0,1% de mercaptotanol 50mM/ml, 0,2% de sulfato de gentamicina 200µg/ml (*Shering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil*). As células obtidas foram contadas em câmara de *Neubauer* e plaqueadas na concentração de $3,5 \times 10^6/\text{ml}$.

A avaliação da capacidade proliferativa (índice de estimulação) foi realizada em micro-placas de 96 poços. Em cada poço foram colocadas 200µl de células re-suspendidas em meio CTCM com 20% de SFB, dois poços estimulados com 25µl Concanavalina-A (80µg/ml), dois com 10µl antígeno de *T. cruzi* (10^8 tripomastigotas/ml) e quatro deles permaneceram sem estímulo e foram considerados como controles. As células estimuladas com Concanavalina-A foram marcadas com timidina 72h após a realização da técnica e as células estimuladas com antígeno de *T. cruzi* foram marcadas 120h e ambas foram coletadas 12-16h após a marcação. Esta coleta foi realizada com auxílio de um coletor de células para micro-placas de 96 poços utilizando papel de filtro de microfibras de vidro (*Whatman, grau 934-AH*). O conteúdo de cada poço foi coletado separadamente nestes confetes de papel. A contagem das células foi realizada colocando-se cada confete em um tubo plástico contendo 2,5ml de solução de cintilação, estes tubos foram colocados em um

cintilador *Beckman LS 6000 SC* (*Beckman Instruments, USA*) que mede a incorporação de (³H)-timidina pelas células mononucleares do sangue periférico. O índice de estimulação (IE) foi determinado pela divisão do valor encontrado para a célula estimulada (CE) e o valor encontrado com as células não estimuladas (C), assim, $IE=CE/C$.

4.8 Necrópsia dos animais e coleta do material

Os animais foram eutanasiados 30 dias e dois anos após a inoculação do *T. cruzi* para a avaliação das lesões teciduais ocorridas durante as fases aguda e crônica da infecção. A seguir, foi realizada a necrópsia e avaliação macroscópica dos órgãos linfóides (baço e linfonodos cervicais), da área cardíaca, fígado, e do sistema digestivo (esôfago, estômago, ceco e cólon). Para verificar a presença de linfadenopatia, esplenomegalia e cardiomegalia, o peso dos órgãos foi determinado e relacionado com o peso de cada animal obtendo-se um índice de peso (IP) [(IP= Peso do órgão(g) ÷ Peso do cão(kg)]. Em seguida, um fragmento de aproximadamente 1cm × 1cm × 0,2cm da parede atrial direita de todos os cães foi coletado para realização da histopatologia. O átrio direito é uma das regiões onde a miocardite chagásica canina processa-se com maior frequência, sendo mais fácil o encontro de células inflamatórias necessárias ao estudo proposto (Caliari, 2001). Os fragmentos do átrio direito utilizados para o processamento da histopatologia foram conservados em gelo e fixados em formalina 10%. Para realização da RT-PCR foram coletados fragmentos de 50mg do átrio direito e do linfonodo cervical em solução desnaturante (*kit RNAgentes® Total RNA Isolation System, Catalog: Z5110, Promega, USA*) e estocados a -79°C.

4.9 Histopatologia

4.9.1 Técnica de Hematoxilina & Eosina (H&E)

A coloração por H&E foi realizada em fragmentos do tecido cardíaco para evidenciação do infiltrado inflamatório. Dois cortes seriados com 4µm de espessura obtidos da parede atrial direita de cada cão infectado foram desparafinizados em dois banhos de xilol, 15min cada, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes de álcool (100%, 90%, 80% e 70%), 10min cada, e lavados em água corrente por 10min e em PBS pH 7,2 por 5min. Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina por 10min, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado, novamente lavados em água corrente e corados pela Eosina durante 1min. Após o último processo de lavagem em água corrente foram levados à estufa a 56°C para secagem. Posteriormente foram colocados em banho de xilol durante 30min, e então, montadas as lâminas com auxílio de entellan.

4.9.2 Quantificação da inflamação na área cardíaca

Todos os núcleos celulares presentes no fragmento do átrio direito foram quantificados em 30 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). As imagens visualizadas pela objetiva de 40× foram digitalizadas através de microcâmera JVC TK-1270/RGB e do programa KS300 contido no analisador de imagens *Kontron Elektronik/Carl Zeiss*. O processo inflamatório foi determinado pelo número de núcleos das células presentes nos animais não infectados, acrescido de um desvio padrão, os animais infectados com o *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média foram considerados com inflamação cardíaca.

4.9.3 Técnica de Tricrômico de Masson

Para observação de tecido conjuntivo fibroso e determinação da fibrose, fragmentos cardíacos foram corados pela técnica de tricrômico de Masson. Após desparafinização e hidratação de dois cortes da parede atrial direita, estes foram corados com hematoxilina por 2min, lavados em água corrente e corados durante 5min pela solução número 1 (90ml Sudam 1% em solução alcoólica, 10ml fucsina ácida 1% em solução aquosa e 1ml de ácido acético glacial). Posteriormente foram lavados em água corrente, corados durante 10min pela solução número 2 (2,5g ácido fosfotúngstico, 2,5g ácido fosfomolibdico em 100ml de água destilada), novamente lavados. Em seguida foram corados por 5min pela solução número 3 (2,5g azul de anilina, 2ml de ácido acético glacial em 100ml água destilada), lavados e submetidos à solução de água acética 10% durante 5min. Realizado o último processo de lavagem, os cortes foram desidratados, secados em estufa (56°C) e colocados em xilol por 30min e montados em lâminas com auxílio de entellan.

4.9.4 Análise quantitativa da área ocupada por tecido conjuntivo fibroso

Os cortes de tecido muscular cardíaco (átrio direito) foram corados pelo tricrômico de Masson e selecionados para a captura de imagens. Utilizando o analisador de imagens foram obtidas 30 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,6 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) de cada animal controle (não infectado) e infectado. As imagens visualizadas pela objetiva de 40× foram digitalizadas usando a microcâmera JVC TK-1270/RGB e do programa KS300 contido no analisador de imagens *Kontron Elektronik/Carl Zeiss*. Utilizando a função de segmentação de imagens, todos os pixels com tons azuis foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total ocupada por fibrose nos cães infectados e pelo tecido conjuntivo fibroso normal nos cães controle. O mesmo procedimento foi adotado para o cálculo da área ocupada por musculatura, através da seleção de pixels com tons de vermelho. Todas as áreas obtidas foram comparadas por

meio do teste *t* de *Student* (programa *GraphPad InStat*) entre os cães controle e os infectados com as três cepas do *T. cruzi* estudadas.

4.10 Produção de citocinas *in situ* pela RT-PCR

A dosagem das citocinas *in situ* INF- γ , TNF e IL-10 foi realizada pela técnica de RT-PCR nos linfonodos cervicais e no átrio direito dos animais controles não infectados e infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. Para a realização desta técnica foram coletados fragmentos de 50mg do linfonodo cervical e do átrio direito, colocados em tubo *ependorf* de 1,5ml contendo 300 μ l de solução desnaturante e mantidos a -70°C até o momento da extração do RNA.

4.10.1 Extração de RNA

O RNA foi extraído dos tecidos usando o kit *RNAgentes*® *Total RNA Isolation System* (*Catalog: Z5110, Promega, USA*). Os tecidos foram macerados com auxílio de maceradores de teflon, adicionados 30 μ l de acetado de sódio 2M (pH 4,0) e 300 μ l de fenol/clorofórmio homogeneizados em vórtex durante 10 segundos e os tubos mantidos em gelo por 15min. Posteriormente centrifugados a $10.000 \times g$ por 20min a 4°C e cuidadosamente removido, com auxílio de pipeta a fase aquosa superior que contém o RNA e medido o seu volume transferindo-a para outro tubo *ependorf* de 1,5ml. O DNA genômico e as proteínas permanecem na fase orgânica inferior e na interface. Para a precipitação do RNA foram adicionados 300 μ l de isopropanol homogeneizados em vórtex, incubados em gelo durante 30min e centrifugados a $10.000 \times g$ por 10min a 4°C . A seguir, o sobrenadante foi descartado e o RNA contido no sedimento foi lavado com 500 μ l de etanol 75%, homogeneizado com pipeta e centrifugado a $10.000 \times g$ por 5min a 4°C . Após a lavagem do RNA o sobrenadante foi descartado e o sedimento de RNA submetido à secagem ao ar, os tubos foram colocados virados sobre papel absorvente durante 30min. O precipitado foi dissolvido em 20 μ l de água livre de RNase e os tubos incubados a $55-60^{\circ}\text{C}$ para dissolução do RNA. Para a dosagem do RNA, 1 μ l da amostra foi diluída em 500 μ l de água livre de RNase e realizadas leituras de absorbância em espectrofotômetro com luz UV utilizando filtros de 260nm e 280nm. As amostras foram consideradas com um bom grau de pureza e utilizadas quando a relação das leituras de absorbância a 260/280nm foram superiores a 1,8. O RNA foi quantificado utilizando a seguinte fórmula:

$$[\text{RNA}] (\mu\text{g}/\mu\text{l}) = \frac{\text{absorbância } 260\text{nm} \times 40 \times \text{diluição da amostra de RNA}}{1000}$$

As amostras foram diluídas em água livre de RNase e suas concentrações ajustadas para 1µg/µL, acondicionadas a -70°C até a realização da transcrição reversa.

4.10.2 Síntese de cDNA

Antes da realização da síntese de cDNA as amostras foram tratadas com DNase (*Catalog M6101, Promega, USA*). Para isto, foram adicionados aos microtubos plásticos *epENDORF* 3µl de água livre de RNase; 0,5µl do tampão da reação 10×; 0,5µl/0,5U DNase; 0,5µl/0,5µg de RNA e incubados a 37°C durante 15min. Em seguida, a DNase foi inativada acrescentando 0,5µl de solução de bloqueio da DNase e as amostras incubadas a 75°C durante 10min. Posteriormente, as amostras foram resfriadas em gelo durante 5min, a síntese de cDNA concluída e acrescentados 0,5µl oligo DT (*Catalog 18418-012, Invitrogen, USA*); 0,5µl mix dNTP 10mM (*Catalog 55082, 55083, 55084, 55085, Invitrogen, USA*). As amostras foram incubadas a 65°C por 5min, resfriadas em gelo durante 2min e realizada uma centrifugação rápida. Posteriormente foram adicionados 2µl do tampão primeira fita 5×; 1µl DTT 0,1M e 0,5µl de RNase OUT (*Catalog 10777-019, Invitrogen, USA*), homogeneizados em vórtex por 10 segundos e incubado a 42°C durante 2min. Foram colocados 0,5µl de transcriptase reversa (*Catalog 18064-014, Invitrogen, USA*) e os tubos incubados a 42°C durante 1h para a síntese do cDNA. Em seguida, a transcriptase reversa foi inativada com incubação a 70°C durante 15min e o cDNA estocado a -20°C.

4.10.3 Realização da PCR e quantificação de citocinas

A PCR foi processada utilizando 2µl da solução de cDNA de cada amostra; 0,036µl MgCl₂ 50mM (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 1,2µl tampão 10× (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 1µl dNTPs 2,5mM (*Promega, USA*); 0,1µl de Taq DNA polimerase 5 U/µl (Catálogo 11615-010, Invitrogen, Brasil); 0,3µl de cada iniciador (senso e anti-senso) na concentração de 20µM e 7,064µl de água livre de RNase perfazendo um volume final de 12µl de reação. Os iniciadores utilizados foram para HPRT (sense: AAGCTTGCTGGTGAAAAGGA, anti-sense: CAATGGGACTCCAGATGCTT) gerando um produto de 219pb; TNF (sense: CCCAAATTGCCTCCAACTAA, anti-sense: CTGGTTGTCTGTCAGCTCCA) gerando um produto de 181pb; INF-γ (sense: CGGCCTAACTCTCTGAAACG, anti-sense: CCTCCCTCTTACTGGTGCTG) gerando um produto de 380pb; IL-10 (sense: AGCACCTACTTGAGGACGA, anti-sense: GATGTCTGGTTCGTGGTTCT) gerando um produto de 249pb (Dialab, Brasil). Estes iniciadores anelam-se as regiões específicas do gene da HPRT (proteína constitutiva) e das citocinas estudadas (TNF, INF-γ e IL-10).

As condições da reação foram: desnaturação do DNA a 94° C por 1min (com etapa inicial mais longa 2min), anelamento dos iniciadores a 57° C por 1min, extensão a 72°C por 1min e 30 segundos (com etapa final de 6min). A amplificação foi realizada com 28, 32, 32 e 40 ciclos em um termociclador automático (Eppendorf, Master Cycler 5330, USA) utilizando os iniciadores de HPRT, TNF, INF- γ e IL-10, respectivamente. Na etapa de mistura da reação da PCR foi utilizado como controle negativo a água livre de RNase. Os produtos amplificados foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 6% e revelados pela prata (Santos *et al.*, 1993). O fragmento a ser amplificado foi monitorado pela utilização de marcadores de peso molecular (100pb DNA Ladder, Catálogo: 15628-019, Gibco, Brasil). Após a eletroforese o gel foi fixado em solução de etanol a 10% e ácido acético a 0,5% por 5min sob agitação. A seguir, esta solução foi descartada e o gel corado pelo nitrato de prata a 0,2% por 10min sob agitação e o gel lavado por 30 segundos em água deionizada. Posteriormente, o gel foi revelado em solução de NaOH 0,75M e formaldeído 0,1M com agitação até nítido aparecimento das bandas. Novamente o gel foi transferido para a solução fixadora e posteriormente secado entre folhas de papel celofane permeável.

A quantificação das citocinas presentes foi determinada baseada na densidade óptica obtida pela análise das bandas de DNA das amostras pelo *software quantity-one* (The Discovery series 1998, Biorad laboratories, USA). Foi obtido para cada amostra um índice de produção de citocinas, onde: Produção de citocinas = densidade óptica do produto de PCR da citocina \div densidade óptica do produto de PCR da HPRT.

4.11 Análise estatística

O período patente e o pico máximo de parasitemia observados para os animais infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* foram comparados por meio de análise de variância dos dados pelo teste de Tukey (Snedecor & Cochran, 1989). A produção de citocinas *in situ* foi comparada pelo teste *t Student*. A variação dos índices de estimulação das CMSP, e dos níveis médios de anticorpos em função do tempo (semanas após a infecção) foram testadas pela regressão linear. A comparação da tendência desta variação observada entre os grupos de animais infectados (Y, Berenice-78, ABC) e não infectados foi analisado pelo teste de comparação de linhas de regressão (MANOVA) no programa estatístico SPSS versão 8.0. As diferenças entre as médias dos níveis de anticorpos e do índice de estimulação observados na 60^a semana após a inoculação foram testadas pela análise de variância e teste de hipótese de *Schéffe* (Snedecor & Cochran, 1989). Em todos os casos, as diferenças foram consideradas significativas quando o valor de *P* foi menor que 0,05.

5. RESULTADOS

5.1 Parâmetros biológicos

5.1.1 Polimorfismo e infectividade das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*

O polimorfismo de formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* nas diferentes cepas foi constatado pelo predomínio de 91±5% de formas finas para a cepa Y, e de formas largas para as cepas Berenice-78 (90±3%) e ABC (84±4%) (Gráfico 1). Entretanto foi detectada a presença de um percentual mais elevado (15±2%) de formas delgadas para a cepa ABC do que para a cepa Berenice-78 (5±3%), o que poderia justificar uma interiorização mais intensa *in vitro*, observada para a cepa ABC quando comparada a Berenice-78.

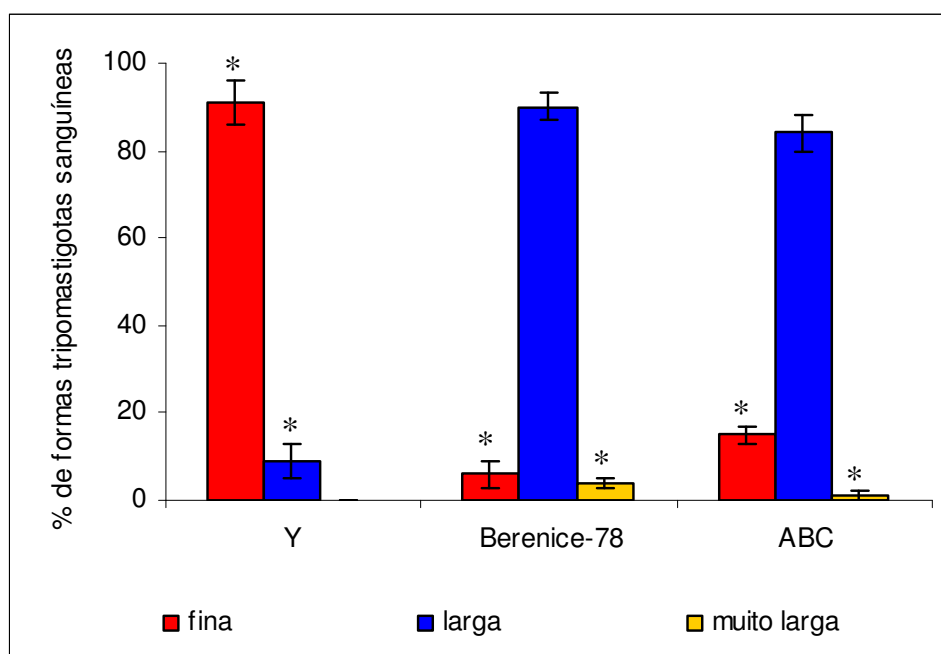


Gráfico 1 - Polimorfismo de formas tripomastigotas sanguíneas encontradas durante o pico de parasitemia da fase aguda da infecção de camundongos Swiss inoculados com as cepas Y (7^o dia de infecção), Berenice-78 (14^o dia de infecção) e ABC (12^o dia de infecção) do *T. cruzi*. (*) P<0,05 diferença significativa em relação aos demais grupos.

As cepas Y (27,7±6,1) e ABC (15,2±2,1) demonstraram alta taxa de infectividade, enquanto a cepa Berenice-78 (1,2±0,4) a infectividade foi mais baixa (Figura 1 e Gráfico 2). Nas células infectadas com as cepas Y (3,3±0,4) e ABC (2,1±0,4) foi observado um número mais elevado de amastigotas do que na cepa Berenice-78 (1,2±0,3), indicando que mais de um parasito foi internalizado por célula (Gráfico 3).

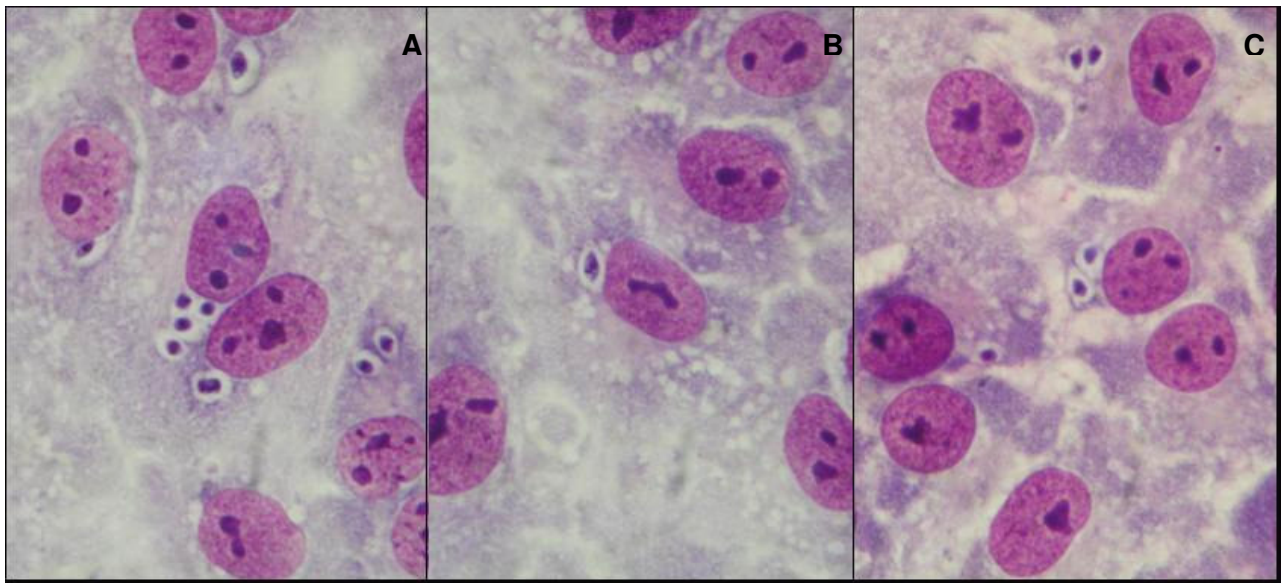


Figura 1 - Células da linhagem VERO infectadas com $12,5 \times 10^4$ tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas de cultura celular das cepas Y (A), Berenice-78 (B) e ABC (C) mostrando as formas amastigotas após 48h de infecção.

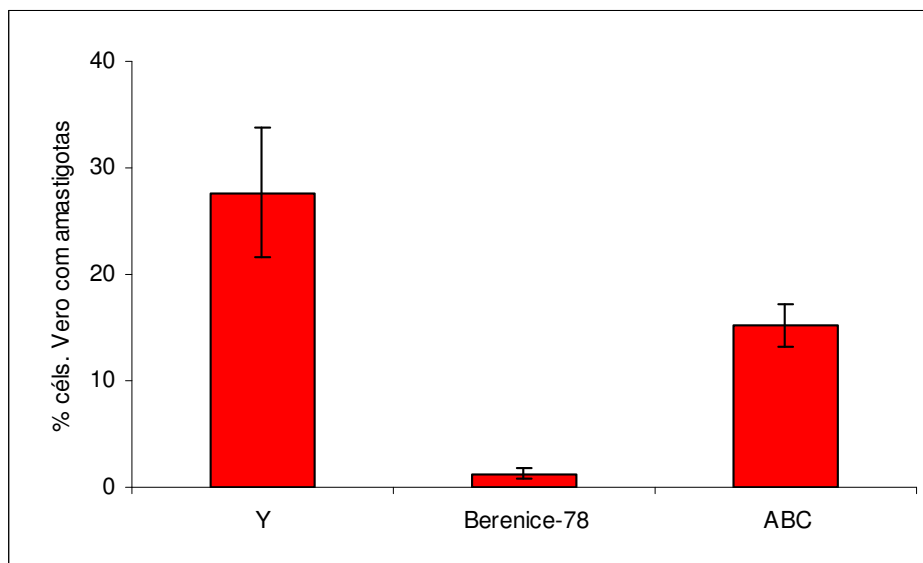


Gráfico 2 - Percentagem de células VERO contendo amastigotas 48h após a infecção com $12,5 \times 10^4$ tripomastigotas de *T. cruzi* obtidas de cultura celular das cepas Y, Berenice-78 e ABC.

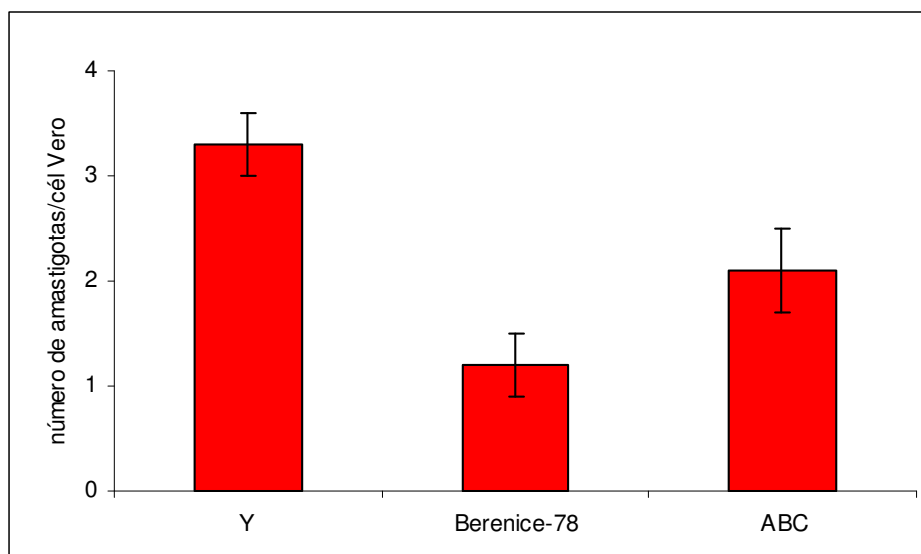


Gráfico 3 - Número de amastigotas por célula 48h após a infecção com $12,5 \times 10^4$ tripomastigotas de cultura celular das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.

5.1.2 Curva de parasitemia

As cepas Y, Berenice-78 e ABC apresentaram diferenças significativas nos parâmetros biológicos quando inoculadas em cães da raça *Beagle*. Foram observados três perfis diferentes de curvas de parasitemia nos animais inoculados com estas cepas do *T. cruzi* (Gráfico 4). O primeiro perfil, observado para a cepa Y, mostrou pico de parasitemia bem definido no 15º dia de infecção, e níveis de parasitemia intermediários em relação às cepas Berenice-78 e ABC. O segundo, produzido pela cepa Berenice-78, apresentou baixos níveis de parasitemia com três picos de parasitemia pouco definidos no 21º, 26º e 28º dia após a inoculação. O terceiro perfil apresentado pela cepa ABC mostrou dois picos distintos de parasitemia no 24º e 28º dia após a infecção, e altos níveis parasitêmicos em relação às outras cepas estudadas. Os períodos pré-patentes foram menores nos animais inoculados com as cepas Y e ABC (12 e 14 dias, respectivamente), em relação aos animais infectados com a cepa Berenice-78 (18 dias). Os animais inoculados com a cepa ABC apresentaram o período patente mais longo (23 dias), enquanto aqueles inoculados com a cepa Berenice-78 apresentaram períodos intermediários (12 dias) e naqueles infectados com a cepa Y foram observados os períodos patentes mais curtos (7 dias). Não foi observada mortalidade entre os cães após a infecção.

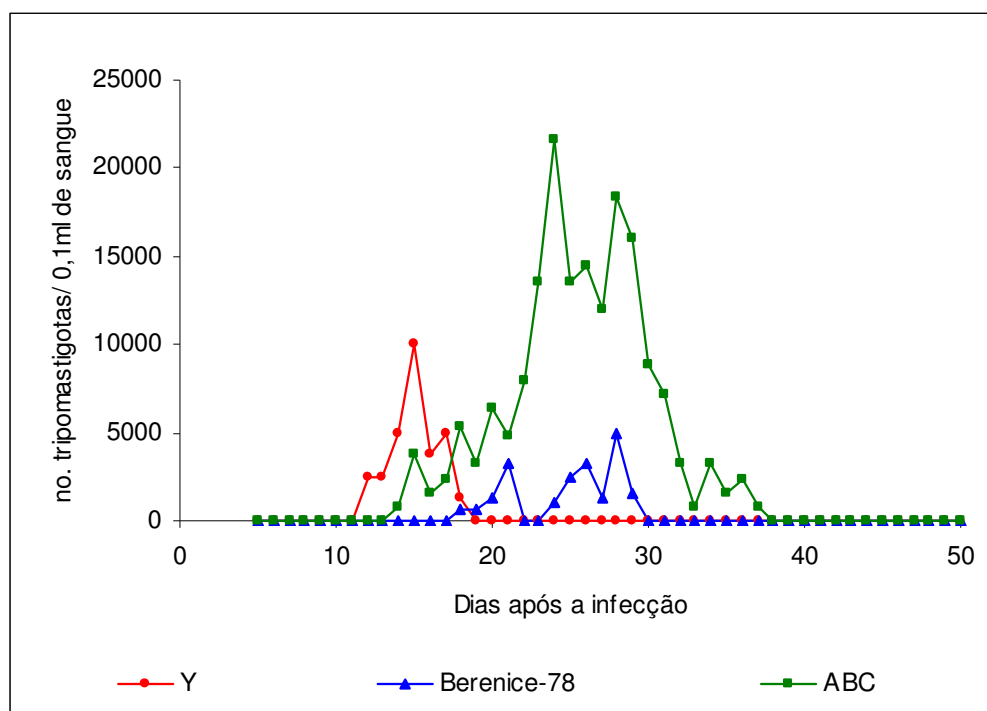


Gráfico 4 - Curvas de parasitemia em cães da raça *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.

5.2 Parâmetros Imunológicos

5.2.1 Quantificação da produção de IgA e IgM totais

Os animais infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi* apresentaram o mesmo padrão de produção para IgA e IgM total nos ASC (Gráficos 5A e 5B). Foram detectados baixos níveis de IgA a partir da 2ª semana de infecção, que aumentaram até a 6ª semana de infecção, apresentando níveis semelhantes aos encontrados nos animais não infectados a partir da 20ª semana de infecção. O IgM foi detectado em níveis mais elevados durante a fase aguda da infecção em todos os animais infectados, sendo mais evidentes a partir da 2ª semana de infecção com pico de produção na 6ª semana. A normalização dos níveis de produção foi observada a partir da 30ª semana de infecção, sendo ausente durante a fase crônica da infecção.

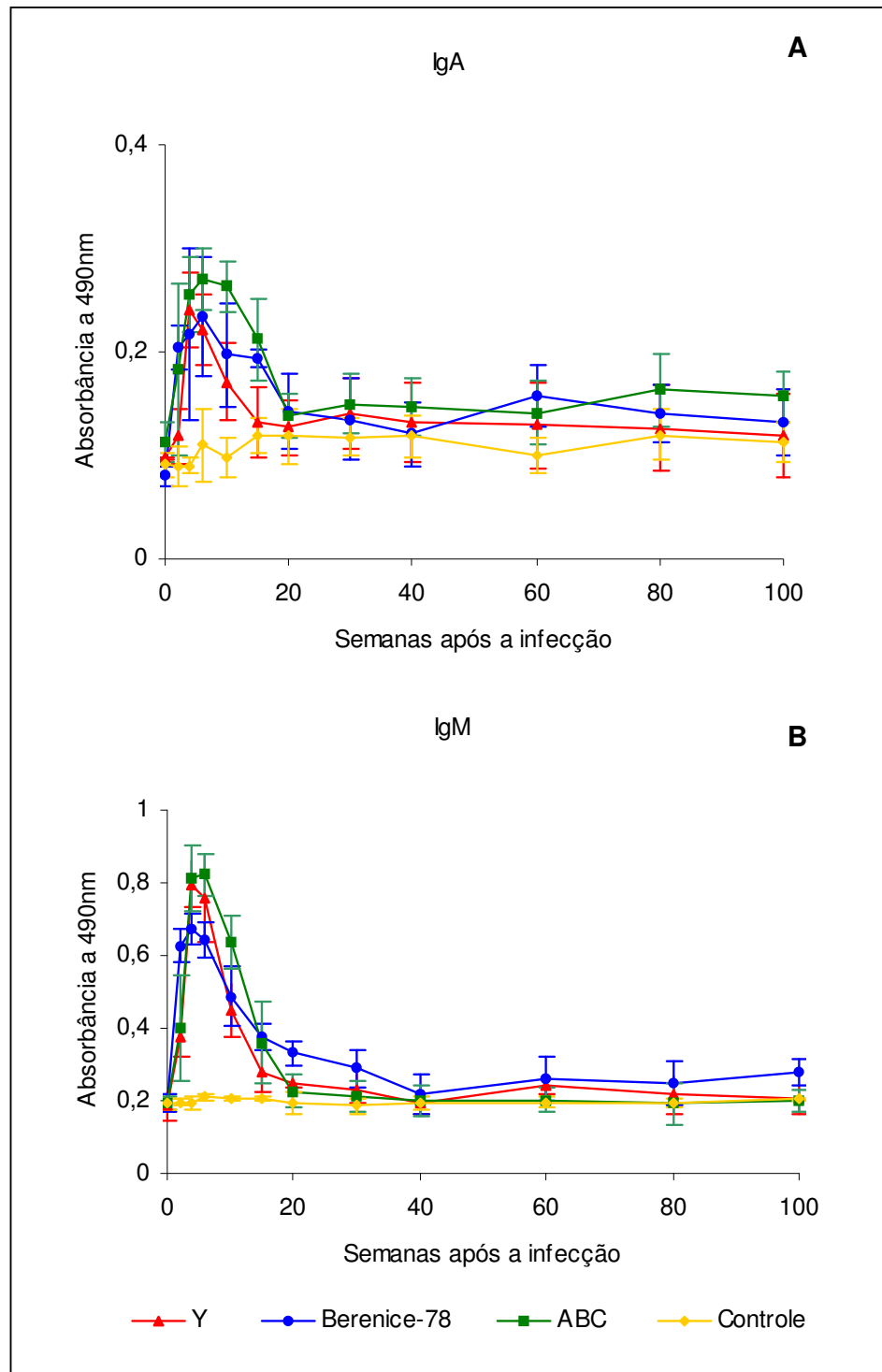


Gráfico 5 - Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* determinados pela ELISA no soro de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. **A)** IgA total, **B)** IgM total.

5.2.2 Quantificação da produção de IgG total e subclasses (IgG1 e IgG2)

Todos os animais apresentaram um perfil similar de produção para IgG total e IgG2 na SC. Estas imunoglobulinas foram detectadas a partir da 4^a semana de infecção, aumentaram até a 15^a semana e se mantiveram estáveis até o final do experimento (100 semanas após a infecção), Gráficos 6A e 6C. Os altos níveis de IgG1 na sorologia convencional foram detectados principalmente no soro dos animais infectados com a cepa Berenice-78, a partir da 10^a semana, com elevação dos níveis ($0,419 \pm 0,139$) na 30^a semana após a infecção, estabilizando-se posteriormente até o final do experimento. Por outro lado, os anticorpos IgG1 foram detectados, em baixos níveis ($0,187 \pm 0,046$), nos soros de alguns animais infectados com a cepa ABC apenas durante a fase aguda da infecção. Os animais infectados com a cepa Y apresentaram níveis de IgG1 similares àqueles observados nos animais não infectados (Gráfico 6B).

O perfil de produção de IgG total e IgG2 detectados pela CF foi similar àquele observado na SC. Todos os cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC apresentaram o mesmo padrão dessas imunoglobulinas. No entanto, essas duas subclasses foram detectadas pela CF duas semanas após a inoculação nos cães infectados com as cepas Y e ABC e somente a partir de quatro semanas nos animais infectados com a cepa Berenice-78 (Gráficos 7A e 7C). Por outro lado, dois padrões de produção de anticorpos IgG1 foram observados nos animais infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC. O primeiro padrão foi apresentado pelos animais infectados com as cepas Y e ABC, onde os anticorpos IgG1 foram detectados somente durante a fase aguda da infecção com picos de parasitos fluorescentes de $37,75 \pm 8,49$ (6^a semana após a infecção) e $65,21 \pm 4,95$ (10^a semana), respectivamente. O segundo padrão foi observado nos animais infectados com a cepa Berenice-78, onde todos os animais apresentaram níveis ascendentes de IgG1 até a 30^a semana após a infecção com pico máximo de parasitos fluorescentes de $87,25 \pm 2,38$, permanecendo em níveis estáveis durante a fase crônica, até o final do período de observação. Os animais controles não infectados apresentaram níveis constantes de parasitos fluorescentes de $4,67 \pm 0,70$ (Gráfico 7B).

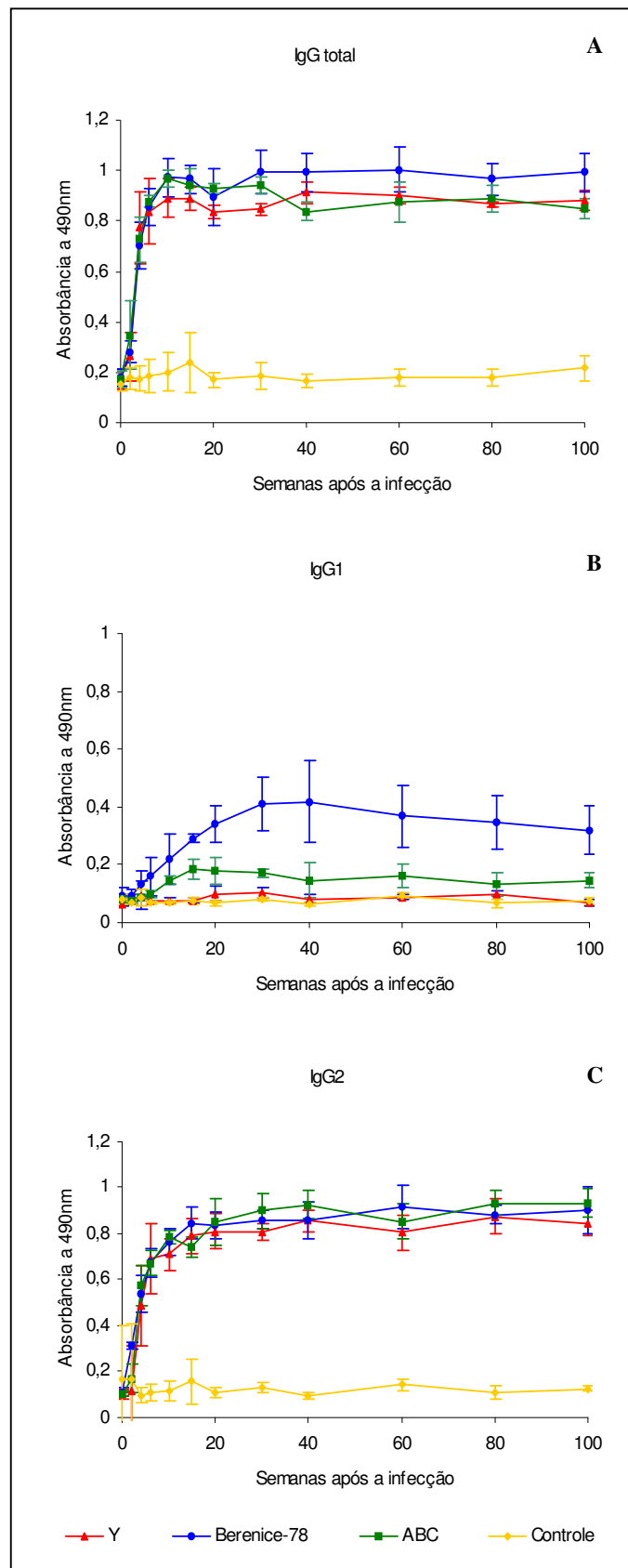


Gráfico 6 - Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* determinados pela ELISA no soro de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. **A)** IgG total, **B)** IgG1 e **C)** IgG2.

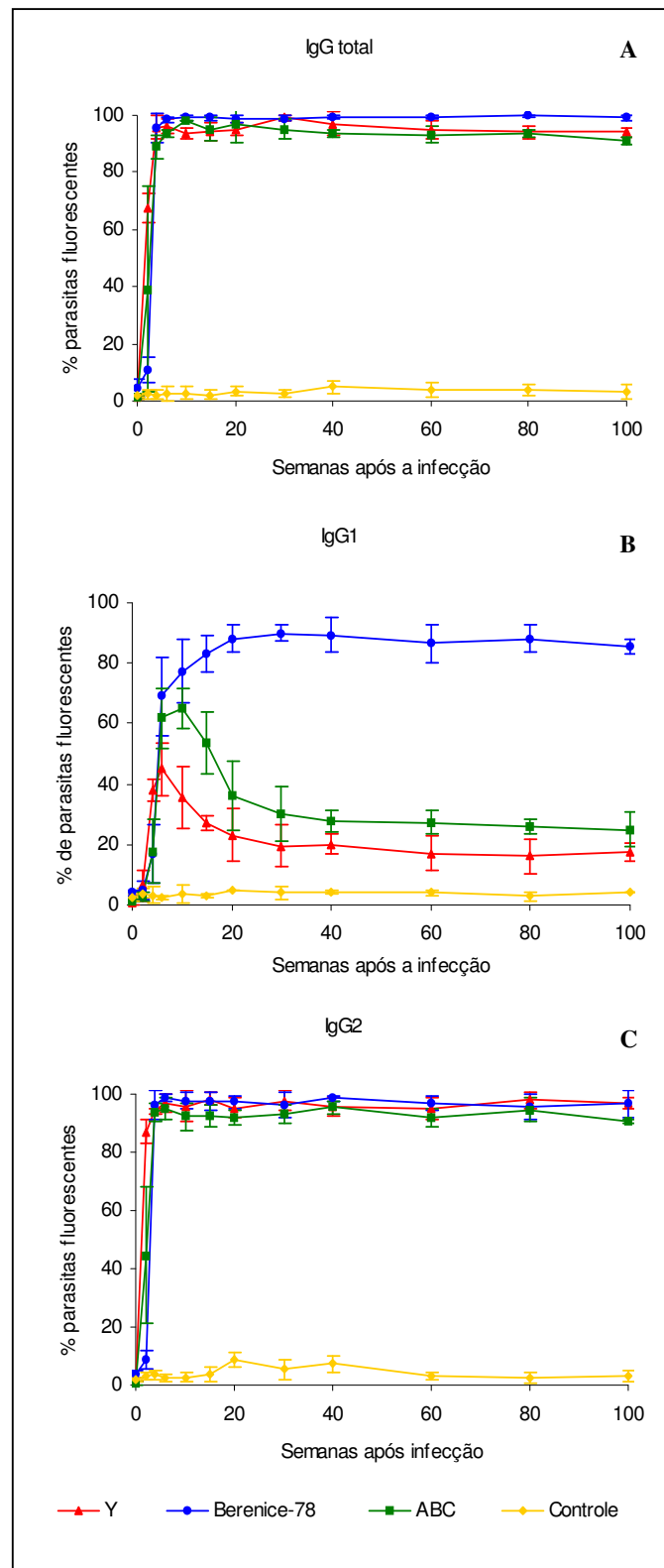


Gráfico 7 - Anticorpos específicos anti-*T. cruzi* determinados pela citometria de fluxo no soro de cães *Beagle* infectados com 4000 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. A) IgG total, B) IgG1 e C) IgG2.

5.2.3 Quantificação da produção de anticorpos líticos

Todos os cães infectados com as diferentes cepas apresentaram o mesmo padrão de LMCo o que indica cinética de produção semelhante de anticorpos líticos (Gráfico 8). Entretanto, os anticorpos líticos foram detectados 15 dias após a inoculação nos cães infectados com as cepas Y e ABC, a partir do 30º dia nos animais infectados com a cepa Berenice-78. A percentagem de LMCo foi ascendente até a sexta semana após a infecção, estabilizando-se em cerca de 70% para todos grupos de animais infectados, e permanecendo desta forma até o final do período de observação (100 semanas após a infecção).

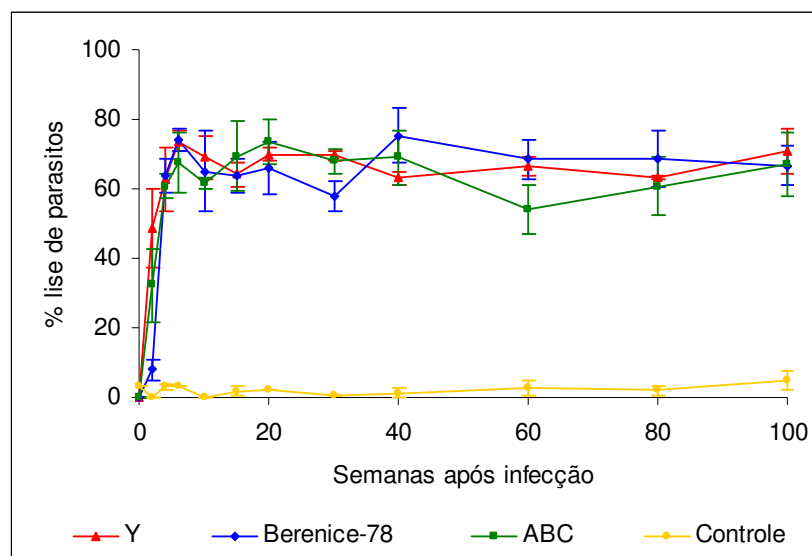


Gráfico 8 – Porcentagem de lise de parasitos mediada pelo complemento, no soro de cães *Beagle* infectados com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.

5.2.4 Resposta proliferativa de células mononucleares do sangue periférico

Durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* todos os animais apresentaram o mesmo padrão de resposta proliferativa de CMSP. Esta resposta foi observada frente ao estímulo com antígeno de formas tripomastigotas medido pelo índice de estimulação (IE) seis semanas após a inoculação, apresentando um pequeno decréscimo ao final da fase aguda (20 semanas após infecção). Durante a fase crônica os animais infectados com as cepas Berenice-78 e ABC apresentaram níveis estáveis do IE, com pequeno pico da resposta proliferativa na 60ª semana de infecção. Nesta semana foram observados os mais elevados IE entre os cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC (pico do IE: $18,08 \pm 6,13$; $9,16 \pm 2,74$ e $11,44 \pm 2,73$, respectivamente). Por outro lado, os animais infectados com a cepa Y apresentaram elevada resposta proliferativa em relação àqueles infectados com a cepa Berenice-78 ($P < 0,05$),

entretanto, não foi observada diferença significativa em relação aos animais infectados com a cepa ABC neste período. Em todos os animais não infectados foram observadas respostas proliferativas mais baixas que às aquelas observadas nos animais infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi* ($P < 0,05$) (Gráfico 9).

Foi realizada análise comparativa e a correlação entre a produção de anticorpos específicos da subclasse IgG1, medidos pela ELISA e pela citometria de fluxo, e a resposta proliferativa de CMSP (Gráfico 10 e 11). A proliferação de CMSP realizada 60 semanas após a infecção foi escolhida para a análise de correlação por apresentar níveis discriminantes entre os animais infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi*. A produção da subclasse IgG1, medida pela ELISA em cães infectados apresentou 67% de correlação inversa com a proliferação de CMSP induzida com antígenos deste parasito (Gráfico 11A). No Gráfico 11A ainda pode ser visualizada, a ausência de danos cardíacos (cardiomegalia, fibrose e inflamação) e produção elevada de IgG1 na SC. Por outro lado, não foi observada correlação significativa ($P = 0,054$; $r = 0,56$) entre os níveis de produção de IgG1 medidos por citometria de fluxo e a proliferação de CMSP. Todavia, observou-se tendência para níveis de IgG1 mais elevados serem relacionados a níveis baixos de proliferação (Gráfico 11B).

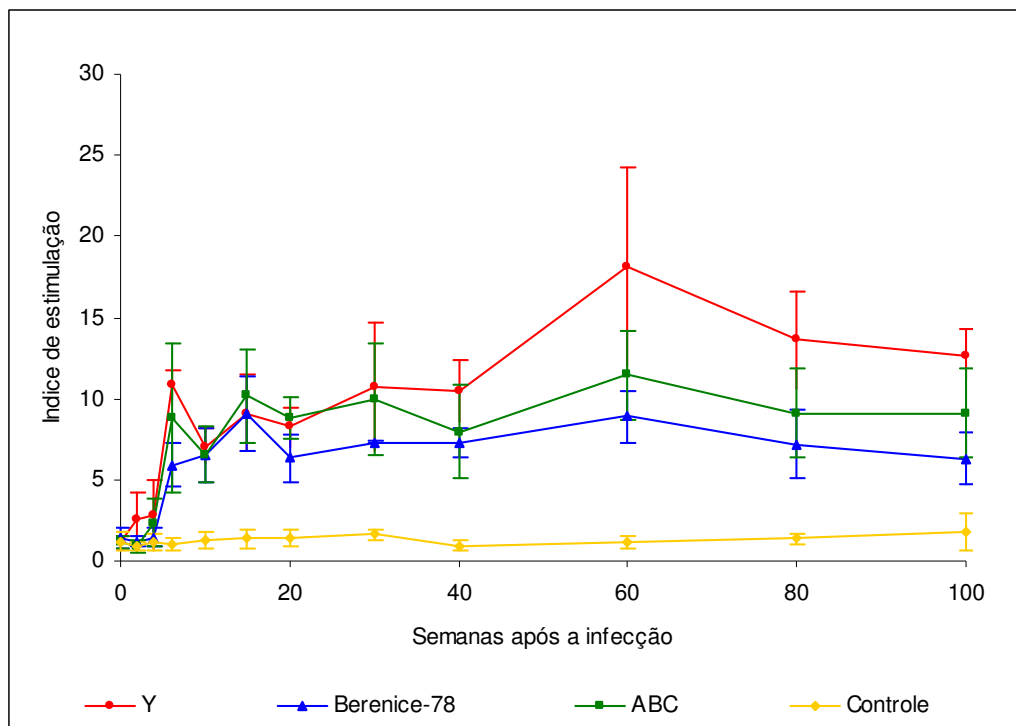


Gráfico 9 - Estimulação de células mononucleares do sangue periférico, *in vitro*, com antígeno de formas tripomastigotas durante as fases aguda e crônica da infecção de cães da raça *Beagle* inoculados com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, ABC e Berenice-78 do *T. cruzi* e animais não infectados como grupo controle.

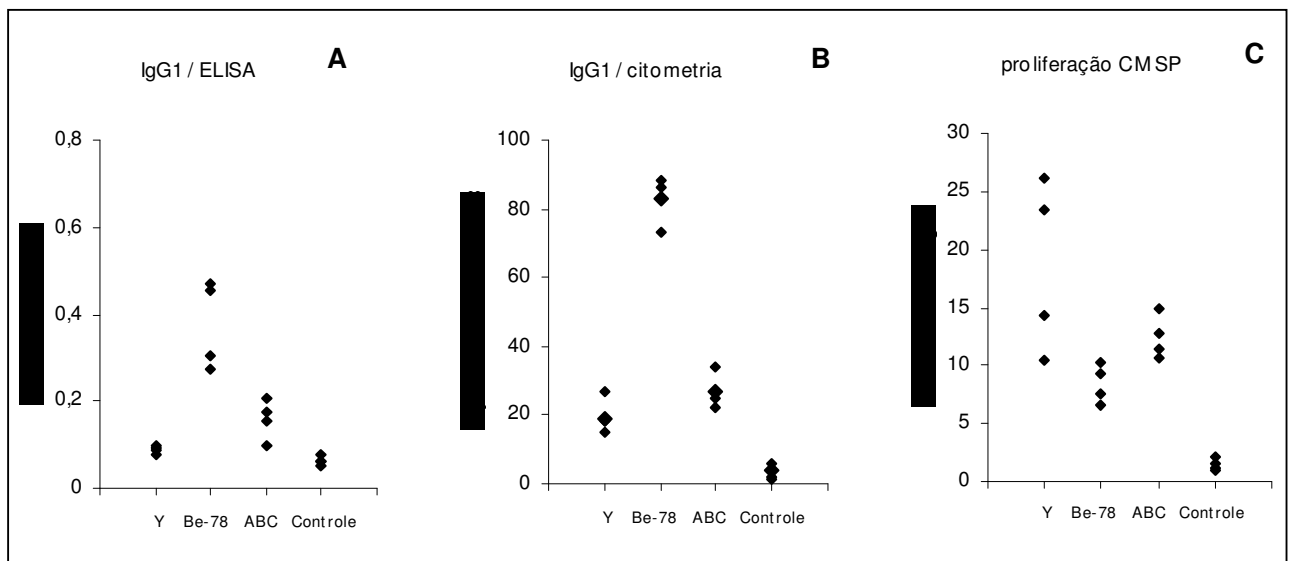


Gráfico 10 - Análise comparativa entre os perfis imunológicos determinados pelo ELISA (A), citometria de fluxo (B) e proliferação de células mononucleares do sangue periférico (C) realizadas 60 semanas após a infecção com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*.

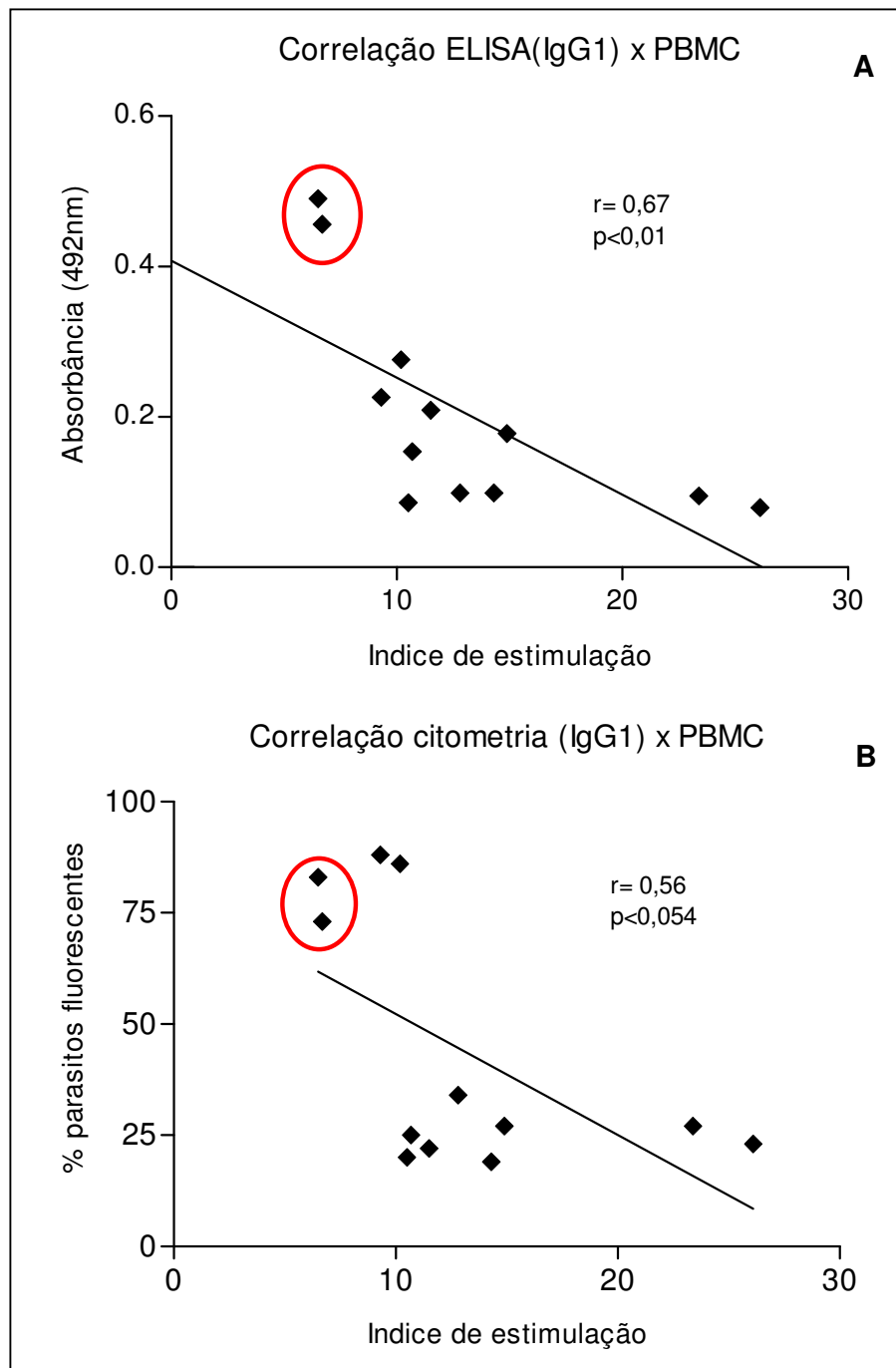


Gráfico 11 – Correlação inversa entre a proliferação de CMSP e a produção de IgG1 determinado por ELISA (A) e pela citometria de fluxo (B) realizadas em cães da raça *Beagle* 60 semanas após a infecção com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. O círculo vermelho indica os animais que não apresentaram cardiomegalia, fibrose e inflamação no coração.

5.3 Histopatologia

5.3.1 Avaliação da presença de linfadenopatia, esplenomegalia, cardiomegalia e de alterações no sistema digestivo

A correlação entre o peso dos órgãos (baço, linfonodo e coração) e o peso dos animais, revelou a presença de alterações anatomopatológicas nos órgãos linfáticos e na área cardíaca dos animais infectados com as três cepas do *T. cruzi*, ademais, diferenças marcantes na intensidade destas alterações foram observadas.

Durante a fase aguda, todos os animais infectados com as diferentes cepas do *T. cruzi* (Y, Berenice-78 e ABC) apresentaram esplenomegalia e linfadenopatia cervical acentuada (Gráfico 12A, 12B, 12C; Tabelas 2, 3 e 4). A cardiomegalia foi observada em 50% dos animais infectados com as cepas Y e ABC e em 25% dos animais infectados com a cepa Berenice-78, porém pouco pronunciada (Gráfico 12C, Tabela 4).

Durante a fase crônica, não foi observada linfadenopatia nos animais infectados com a cepa Y, e em 25% e 50% e dos animais infectados com as cepas Berenice-78 e ABC, respectivamente, sendo pouco pronunciada (Gráfico 12B, Tabela 3). Por outro lado, todos os animais infectados com as diferentes cepas permaneceram apresentando esplenomegalia durante a fase crônica, porém, bem menos pronunciada do que aquela apresentada durante a fase aguda (Gráfico 12A, Tabela 2). A cardiomegalia foi bastante pronunciada durante a fase crônica em 100%, 50% e 100% dos animais infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*, respectivamente (Gráfico 12C e Tabela 4).

A análise macroscópica do esôfago, estômago, ceco e cólon nos animais infectados não revelou alterações anatômicas em relação ao grupo de animais controles não infectados. Análises histológicas serão realizadas para verificar a integridade do sistema de inervação destes órgãos.

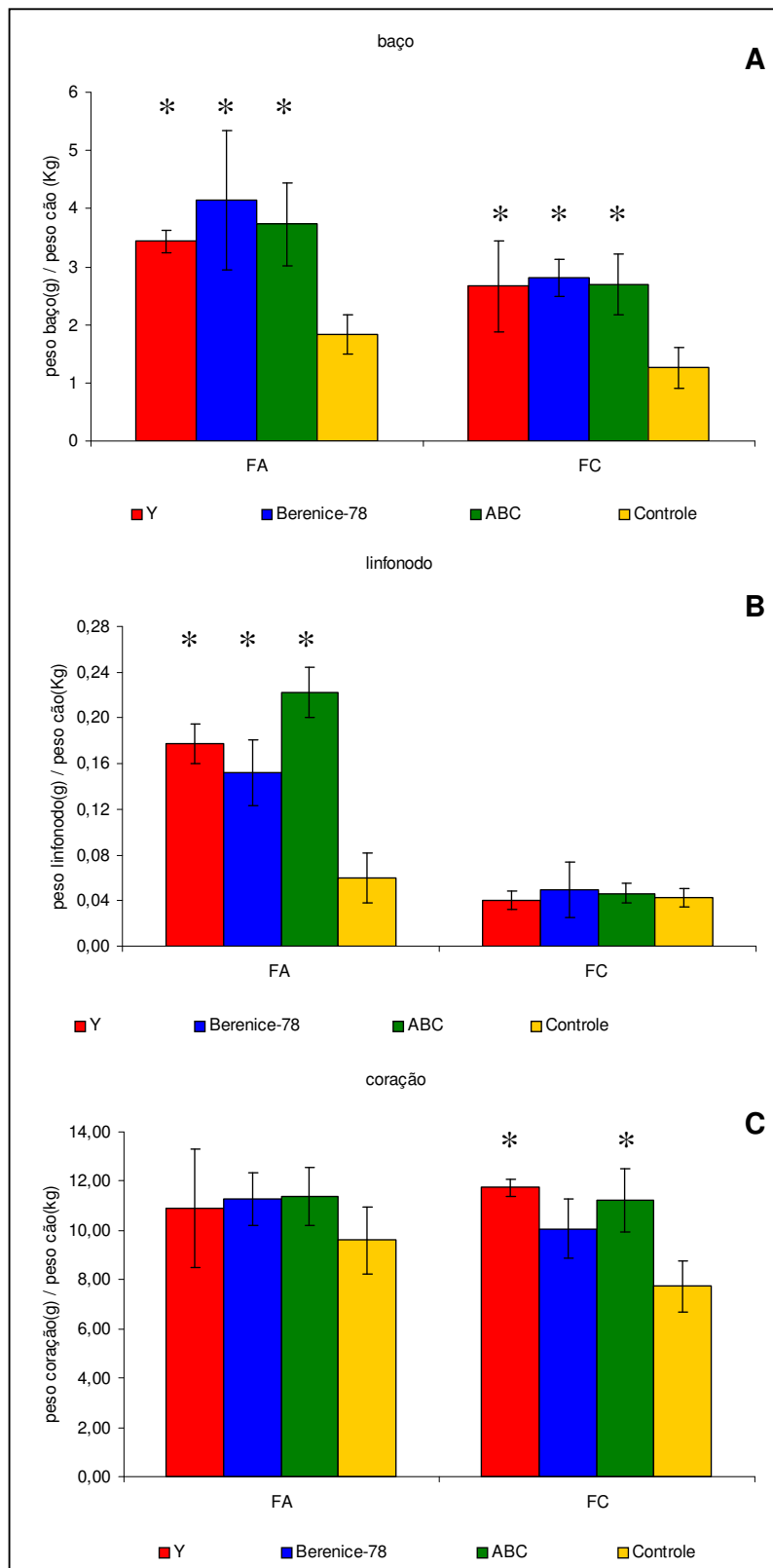


Gráfico 12 - Correlação entre o peso do órgão e o peso do animal durante as fases aguda e crônica da infecção de cães da raça *Beagle* com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*, por via intraperitoneal: **A)** baço **B)** linfonodo e **C)** coração. (*) $P < 0,05$ diferença significativa do grupo infectado em relação ao controle.

Tabela 2 - Presença de esplenomegalia em cães da raça *Beagle* infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.

Cepas de <i>T. cruzi</i>	Fase Aguda	Fase crônica
	Nº de cães com esplenomegalia/total	Nº de cães com esplenomegalia/total
Y	(4/4)	(4/4)
Berenice-78	(4/4)	(4/4)
ABC	(4/4)	(4/4)

Tabela 3 - Presença de linfadenopatia cervical em cães da raça *Beagle* infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.

Cepas de <i>T. cruzi</i>	Fase aguda	Fase crônica
	Nº de cães com linfadenopatia cervical/total	Nº de cães com linfadenopatia cervical/total
Y	(4/4)	(0/4)
Berenice-78	(4/4)	(2/4)
ABC	(4/4)	(1/4)

Tabela 4 - Presença de cardiomegalia em cães da raça *Beagle* infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.

Cepas de <i>T. cruzi</i>	Fase aguda	Fase crônica
	Nº de cães com cardiomegalia/total	Nº de cães com cardiomegalia/total
Y	(2/4)	(4/4)
Berenice78	(1/4)	(2/4)
ABC	(2/4)	(4/4)

5.3.2 Avaliação da presença de inflamação e fibrose na área cardíaca

Para a avaliação histopatológica foram realizadas análises morfométricas computadorizadas (KS300/Carl Zeiss) para quantificação das áreas ocupadas por músculo cardíaco, inflamação e fibrose.

A análise realizada nos tecidos dos animais necropsiados durante a fase aguda revelou diferença significativa ($P < 0,05$) entre o número de núcleos celulares presentes no átrio direito dos cães infectados em relação àqueles não infectados, porém não houve diferença significativa em relação a quantidade de colágeno presente entre estes grupos de animais. Foi determinada, durante a fase aguda, a presença de miocardite severa no átrio direito em todos os animais infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC em relação àqueles animais controles não infectados (Figura 2; Gráfico 13A e Tabela 5). A fibrose foi discreta em 50% dos animais infectados com as cepas Y e ABC e 25% dos animais infectados com a cepa Berenice-78 (Figura 2; Gráfico 13B e Tabela 6).

Durante a fase crônica foi observada diferença significativa em relação ao número de núcleos celulares e quantidade de colágeno no átrio direito apenas nos grupos de animais infectados com as cepas Y e ABC em relação ao grupo de animais não infectados ($P > 0,05$). Porém, a presença de miocardite e fibrose foi assinalada em 100%, 50% e 100% no átrio direito daqueles animais infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC, respectivamente (Figura 2; Gráficos 13A, 13B e Tabelas 5, 6). Por outro lado, a fibrose entre os animais infectados com as cepas Y e ABC foi mais intensa do que a observada nos animais infectados com a cepa Berenice-78.

Tabela 5 – Presença de miocardite em cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.

Cepas de <i>T. cruzi</i>	Fase aguda Nº de cães com inflamação no miocárdio/total	Fase crônica Nº de cães com inflamação no miocárdio/total
Y	(4/4)	(4/4)
Berenice-78	(4/4)	(2/4)
ABC	(4/4)	(4/4)

Tabela 6 – Presença de fibrose no miocárdio de cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* e eutanasiados durante as fases aguda (30 dias) e crônica (100 semanas) da infecção.

Cepas de <i>T. cruzi</i>	Fase aguda Nº de cães com fibrose no miocárdio/total	Fase crônica Nº de cães com fibrose no miocárdio/total
Y	(2/4)	(4/4)
Berenice-78	(1/4)	(2/4)
ABC	(2/4)	(4/4)

Obs. Animais sacrificados na fase aguda apresentaram fibrose discreta.

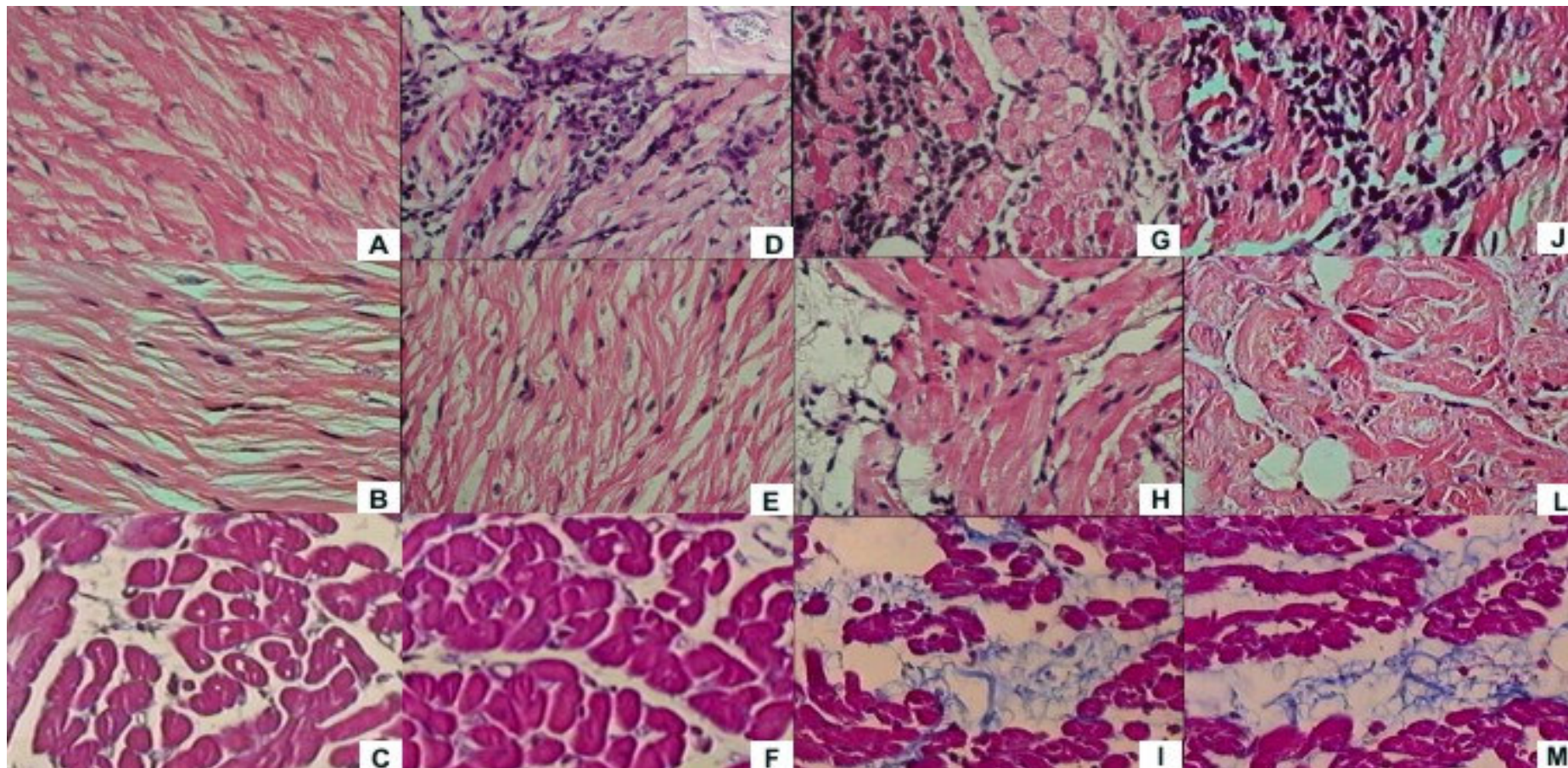


Figura 2 – Histologia do átrio direito do coração de cães *Beagle* controles não infectados sacrificados com a mesma idade dos animais infectados durante as fases aguda **A)** HE, e crônica da infecção **B)** HE, **C)** tricrômico de Masson; e cortes histológicos de cães *Beagle* infectados com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas **Berenice-78** do *T. cruzi*. **D)** fase aguda: inflamação intensa, degeneração hialina discreta e parasitos. **E)** fase crônica, degeneração hialina discreta e **F)** fase crônica, fibrose discreta; **Y** do *T. cruzi* fase aguda, **G)** processo inflamatório intenso, degeneração hialina moderada; **H)** fase crônica, inflamação discreta, degeneração hialina moderada. **I)** fase crônica, fibrose moderada; **ABC** do *T. cruzi* fase aguda, **J)** processo inflamatório intenso, degeneração hialina moderada; **L)** fase crônica, inflamação discreta, degeneração hialina moderada. **M)** fase crônica, fibrose moderada ($\times 40$).

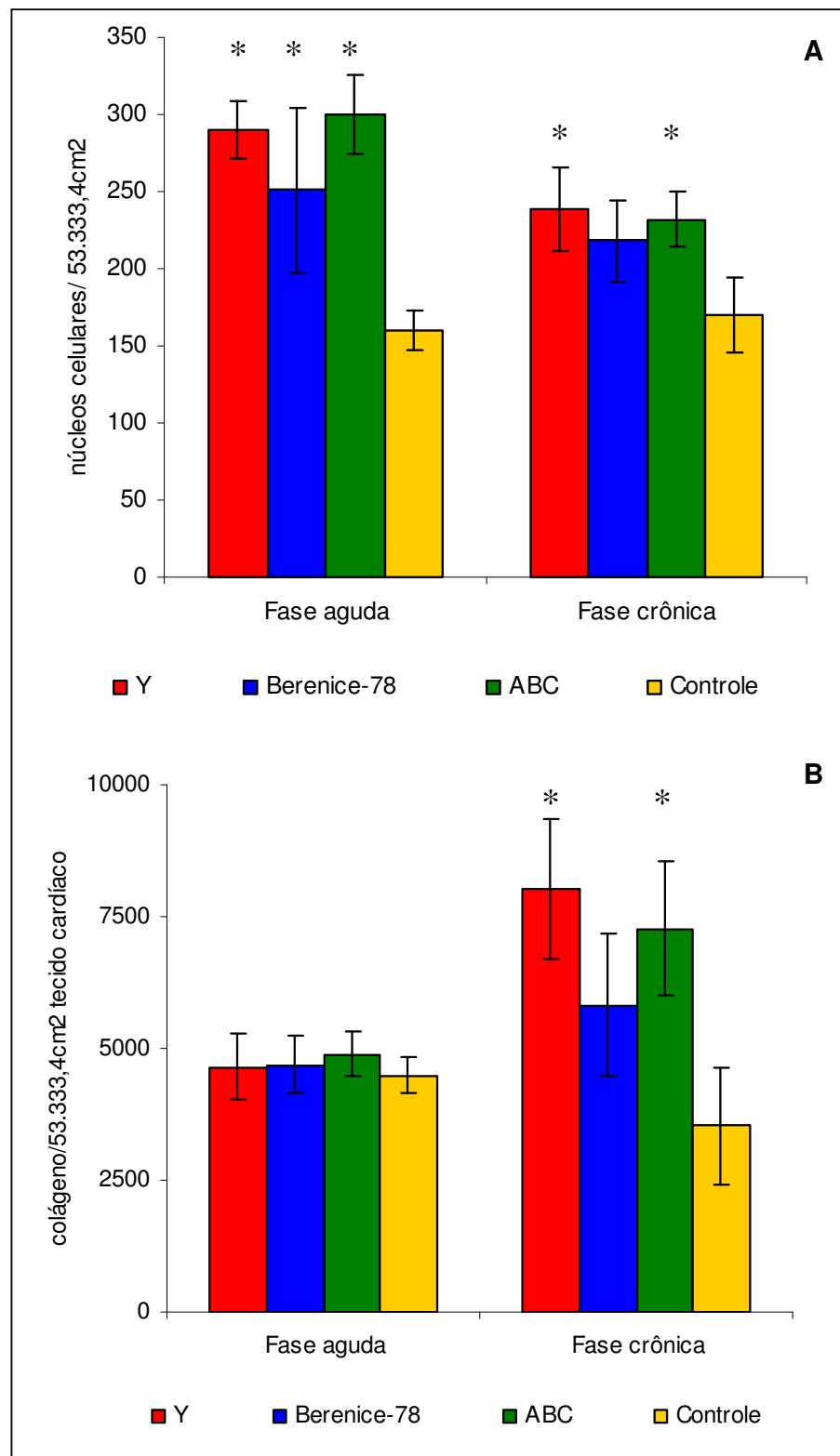


Gráfico 13 - Celularidade (A) e fibrose (B) no miocárdio durante as fases aguda e crônica da infecção com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneas/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*. (*) $P < 0,05$ diferença significativa do grupo infectado em relação ao controle.

5.4 Produção de citocinas *in situ* pela técnica de RT-PCR

5.4.1 Produção de IFN- γ , TNF e IL-10 no linfonodo cervical

A produção *in situ* de TNF, IFN- γ e IL-10 no linfonodo cervical, determinada pela RT-PCR, está representada nas Figuras 3A e 3B. Durante a fase aguda (Figura 3A) a análise semiquantitativa (Gráfico 14A) da expressão das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 nos linfonodos cervicais dos cães não infectados e infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* não demonstrou diferença significativa nos níveis apresentados entre os animais infectados e não infectados. Nos animais infectados com a cepa Berenice-78 ($0,98 \pm 0,28$) foram observados níveis ligeiramente maiores da produção de IL-10 nos linfonodos em relação aos animais infectados com as cepas Y ($0,70 \pm 0,14$) e ABC ($0,74 \pm 0,12$), mas não houve diferença significativa entre os níveis de produção desta citocina nos animais infectados com as três cepas do *T. cruzi*.

Durante a fase crônica foi observado uma redução na produção destas citocinas nos linfonodos cervicais dos animais infectados em relação aos níveis apresentados durante a fase aguda da infecção, sendo observados níveis semelhantes na produção destas citocinas entre os animais infectados e não infectados (Figura 3B e Gráfico 14B).

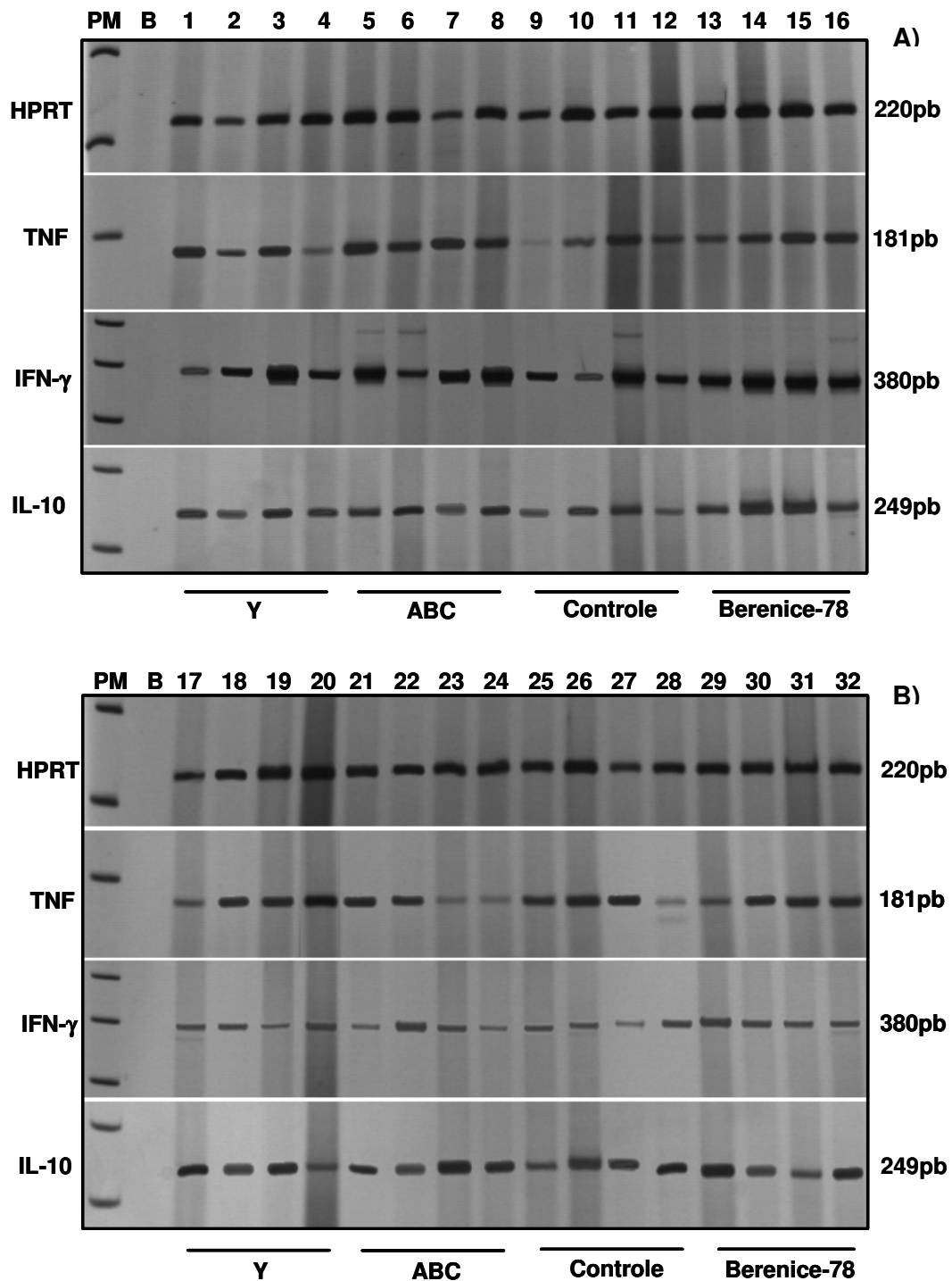


Figura 3 – Expressão de citocinas no linfonodo cervical de cães *Beagle* não infectados e infectados com 4×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y, ABC e Berenice-78 do *T. cruzi* determinado por RT-PCR. **(A)** fase aguda e **(B)** fase crônica, Canaleta 1: PM, padrão de peso molecular 100pb; Canaleta 2: B, branco, controle negativo da reação; Canaletas: 3-18: produto da RT-PCR obtida de cada animal. HPRT, gene constitutivo utilizado como controle positivo da reação.

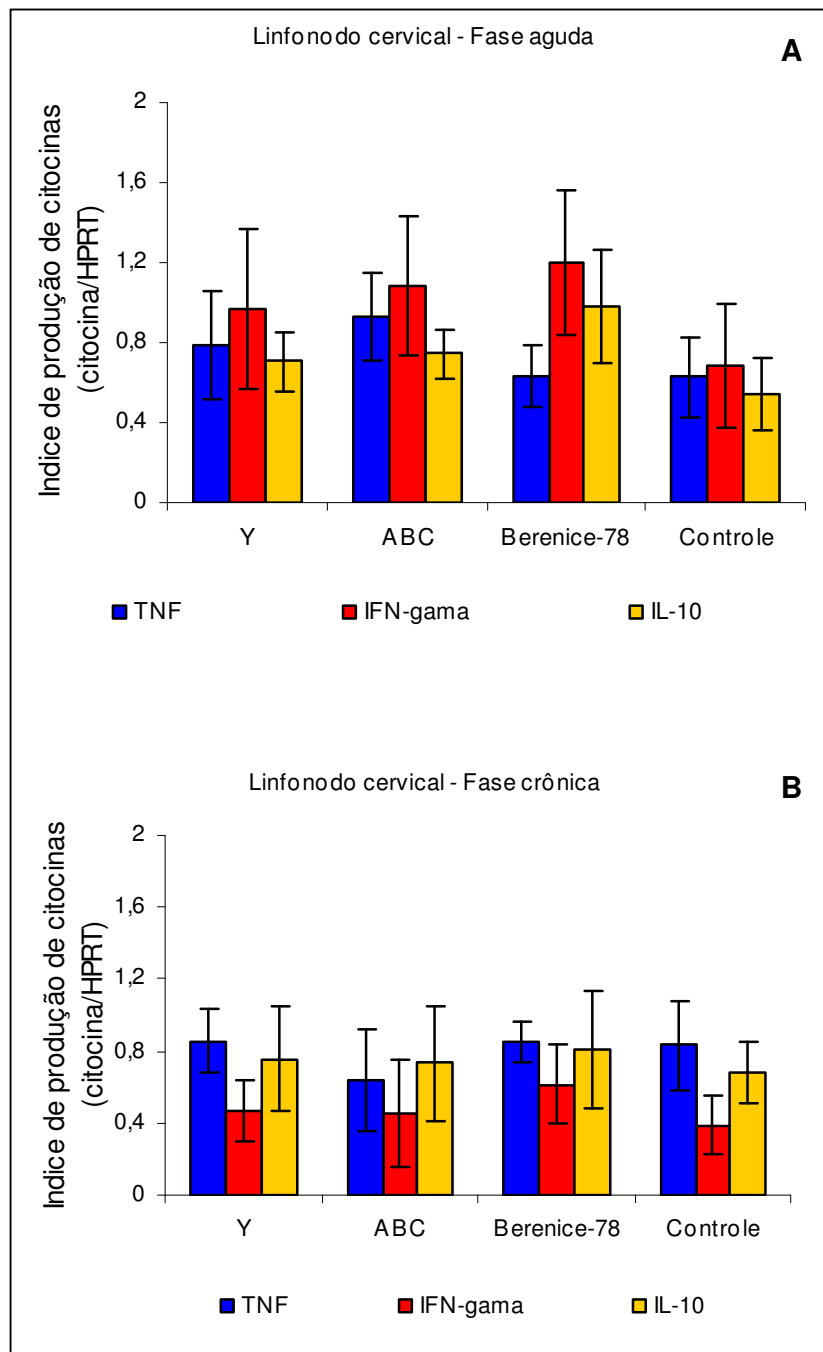


Gráfico 14 – Análise semi-quantitativa da expressão de mRNA das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 no linfonodo cervical durante as fases aguda (**A**) e crônica (**B**) da infecção com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*. O índice de produção de citocinas foi obtido com a relação entre a média de produção da citocina no grupo de animais infectados sobre a média da produção de HPRT.

5.4.2 Produção de IFN- γ , TNF e IL-10 no átrio direito

A produção *in situ* de TNF, IFN- γ e IL-10 no átrio direito, determinada pela RT-PCR, está representada nas Figuras 4A e 4B. Durante a fase aguda (Figura 4A), a análise semiquantitativa (Gráfico 15A) da expressão das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 no átrio direito dos cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC demonstrou diferença significativa ($P < 0,05$) na produção das três citocinas em relação ao grupo de animais não infectados. Sendo a produção de IL-10 no átrio direito dos animais infectados com a cepa Berenice-78, Y e ABC de $1,52 \pm 0,61$; $0,82 \pm 0,13$ e $0,75 \pm 0,24$, respectivamente. Estas citocinas não apresentaram níveis detectáveis no átrio direito dos animais não infectados, sacrificados com a mesma idade dos animais chagásicos durante as fases aguda e crônica da infecção (Figuras 4A e 4B, Gráficos 15A e 15B).

Durante a fase crônica (Figura 4B, Gráfico 15B) foram detectados níveis semelhantes na produção de IFN- γ no átrio direito dos animais infectados com as cepas Y ($1,10 \pm 0,38$), Berenice-78 ($0,86 \pm 0,07$) e ABC ($1,04 \pm 0,08$) do *T. cruzi*. A produção de IL-10 foi detectada apenas nos animais infectados com a cepa Berenice-78 ($0,35 \pm 0,20$), não sendo detectada nos animais infectados com as cepas Y e ABC e naqueles não infectados. Foi observada diferença significativa ($P < 0,05$) entre a produção de IFN- γ nos animais infectados em relação ao grupo de animais não infectados. Em relação a produção de IL-10, foi observada diferença estatisticamente significativa do grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78 em relação aos demais grupos de animais (não infectados, e infectados com as cepas Y e ABC).

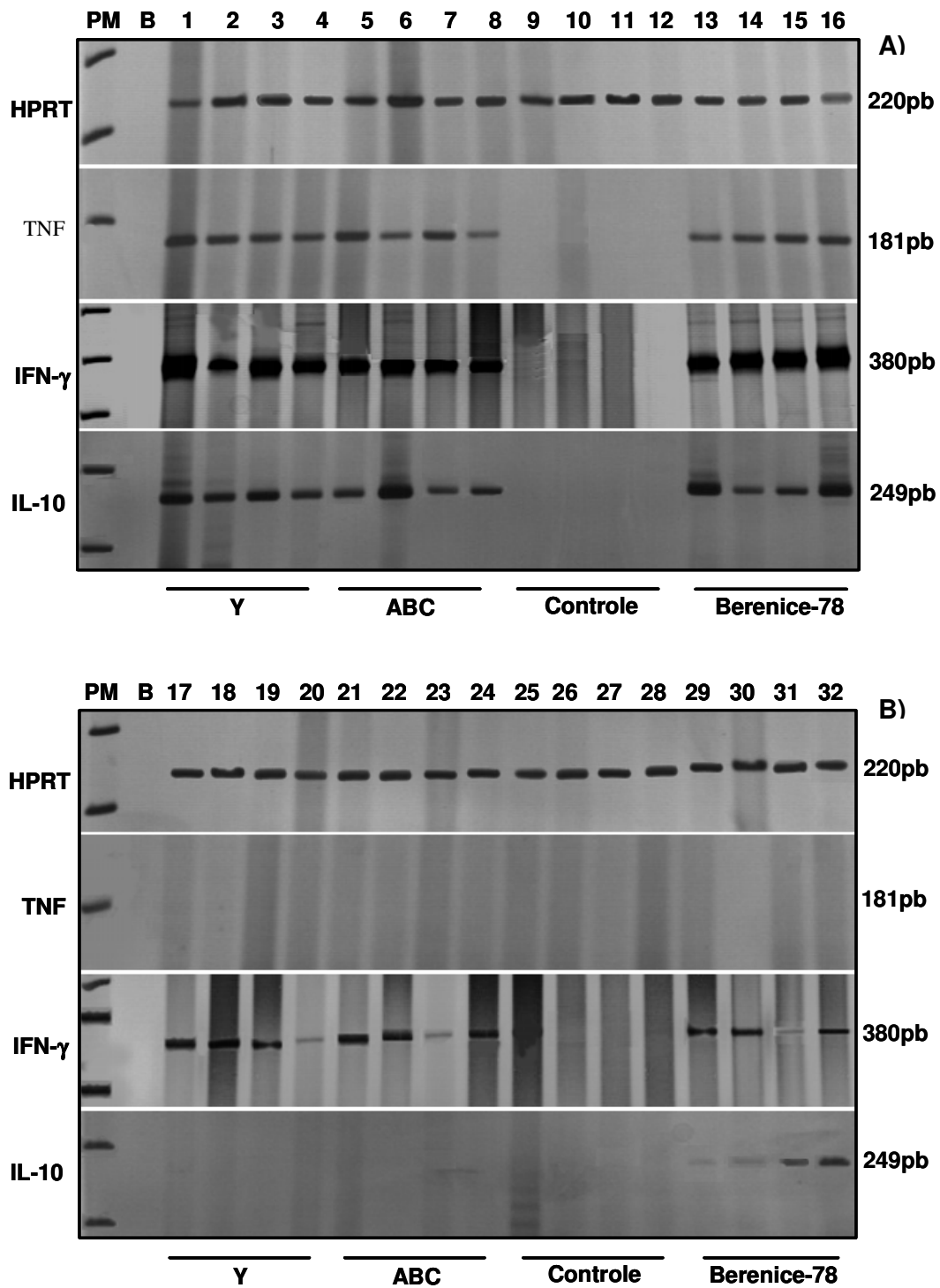


Figura 4 – Expressão de citocinas no átrio direito de cães *Beagle* não infectados e infectados com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneas das cepas Y, ABC e Berenice-78 do *T. cruzi* determinado por RT-PCR. (A) fase aguda e (B) fase crônica, Canaleta 1: PM, padrão de peso molecular 100pb; Canaleta 2: B, branco, controle negativo da reação; Canaletas: 3-18: produto da RT-PCR obtida de cada animal. HPRT, gene constitutivo utilizado como controle positivo da reação.

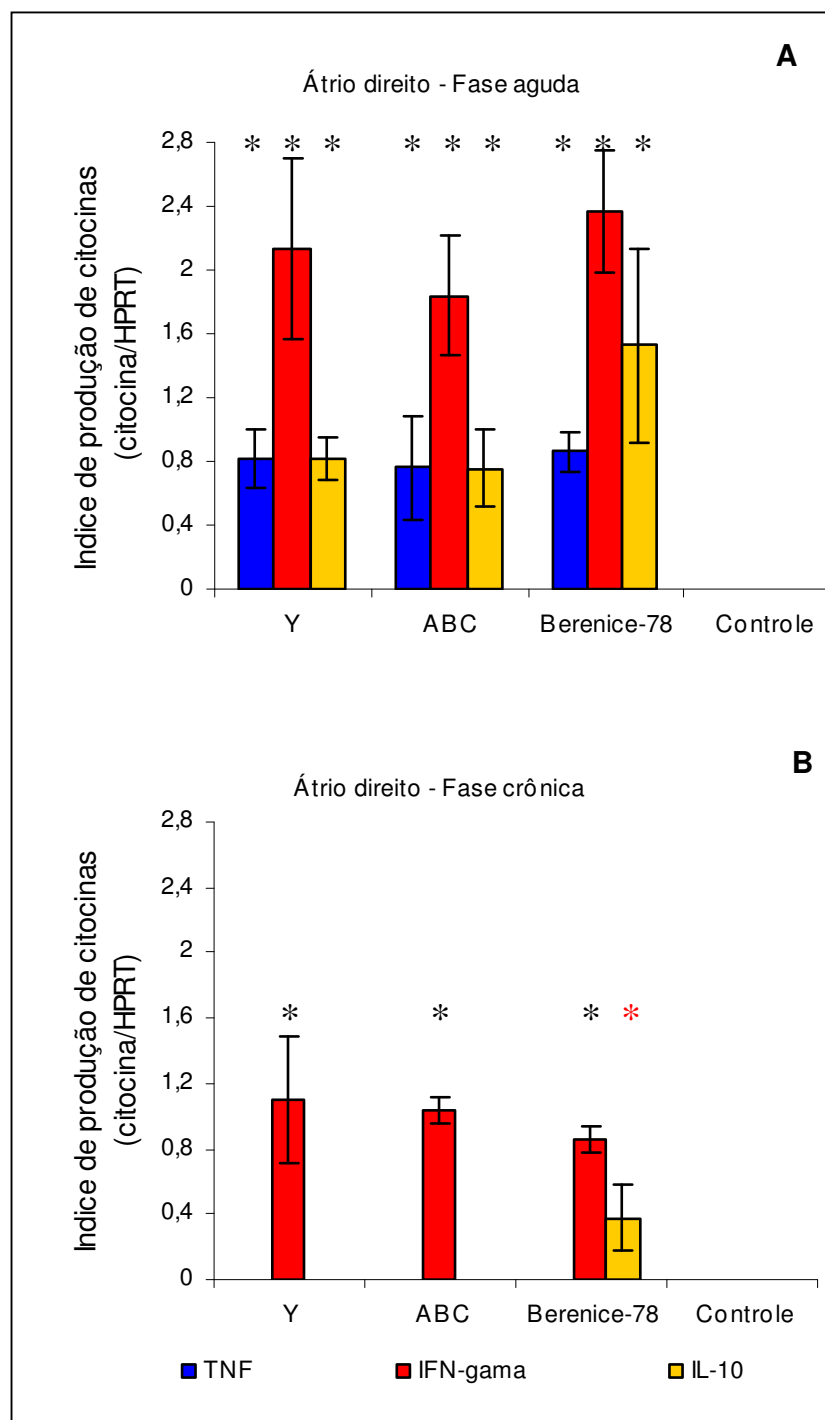


Gráfico 15 – Análise semi-quantitativa da expressão de mRNA das citocinas TNF, IFN- γ e IL-10 no átrio direito durante as fases aguda (A) e crônica (B) da infecção com 4×10^3 ripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*. $P < 0,05$ diferença estatística significativa do (*) grupo infectado em relação ao controle, e (*) grupo infectado com Berenice-78 em relação ao controle e aos demais grupos infectados.

5.5 Aspectos imunológicos e alterações anatomopatológicas

Os cães avaliados durante a fase crônica foram agrupados baseando-se na patologia cardíaca observada, independente da cepa utilizada para sua infecção, sendo: controles não infectados; cardíacos (apresentaram cardiomegalia, inflamação e fibrose na musculatura cardíaca); e indeterminados (não apresentaram danos cardíacos). Posteriormente, foi realizada a comparação entre a produção de IgG1 detectada por ELISA e por citometria de fluxo e entre a produção IFN- γ e IL-10 *in situ* na musculatura cardíaca destes animais.

A produção de IgG1 (Gráficos 16A e 16B), nos animais que não apresentaram danos cardíacos (forma indeterminada) mostrou-se significativamente maior quando medido pelas técnicas de ELISA e de citometria de fluxo, aos animais que apresentaram a forma cardíaca da doença. A técnica de citometria de fluxo mostrou maiores níveis de produção de IgG1 ($P < 0,05$) nos animais que apresentaram a forma cardíaca da doença de Chagas em relação ao grupo controle.

A análise da produção de IFN- γ e IL-10 *in situ* no átrio direito demonstrou produção significativamente maior ($P < 0,001$) de IL-10 no grupo de animais que apresentaram a forma indeterminada em relação àqueles que apresentaram a forma cardíaca da doença. Entretanto, não foi observada diferença significativa em relação à produção de IFN- γ entre estes dois grupos de animais (Gráfico 17).

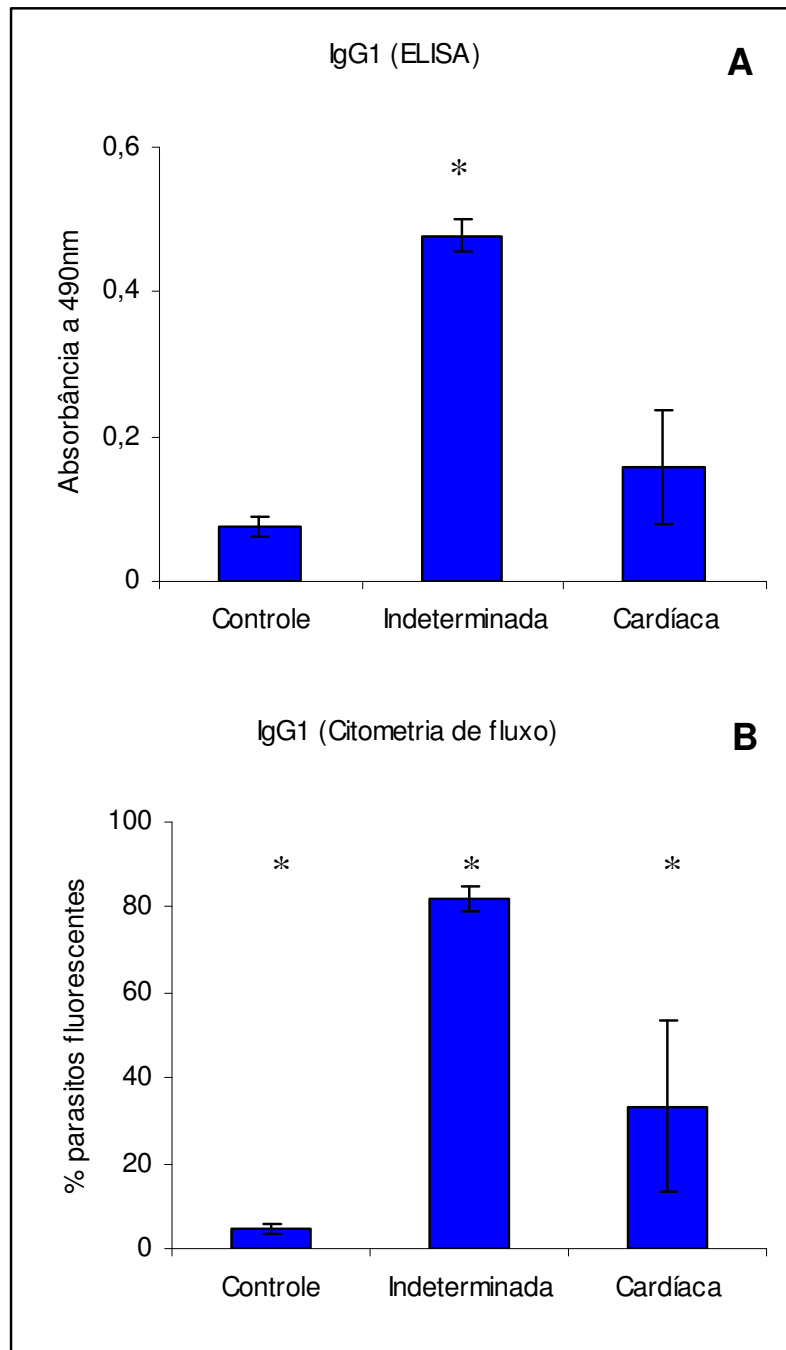


Gráfico 16 – Anticorpos específicos da subclasse IgG1 anti-*T. cruzi* determinados por ELISA (A) e citometria de fluxo (B) no soro de cães *Beagle* coletados 100 semanas após a infecção com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. Os animais foram divididos independentes da cepa utilizada em grupos: controle, assintomático (forma indeterminada) e os que apresentaram lesões cardíacas (forma cardíaca). $P < 0,05$ diferença significativa (*) entre os grupos.

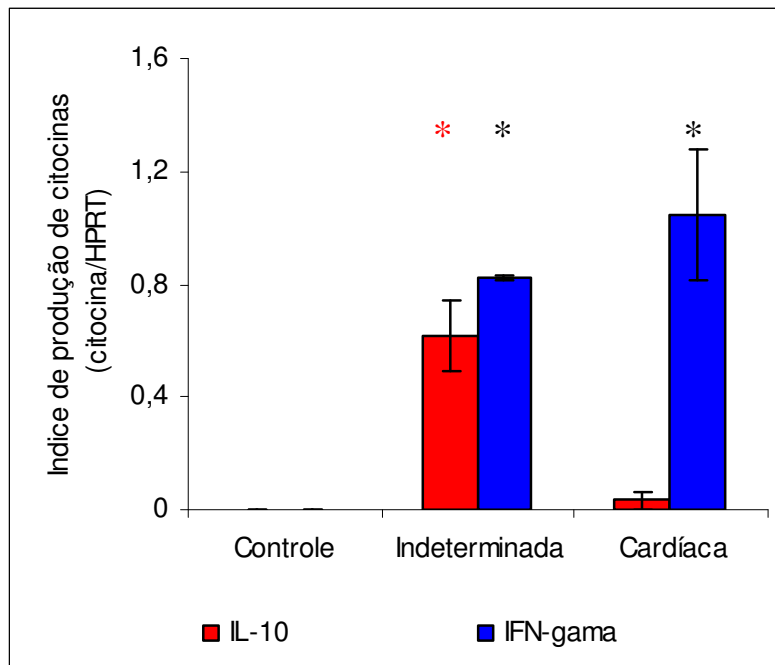


Gráfico 17 – Expressão semi-quantitativa de mRNA das citocinas IFN- γ e IL-10 no átrio direito durante a fase crônica (100 semanas após a inoculação) da infecção com 4×10^3 tripomastigotas sanguíneos/kg por via intraperitoneal das cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi* em cães da raça *Beagle*. Os animais foram agrupados, independentemente da cepa utilizada, em grupo: controle, assintomático (forma indeterminada) e os que apresentaram lesões cardíacas (forma cardíaca) $P < 0,001$ diferença significativa (*) em relação ao controle e (*) em relação ao controle e entre os grupos indeterminado e cardíaco.

Nas Tabelas 7 e 8 encontram-se os valores individuais de cardiomegalia, fibrose e inflamação na área cardíaca, proliferação de CMSP, produção de IgG1 nos ASC e nos AATV, e a dosagem de mRNA para IL-10 no átrio direito dos cães *Beagle* infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.

Durante a fase aguda, quatro semanas após a infecção, já é observado produção significativamente ($P < 0,05$) maior de IgG1 nos ASC e nos AATV. Em relação à produção de IL-10 *in situ* no coração dos cães infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC em relação aos animais não infectados, não foi observada diferença significativa entre os animais infectados. Nesta fase da doença não foi observada diferença entre a cardiomegalia, inflamação, fibrose e proliferação de CMSP dos animais infectados com as três cepas do *T. cruzi* utilizadas.

Na fase crônica da infecção, 100 semanas após a infecção, todos os animais infectados com as cepas Y e ABC apresentaram cardiomegalia, inflamação e fibrose na área cardíaca. Estes animais apresentaram níveis muito baixos ou ausentes de anticorpos da subclasse IgG1 nos ASC e nos AATV e não foram observados níveis detectáveis de IL-10 *in situ* no coração. Todavia, nos animais infectados com a cepa Berenice-78 foi observada apenas 50% de cardiomegalia, inflamação e fibrose na área cardíaca. Os animais infectados com a cepa Berenice-78 que apresentaram danos cardíacos produziram níveis mais baixos de IgG1 nos ASC e nos AATV e IL-10 *in situ* no coração em relação àqueles animais que não apresentaram danos cardíacos do mesmo grupo.

Tabela 7 – Aspectos imunológicos e anatomopatológicos de cães *Beagle* quatro semanas após a infecção (fase aguda) com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.

Cepa	Cão	IP área cardíaca	Colágeno/53.333cm ² da área cardíaca	Núcleos celulares/53.333cm ² da área cardíaca	Índice de estimulação de CMSP	IgG1 (ELISA) absorbância	IgG1 (Citometria) % parasitas fluorescentes	IL-10 (coração) densitometria
Y	1	11,76	5319	265	5,6	0,082	33	0,97
Y	2	11,86	5023	286	6,6	0,081	35	0,64
Y	3	10,10	4233	301	1,0	0,070	32	0,80
Y	4	9,89	5050	308	1,9	0,077	40	0,85
ABC	5	10,08	5330	319	1,0	0,093	27	0,65
ABC	6	9,87	4801	310	1,3	0,083	30	1,1
ABC	7	9,55	4326	307	2,4	0,087	15	0,70
ABC	8	11,48	5106	361	1,4	0,109	10	0,55
Controle	9	8,51	5210	161	1,7	0,068	2	0
Controle	10	11,06	3923	152	1,3	0,063	4	0
Controle	11	9,09	4201	173	2,1	0,080	3	0
Controle	12	9,17	4614	157	0,9	0,071	2	0
Be-78	13	9,87	4256	205	2,0	0,185	77	1,49
Be-78	14	9,64	4970	254	1,1	0,196	84	1,45
Be-78	15	10,80	4218	218	1,9	0,175	85	1,05
Be-78	16	14,01	5328	325	1,4	0,109	64	2,92

IP: índice de peso (peso do coração-gramas/peso do cão-kg)

Tabela 8 – Aspectos imunológicos e anatomopatológicos de cães *Beagle* 100 semanas após a infecção (fase crônica) com as cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*.

Cepa	Cão	IP área cardíaca	Colágeno/53.333cm ² da área cardíaca	Núcleos celulares/53.333cm ² da área cardíaca	Índice de estimulação de CMSP	IgG1 (ELISA) absorbância	IgG1 (Citometria) % parasitas fluorescentes	IL-10 (coração) densitometria
Y	17	10,95	6249	245	11,4	0,081	19	0
Y	18	10,39	9095	236	14,0	0,054	20	0
Y	19	11,43	7706	275	9,7	0,071	23	0
Y	20	12,30	8996	227	12,5	0,072	16	0
ABC	21	10,63	6451	232	10,7	0,180	23	0
ABC	22	11,79	7356	246	11,5	0,238	19	0
ABC	23	10,16	8926	293	12,8	0,173	28	0
ABC	24	10,98	6835	234	9,4	0,214	33	0
Controle	25	7,34	4206	164	1,6	0,090	3	0
Controle	26	7,72	4372	177	1,2	0,078	5	0
Controle	27	6,00	3775	134	0,8	0,080	6	0
Controle	28	8,64	2845	153	1,7	0,055	4	0
Be-78	29	12,00	7132	325	10,6	0,265	79	0,13
Be-78	30	11,51	6789	254	7,9	0,226	73	0,18
*Be-78	31	8,50	4101	202	6,7	0,463	80	0,53
*Be-78	32	8,00	3905	174	5,5	0,493	84	0,70

IP: índice de peso (peso do coração-gramas/peso do cão-kg), *cães infectados sem danos cardíacos.

6. DISCUSSÃO

Os mecanismos imunopatogênicos envolvidos na doença de Chagas são objetos de diversos estudos e especulações. As características biológicas inerentes às cepas do parasito, como a infectividade *in vitro* e o polimorfismo de formas tripomastigotas sanguíneas, teriam relação direta com a apresentação de diferentes alterações anatomopatológicas cardíacas? É possível traçar um perfil de produção de anticorpos ou citocinas pelos pacientes que apresentam manifestações cardíacas ou digestivas? Aqueles indivíduos que não apresentam manifestações clínicas da doença teriam perfil diferente? Seria possível estabelecer uma mudança no padrão de resposta imunológica quando o paciente evolui da forma indeterminada para a forma cardíaca da doença? Na tentativa de encontrar resposta para estas questões buscamos estudar um modelo capaz de reproduzir com maior fidelidade à doença de Chagas humana. Além de reproduzir diferentes aspectos clínicos observados na doença de Chagas humana, o cão da raça *Beagle* foi o modelo eleito, pois são animais amplamente estudados e têm seus parâmetros imunológicos normais bem definidos, possuem características genéticas homogêneas o que propicia a obtenção de resultados imunológicos e clínicos reproduzíveis.

Neste trabalho foi observada uma correlação entre o polimorfismo e a infectividade *in vitro* de formas tripomastigotas sanguíneas em relação às lesões cardíacas produzidas pelas cepas Y, Berenice-78 e ABC do *T. cruzi*. As cepas mais patogênicas para os cães (Y e ABC) apresentaram maior número de formas tripomastigotas delgadas e maior taxa de infecção *in vitro*. Em relação ao polimorfismo das formas sanguíneas foi observado 91% de formas delgadas para a cepa Y e uma predominância de 90% e 84% de formas largas para as cepas Berenice-78 e ABC, respectivamente. O polimorfismo das formas sanguíneas do *T. cruzi* já havia sido descrito por Chagas (1909) e confirmado por diferentes autores posteriormente assinalando também a predominância de formas tripomastigotas delgadas na cepa Y do *T. cruzi* e de formas largas para a cepa ABC (Brener & Chiari, 1963; Lana & Chiari, 1986; Marques de Araújo & Chiari, 1988). A infectividade *in vitro* foi mais elevada para a cepa que apresentou predomínio de formas tripomastigotas delgadas em relação àquelas que apresentaram predomínio de formas largas. Os índices de infectividade *in vitro* foram 27,7%, 15,2% e 1,3% para as cepas Y, ABC e Berenice-78, respectivamente, e esta última com baixíssima taxa de infectividade. A elevada infectividade *in vitro* da cepa Y, e baixos índices de infectividade para a cepa CI com predominância de formas largas têm sido relatadas (Brener *et al.*, 1976; Bertelli *et al.*, 1977; Bertelli & Brener, 1980).

Outro aspecto relacionado ao polimorfismo e a infectividade de formas tripomastigotas *in vitro* são as curvas de parasitemia obtidas em camundongos infectados experimentalmente

(Brener *et al.*, 1976; Bertelli *et al.*, 1977; Bertelli & Brener, 1980; Lana & Chiari, 1986; Marques de Araújo & Chiari, 1988). Em cães da raça *Beagle* infectados com tripomastigotas da cepa ABC foram observados altos níveis de parasitemia, nos infectados com a cepa Y, níveis intermediários e baixos níveis naqueles infectados com a cepa Berenice-78. Os períodos pré-patentes (PPP) e períodos patentes (PP) foram mais curtos para a cepa que apresenta predomínio de formas delgadas (cepa Y) e PPP e PP mais longos para as cepas com predomínio de formas largas (cepas ABC e Berenice-78). Resultados concordantes foram obtidos em camundongos infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC (Lana & Chiari, 1986; Marques-Araújo & Chiari, 1988). As formas tripomastigotas delgadas do *T. cruzi* são mais susceptíveis a lise pelo complemento do que as formas largas, e seriam detectadas por curtos períodos na circulação sangüínea, entretanto, apresentam infectividade mais elevada para tecidos do hospedeiro propiciando o aparecimento de intensa destruição tecidual (Krettl & Brener, 1982).

O tropismo diferenciado em camundongos já foi assinalado na literatura para as diferentes cepas do *T. cruzi*, determinando o parasitismo preferencial de determinados órgãos. Este fator influencia a manifestação das diferentes formas clínicas da doença. A cepa Y mostra tropismo preferencial por macrófagos do sistema fagocítico mononuclear (Alcântara & Brener, 1978), enquanto a cepa Berenice-78 apresenta tropismo principalmente pela musculatura cardíaca e esquelética (Lana & Chiari, 1986).

Entre os aspectos relevantes no estudo que envolve a imunidade na infecção humana pelo *T. cruzi* os mecanismos relacionados à resistência ou a patogênese da infecção chagásica são extensivamente estudados. Assim, investigações que focalizem correlacionar à produção de isotipos e subclasses de imunoglobulinas ou citocinas são extremamente relevantes na tentativa de se encontrar um mecanismo para diminuir a morbidade de pacientes chagásicos durante a fase crônica da doença.

A primeira observação realizada em relação a fatores do sistema imune demonstrada por nossos resultados foi haver uma correlação entre a parasitemia patente e o início da produção de anticorpos líticos (AL) e AATV. Nos animais infectados que apresentaram períodos pré-patentes curtos os AL e os AATV foram detectados nos soros dos animais precocemente. Assim, anticorpos específicos anti-*T. cruzi* foram detectados pelas técnicas de LMCo e de CF a partir de 15 dias após a inoculação nos animais infectados com as cepas Y (período patente/PP: 11-19^o dia) e ABC (PP: 14-38^o dia), e somente a partir de 30 dias naqueles animais infectados com a cepa Berenice-78 (PP:18-30^o dia). A detecção precoce de AL foi descrita em cães sem raça definida infectados com cepa que apresenta PPP curtos (cepa Y) e

uma detecção mais tardia naqueles animais infectados com cepas que tem PPP mais elevados, como, a cepa Berenice-78 (Guedes *et al.*, 2002).

Neste estudo foi investigado, ainda, a correlação entre a produção de determinado isotipo ou subclasse de anticorpo com a destruição cardíaca (inflamação e fibrose) apresentada pelos animais, analisando os ASC (IgA, IgM, IgG, IgG1 e IgG2), os AATV (IgG, IgG1 e IgG2) e os AL (IgG). Este é o primeiro trabalho que pesquisa a correlação entre as subclasses de IgG com as diferentes formas clínicas da doença de Chagas no modelo canino.

Os animais infectados com as três cepas do *T. cruzi* apresentaram o mesmo perfil de produção de IgA e IgM na SC, não sendo observada produção preferencial de determinado isotipo de imunoglobulina em cães que apresentavam a forma indeterminada ou cardíaca da doença. Entretanto, a negatização dos níveis de IgA (15 semanas após a infecção) ocorreu antes de IgM (20 semanas após a infecção), detectada até o início da fase crônica. Estes dados indicam que a detecção de IgA poderia ser um marcador auxiliar da fase aguda da doença de Chagas juntamente com IgM, talvez auxiliando o diagnóstico e o tratamento da doença de Chagas congênita assim como é utilizado em toxoplasmose (Signorell *et al.*, 2006; Schmidt *et al.*, 2006). Em pacientes chagásicos na fase crônica foram obtidos resultados concordantes em relação ao perfil de imunoglobulinas detectadas pela SC, com títulos elevados de IgG específicos e a ausência de anticorpos IgM e IgA (Scott & Goss-Sampson, 1984; Medrano-Mercado *et al.*, 1996). Por outro lado, Morgan *et al.* (1996) demonstraram a elevação na produção de IgM em pacientes com manifestações cardíacas, enquanto níveis mais elevados de IgA foram detectados em pacientes com alterações gastrointestinais. Ouaisi *et al.* (1991) realizaram a avaliação de anticorpos presentes na SC de 14 pacientes chagásicos durante a fase aguda da infecção e demonstraram a produção de IgG, IgM e IgA em 69%, 84% e 75% dos pacientes, respectivamente. Por outro lado, a avaliação de 50 pacientes na fase crônica revelou a positividade de 16%, 8% e 10% para IgG, IgM e IgA, respectivamente. A cinética de produção de IgM em casos agudos da doença de Chagas humana foi investigada verificando-se uma rápida elevação dos níveis de produção desta imunoglobulina, com pico de produção aos 17 dias após a infecção, seguido de queda dos níveis até o 66^o dia porém, não retornando a níveis basais até o 93^o dia após a infecção. Por outro lado, os níveis de anticorpos específicos IgG anti-*T. cruzi* aumentaram mais lentamente alcançando o pico de produção aos 30 dias após a infecção e permanecendo com altos níveis até 93 dias (Grauert *et al.*, 1993).

Resultados semelhantes foram observados em cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*. Foi observada a produção de IgM durante a fase aguda da infecção, enquanto

anticorpos específicos IgG-anti *T. cruzi* foram detectados a partir do 15º dia após a infecção atingindo picos de produção no 140º dia. Em seguida, foram detectados níveis estáveis e elevados até 420º dia de infecção e, posterior decréscimo durante a fase crônica atingindo níveis baixos no 840º dia após a infecção, porém apresentando reatividade até o final do período de observação, 1120 dias após infecção (Andrade *et al.*, 1981; Lana *et al.*, 1988; Barr *et al.*, 1991; Guedes *et al.*, 2002, 2004).

A ELISA, IFI e hemaglutinação estão entre os métodos sorológicos mais amplamente utilizados para o diagnóstico da doença de Chagas em humanos e animais. Entretanto, apesar desses testes possuírem alta sensibilidade a especificidade pode ser baixa podendo apresentar reação cruzada no soro de pacientes infectados com *Leishmania sp* e *Trypanosoma rangeli* (Zeledon *et al.*, 1975; Schattscheider *et al.*, 1992; Umezawa *et al.*, 1996; Saldana & Sousa, 1996; Lauricella *et al.*, 1998; Montenegro *et al.*, 2002). Em decorrência destes problemas muitos autores têm procurado outras técnicas, como, a LMCo que detecta anticorpos líticos (Krettli *et al.*, 1979), e a citometria de fluxo para a pesquisa de AATV (Martins Filho *et al.*, 1995), bem como antígenos recombinantes (Moncayo & Luquetti, 1990; Levin *et al.*, 1991; Krautz *et al.*, 1995; Umezawa *et al.*, 1999; Meira *et al.*, 2004) com o objetivo de evitar a reação cruzada entre pacientes portadores de outras doenças, e para auxiliar no diagnóstico e no controle de cura da doença de Chagas. Ademais, os anticorpos líticos são importantes no mecanismo de resistência à infecção pelo *T. cruzi* e podem ter correlação com a apresentação das diferentes manifestações clínicas. Os anticorpos líticos descritos pela técnica de LMCo (Krettli & Brener, 1982) ligam-se a uma glicoproteína de 160 kDa presente apenas na superfície de formas tripomastigotas do *T. cruzi* (Martins *et al.*, 1985). Esta glicoproteína, é uma proteína reguladora do complemento, inibe a formação de C3 convertase, gerando resistência à lise pelo complemento (Krettli *et al.*, 1979; Norris *et al.*, 1989, 1991; Krautz *et al.*, 2000).

Com o intuito de verificar se existe relação entre as diferentes manifestações anatomopatológicas e a produção de AL, foi determinada a cinética de produção destes nos animais infectados com as três cepas do *T. cruzi*. O perfil de produção de AL foi semelhante em todos os animais infectados. Este perfil de produção também foi semelhante ao observado para IgG total detectada pela CF. Não houve correlação entre os níveis de produção de AL e a patologia cardíaca observada nos animais. Martins-Filho *et al.* (1995) descreveram a correlação de 95% entre a produção de AL e AATV no soro de pacientes chagásicos. Por outro lado, com a utilização de diluições seriadas na técnica de LMCo talvez fosse possível encontrar alguma diferença de produção de AL nos animais com diferentes níveis de danos

cardíacos.

Neste trabalho também observamos o mesmo perfil de produção de IgG total e de IgG2 na SC e na CF nos animais infectados com as três cepas do *T. cruzi*. Entretanto, foram detectados diferentes níveis de produção de IgG1 quando foi utilizada a SC ou a CF. Dois pontos devem ser considerados para discussão em relação à produção de IgG1, o primeiro é que a indução na produção de IgG1 parece estar relacionada principalmente, com a fase da doença de Chagas e com a cepa do parasito. Isto porque nos animais infectados com as cepas Y e ABC, este isotipo foi detectado somente durante a fase aguda da doença de Chagas e pela CF. Naqueles animais infectados com a cepa Berenice-78, níveis altos de IgG1 foram detectados durante as fases aguda e crônica na SC e na CF. Estes achados são concordantes com a literatura, onde é descrito que a produção de diferentes subclasses de IgG poderia ser influenciada pela região geográfica a qual são provenientes os pacientes, a genética do parasito e do hospedeiro vertebrado (Andrade *et al.*, 1985). Em outras infecções por protozoários, como na malária e na leishmaniose, as variações na produção das subclasses de IgG têm sido descritas em função de pacientes provenientes de diferentes regiões geográficas e/ou devido à genética distinta dos parasitos (Elassad *et al.*, 1994; Chatterju *et al.*, 1998; Druilhe & Bouharoun-Tayoun 1991; Ferreira *et al.*, 1993, 1996, 1998).

Diversos autores têm demonstrado a produção diferenciada de subclasses de IgG em pacientes chagásicos procedentes de diferentes regiões geográficas, e em camundongos infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*. Cerban *et al.* (1993) avaliaram a produção das subclasses de IgG pela sorologia convencional no soro de 28 pacientes chagásicos crônicos com idades entre 20 e 40 anos positivos por meio de IFI e HAI em áreas endêmicas da Argentina, sendo detectada uma elevada produção de IgG1 e IgG3 e baixa produção de IgG2 e IgG4. Outros estudos realizados em pacientes chagásicos crônicos provenientes da Argentina e do Brasil, por meio da ELISA determinaram um predomínio de IgG1 e IgG3 em relação a baixos níveis de IgG2 e IgG4 (Scott & Goss-Sampson *et al.*, 1984; Levin *et al.*, 1990; Solana *et al.*, 1995; Morgan *et al.*, 1996). Motran *et al.* (1994) avaliaram a produção dos isotipos de IgG específicos anti-*T. cruzi* em duas populações indígenas (Mataco e Toba) em área endêmica para a doença de Chagas. Foi utilizada a técnica de ELISA, sendo observada a produção dessas subclasses em relação as tribos Mataco e Toba, respectivamente, de IgG2 70% e 15%, IgG3 75% e 40%, IgG4 85% e 20%, nos indivíduos examinados. A percentagem de produção de IgG1 foi similar em ambas tribos (70%). Por outro lado, Cordeiro *et al.* (2001) descreveram o predomínio de IgG1 e IgG2 nos anticorpos da SC e das subclasses IgG1 e IgG3 na CF no soro de pacientes chagásicos crônicos.

Estudos realizados em camundongos para a determinação das subclasses de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c, IgG3) presentes no soro durante as fases aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*, descreveram principalmente a produção das subclasses IgG2a e IgG2b, discordando dos resultados obtidos para pacientes, com a produção preferencial de IgG1 e IgG3 durante a fase crônica da doença (Minoprio *et al.*, 1988; Spinella *et al.*, 1989, 1990 e 1992; Cerban *et al.*, 1991; Giordanengo *et al.*, 2000). Giordanengo *et al.* (2000) demonstraram que ocorre a formação de anticorpos de todas as subclasses de IgG contra cruzipáina e miosina.

O segundo aspecto e talvez o mais pertinente, em relação à produção de subclasses de IgG, seria a existência um padrão de produção que poderia ser correlacionado à patogenia em indivíduos infectados? Nossos experimentos demonstraram uma correlação entre a produção de IgG1 e a ausência de lesões cardíacas nos cães infectados. Desta forma, os animais infectados com as cepas Y e ABC, que não produziram IgG1 durante a fase crônica apresentaram inflamação e fibrose na área cardíaca. Enquanto, no grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78 foi demonstrada fibrose e inflamação pouco acentuada em 50% dos animais que produziram níveis mais baixos de IgG1, mas a destruição cardíaca foi ausente nos animais que produziram níveis mais elevados de IgG1.

Muitos autores têm tentado demonstrar a correlação entre as subclasses IgG e a severidade dessas formas clínicas da doença de Chagas humana (Cerban *et al.*, 1993; Morgan *et al.*, 1996; Michailowsky *et al.*, 2003) e em modelo experimental (Spinella *et al.*, 1992; Giordanengo *et al.*, 2000).

Cerban *et al.* (1993) determinaram a reatividade das subclasses de IgG no soro de pacientes chagásicos por ELISA utilizando antígeno de formas epimastigotas e a fração antigênica ácida do citosol do *T. cruzi*. Os pacientes foram separados em grupos: 1) pacientes com ECG normal; 2) pacientes com ECG alterado, porém sem cardiomegalia e 3) pacientes com ECG alterado e com cardiomegalia. Os níveis mais altos de anticorpos foram observados no grupo 2. Altos níveis de IgG1 e IgG3 e baixos níveis de IgG2 e IgG4 foram observados com a utilização de antígenos de formas epimastigotas e da fração citosólica detectando principalmente, a produção de IgG1. A produção diferenciada das subclasses IgG não foi observada em pacientes portadores das diferentes manifestações clínicas. Dados que foram também obtidos por Scott e Goss-Sampson (1984) e Michailowsky *et al.* (2003) que não verificaram a diferença nos níveis das subclasses de IgG em pacientes com diferentes manifestações clínicas da doença. Por outro lado, Morgan *et al.* (1996) analisando soros de pacientes obtiveram quatro grupos distintos baseado em aspectos clínicos (pacientes com

alterações cardíacas, pacientes com envolvimento gastrointestinal, portadores de alterações cardíacas e digestivas e pacientes na forma indeterminada) e indicaram a produção específica das subclasses de IgG envolvida com a patogênese ou com o fenômeno de resistência. Sendo demonstrada a elevação na produção de IgG2 em pacientes com manifestações cardíacas. Cordeiro *et al.* (2001) e Hernandez-Becerril *et al.* (2001) descreveram resultados semelhantes além de altos níveis de IgG2 no soro de pacientes com formas cardíacas e digestivas. A forma indeterminada da doença de Chagas foi associada a altos níveis de IgG1 (Cordeiro *et al.*, 2001).

No modelo murino não foi relacionada uma determinada subclasse de IgG com risco de dano cardíaco, mas a produção elevada de IgG2a e IgG2b ocorria principalmente durante a fase crônica da infecção. Por outro lado foi descrito o papel protetor de IgG1, IgG2a e IgG2b durante a infecção aguda e crônica de camundongos, mas também a formação de auto-anticorpos destas subclasses contra receptores muscarínicos e adrenérgicos, fibronectina e miosina cardíaca (Andrade *et al.*, 1985; Minoprio *et al.*, 1988; Spinella *et al.*, 1989, 1990 e 1992; Cerban *et al.*, 1991; Sterin-Borda *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2006).

Em relação à produção de IgG1 estar associada com a forma indeterminada da doença de Chagas, duas hipóteses podem ser propostas:

Hipótese I - IgG1 interage com células fagocitárias do sistema imune, além de ativar o Sistema Complemento destruindo formas tripomastigotas (Figura 5). Desta forma em pacientes onde há produção de IgG1 haveria um controle mais eficiente da parasitemia e conseqüentemente um baixo parasitismo e destruição tecidual. A atividade lítica de IgG1 é descrita por alguns autores na infecção chagásica no modelo murino (Brodskyn *et al.*, 1989). Todavia, outros trabalhos descrevem a atividade lítica e citofílica para IgG2 e IgG3 em camundongos e em humanos (Stefani *et al.*, 1983; Takehara *et al.*, 1981; Brener & Kretli, 1990; Cordeiro *et al.*, 2001; Pereira *et al.*, 2003).

Hipótese II - IgG1 não tem atividade lítica e se liga às células efetoras não fagocitárias, como mastócitos e eosinófilos (Figura 6). Nesta segunda hipótese, IgG1, devido à competição por ligação em proteínas de tecidos do hospedeiro, impede a ligação de IgG2 e a destruição tecidual mediada por monócitos ou células NK (Kowano *et al.*, 1994; Deplazes *et al.*, 1995).

Os mecanismos imunopatogênicos e de eliminação do *T. cruzi* envolvidos na infecção chagásica, cujas funções são desempenhadas pelas citocinas e pelas subclasses IgG, suas afinidades de ligação por determinadas células ou proteínas, como o complemento e sua importância para o controle da infecção ou na imunopatogenia ainda são pouco elucidados.

Experimentos controlados necessitam ser realizados para determinar o papel protetor de IgG1, por exemplo, a passagem de soro em coluna para a separação de IgG1 e posteriormente realização de LMCo para verificar sua atividade lítica. Também, a adição de macrófagos para verificar a sua atividade citofílica.

A atividade lítica ou citofílica das subclasses de IgG parece ser espécie específica, assim estudos comparativos entre a resposta obtida em humanos deveriam ser realizados no intuito de obter um modelo fidedigno da resposta imunológica. Desta forma, sugere-se que o cão seja um bom modelo experimental, já que produz as mesmas subclasses de IgG dos seres humanos, e o controle na sua produção ocorre similarmente à espécie humana. Por outro lado, o modelo murino possui um número maior de subclasses de IgG (IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG2c e IgG3) que parecem ter sua produção e funções diferente daquelas descrita para humanos (Kowano *et al.*, 1994; Deplazes *et al.*, 1995).

Entretanto, independente da atividade lítica ou citofílica exercida pela IgG1, esta pode funcionar como um marcador da forma indeterminada da doença de Chagas por ter sua produção regulada por citocinas anti-inflamatórias (Finkelman *et al.*, 1990; Vos *et al.*, 1998; Hinds *et al.*, 2001), indicando que o hospedeiro possui um controle mais eficiente entre a produção de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias. Ademais, pacientes que produzem apenas IgG2, que tem a produção regulada por citocinas pro-inflamatórias (Finkelman *et al.*, 1990; Vos *et al.*, 1998; Hinds *et al.*, 2001), teriam uma resposta inflamatória exacerbada e conseqüentemente maior destruição tecidual. As citocinas IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β (perfil Th2) são responsáveis por auxiliar a produção das subclasses de IgG1 e IgG3 (Briere *et al.*, 1994, Reed & Scott, 1993), mas a IL-12, INF- γ e TNF- α (perfil Th1) levam à produção de IgG2, sendo a produção de IgG1 e IgG2 antagonicamente regulada.

Nossos resultados ainda demonstraram que a citometria de fluxo foi mais sensível do que a técnica de ELISA para diferenciar a produção de IgG1 em cães infectados com três cepas do *T. cruzi* que apresentam diferentes graus de virulência. A maior especificidade da citometria de fluxo é devida ao uso de parasitos vivos intactos (Martins-Filho *et al.*, 1995, Cordeiro *et al.*, 2001), os quais reduzem a possibilidade de ligação não específica e reação cruzada e mantêm preservados os sítios de ligação específicos que evidenciam a produção de IgG1. Cordeiro *et al.* (2001) indicou o uso potencial de IgG1 para o diagnóstico da doença, entretanto, nossos resultados indicam que nem sempre ocorre a produção de IgG1 durante a fase crônica de cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*.

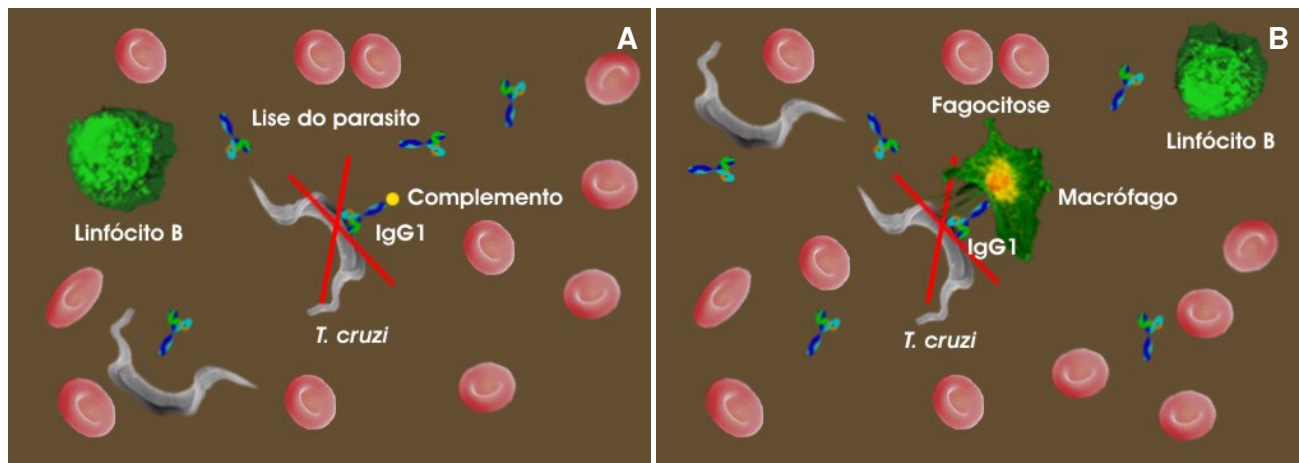


Figura 5 – Hipótese I - Esquema ilustrativo da atividade lítica (A) e citofílica (B) da subclasse IgG1 controlando a parasitemia. Havendo um controle eficiente da parasitemia através da lise por proteínas do complemento ou da fagocitose por macrófagos mediada por IgG1 resultaria em um menor parasitismo e destruição tecidual durante a infecção pelo *T. cruzi*.

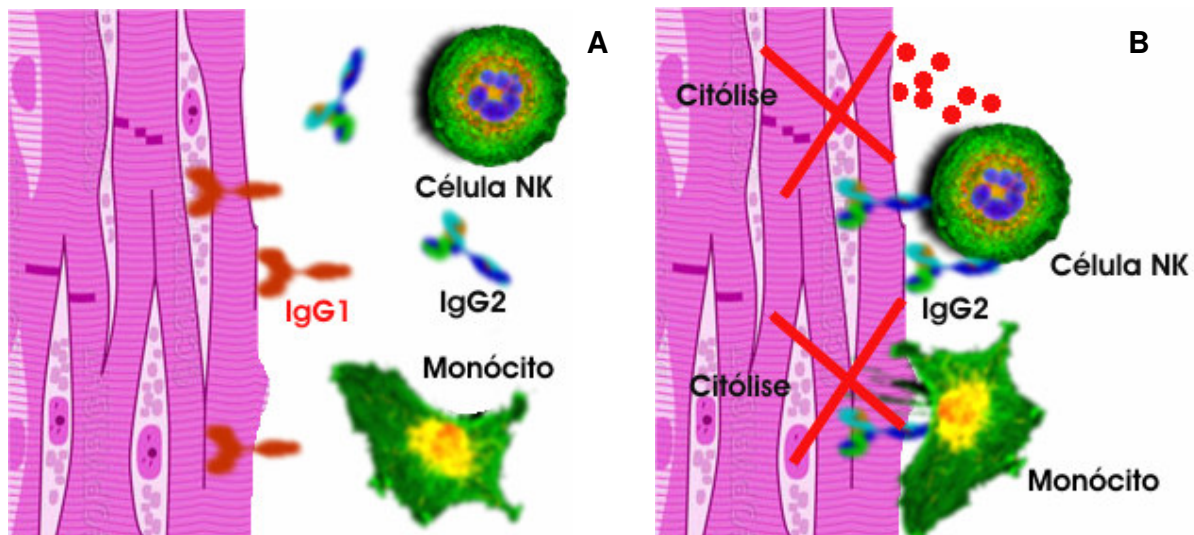


Figura 6 – Hipótese II - Esquema ilustrativo da subclasse IgG1 na ausência da atividade lítica ou citofílica ocorrendo competição por sítios de ligação com IgG2 em proteínas importantes do hospedeiro durante a infecção pelo *T. cruzi*. (A) Havendo a produção de IgG1 ocorreria menor quantidade de destruição de fibras cardíacas; (B) Sem a produção de IgG1, haveria uma maior quantidade de ligação de IgG2 ao miocárdio e a destruição tecidual seria intensa.

A soroprevalência da infecção pelo *T. cruzi* foi determinada em 356 cães domésticos no estado do Texas, EUA pelo método da citometria de fluxo e ELISA distinguindo com mais clareza os animais positivos daqueles negativos, 14,9% dos animais foram positivos no teste de ELISA e, apenas 2,5% tiveram sua positividade confirmada pela citometria de fluxo (Shadomy *et al.*, 2004).

Um aspecto avaliado foi a possibilidade da utilização da proliferação de CMSP como um marcador imunopatogênico da doença de Chagas em pacientes (Dutra *et al.*, 1994; Gusmão *et al.*, 1984) e em modelos experimentais (Barr *et al.*, 1991). A produção de IgG1, auxiliada pela produção de citocinas anti-inflamatórias (resposta do perfil Th2) coincide com o período de imunossupressão descrito ao final da fase aguda em modelos experimentais (Barr *et al.*, 1991; Guedes *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003). Os animais que tiveram alta reatividade de CMSP *in vitro* contra antígenos de *T. cruzi* provavelmente possuem grande número de clones de células CD4 (fenótipo Th1) que produzem principalmente, citocinas pró-inflamatórias.

A severidade da doença de Chagas cardíaca (Rocha *et al.*, 2003; Gomes *et al.*, 2003) e da forma digestiva (Gusmão *et al.*, 1984) em pacientes tem sido associada com alta reatividade de CMSP frente ao estímulo com antígeno de *T. cruzi*. Os pacientes chagásicos crônicos submetidos à quimioterapia específica e considerados curados apresentaram respostas proliferativas semelhantes àqueles pacientes não infectados. Em pacientes (Dutra *et al.*, 1996) e em cães (Guedes *et al.*, 2002) a cura parasitológica da doença de Chagas tem sido correlacionada com a normalização da reatividade das CMSP *in vitro* diante da estimulação antigênica específica. Entretanto, Bahia-Oliveira *et al.* (2000) obtiveram respostas proliferativas de CMSP mais elevadas em pacientes curados do que àqueles não curados e dissociados, este achado podendo ser explicado pela presença de memória imunológica. Neste trabalho, foi observada uma proliferação de CMSP similar à descrita por Barr *et al.* (1991) utilizando antígeno de formas epimastigotas, em cães experimentalmente infectados pelo *T. cruzi*. Todavia, foram detectadas respostas proliferativas mais elevadas, provavelmente devido ao uso de antígeno de formas tripomastigotas do *T. cruzi*. Gusmão *et al.* (1984) observaram que a resposta proliferativa de CMSP obtida com antígeno de formas tripomastigota-amastigota foi mais alta que a observada com a utilização de formas epimastigotas.

Outra característica importante e ainda pouco abordada em pacientes é a correlação entre as diferentes formas clínicas da doença de Chagas com o perfil de citocinas produzidos. Na infecção chagásica canina, não existem trabalhos determinando o perfil de citocinas

produzidos durante o curso da infecção pelo *T. cruzi*. Tendo sido determinado o cão como um bom modelo para estudos de imunopatogênese da doença de Chagas este é um aspecto extremamente importante a ser determinado. Pois o cão nos permite traçar uma cinética de produção de citocinas, que talvez nos possibilite determinar a mudança no perfil de produção de citocinas quando o animal evolui da forma indeterminada para a cardíaca da doença de Chagas. A determinação de um padrão de resposta imune que implique em patogenia cardíaca ou ausência de manifestações clínicas pode ser utilizada para diminuir a morbidade durante a fase crônica da doença.

A determinação *in situ* da produção de citocinas (TNF, IFN- γ e IL-10) demonstrou que durante a fase aguda da infecção nos linfonodos cervicais há um aumento da produção destas três citocinas, porém não foi observada diferença significativa entre o grupo de animais infectados para o grupo controle não infectado. Também durante a fase crônica foi observada uma produção semelhante nos níveis destas citocinas nos animais infectados e não infectados. Por outro lado, houve correlação entre as manifestações clínicas e os níveis de citocinas detectados no coração dos animais infectados. O grupo de animais infectados com a cepa Berenice-78, que não apresentaram fibrose e inflamação durante a fase crônica tiveram níveis de IL-10 detectados durante esta fase da infecção, enquanto nos animais infectados com as cepas Y e ABC que apresentaram destruição cardíaca intensa não tiveram níveis de IL-10 detectados *in situ*. E ainda, durante a fase aguda os animais infectados com a cepa Berenice-78 apresentaram maiores níveis de IL-10, apesar de não haver diferença significativa para os níveis produzidos pelos animais infectados com as cepas Y e ABC.

Estes resultados sugerem que não há uma diferença na indução de TNF ou IFN- γ *in situ* nos animais que apresentam a forma indeterminada ou cardíaca da doença. Entretanto, animais com a forma indeterminada produziram IL-10, sugerindo melhor regulação entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias. Ao contrário, a resposta detectada nos animais que apresentaram a forma cardíaca, mostrou altos níveis de citocinas inflamatórias e provavelmente baixíssimos níveis de citocinas anti-inflamatórias, já que a produção de IL-10 não foi detectada.

Estes resultados estão de acordo com o descrito para pacientes chagásicos. Alguns autores avaliaram a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α , IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-5, IL-6, IL-10) na musculatura cardíaca e em leucócitos do sangue periférico obtidas de pacientes portadores das formas clínicas indeterminada e cardíaca da doença de Chagas. Foi demonstrada uma alta produção de TNF- α e IFN- γ em pacientes portadores das formas cardíaca e indeterminada, mas baixa produção de IL-4 e IL-10 em

pacientes cardíacos quando comparados aqueles na forma indeterminada (Reis *et al.*, 1997; Bahia-Oliveira *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 1999; Correa-Oliveira *et al.*, 1999; Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003, 2005; Talvani *et al.*, 2004a). Embora Dutra *et al.* (1997) tenham descrito a presença de mRNA de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em células do sangue periférico de pacientes que apresentavam as formas cardíaca e indeterminada da doença de Chagas, citocinas inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) estavam presentes nos sítios de lesão (Reis *et al.*, 1993; Cunha-Neto *et al.*, 1998). Souza *et al.* (2004) descreveram produção mais elevada de TNF- α em cultura de linfócitos de pacientes cardíacos em relação àqueles pacientes na forma indeterminada da doença, também verificaram a baixa produção de IL-10 nos pacientes com a forma cardíaca e uma produção mais elevada em pacientes com a forma indeterminada.

Gomes *et al.* (2005) avaliaram ainda marcadores imunológicos da resposta imune Th1 (CCR5 e CXCR3) e TH2 (CCR3 and CCR4), sendo observado que a percentagem de células TCD4 e TCD8 co-expressando CCR5 e IFN- γ , CXCR3 e IFN- γ , e CXCR3 e TNF- α foi maior em pacientes cardíacos do que naqueles com a forma indeterminada, e ainda, a percentagem de células TCD4 e TCD8 co-expressando CCR3 e IL-10, CCR3 e IL-4 foi menor em indivíduos com a forma cardíaca do que com a forma indeterminada. Talvani *et al.*, (2004b) também avaliaram a expressão de receptores de quimiocinas inflamatórias (CCR1, CCR2, CCR5) e constitutivas (CXCR4) na superfície de células mononucleares do sangue periférico obtidas de pacientes com manifestações cardíacas e de indivíduos não infectados. Entretanto, foi observada uma maior expressão de CCR5 em pacientes que apresentaram moderada doença cardíaca em relação ao grupo de indivíduos não infectados e àqueles com patologia cardíaca grave. Por outro lado, pacientes com severa doença cardíaca apresentaram menor expressão de CXCR4 em relação ao grupo de indivíduos com moderada doença cardíaca e aqueles não infectados.

No modelo murino foi descrita a alta produção de IFN- γ e TNF- α *in situ* na musculatura cardíaca (Teixeira *et al.*, 2002). A utilização de camundongos *nock-out* para IL-4 infectados experimentalmente com o *T. cruzi* gerou uma exacerbação na produção de IFN- γ e nos danos na musculatura cardíaca, sugerindo uma função patogênica para o IFN- γ (Soares *et al.*, 2001). Também, foi descrito a importância de níveis séricos elevados de TGF- β e IFN- γ no processo fibrótico de camundongos infectados com o *T. cruzi*, além de níveis indetectáveis ou baixos de IL-4 e IL-10 (Waghabi *et al.*, 2002). Por outro lado, Powell *et al.* (1998) descreveram níveis de expressão similares de mRNA de IFN- γ e IL-10 por células cardíacas do coração de camundongos infectados que apresentavam diferentes graus de destruição cardíaca, sugerindo

que a diferença na expressão destas citocinas *in situ* não é um fator determinante para a apresentação de danos cardíacos. Dados na literatura mostram que, camundongos resistentes a infecção pelo *T. cruzi* produzem baixos níveis de IL-10 e IL-4 e altos níveis de IFN- γ e TNF- α em cultura de células de baço (Eksi *et al.* 1996). Também ocorre produção diferenciada em diferentes sítios anatômicos (baço e linfonodos) e sua subsequente secreção na circulação poderia ter um papel importante na formação dos danos cardíacos (Vandekerckhove *et al.* 1994). Em relação a avaliação da produção de citocinas em compartimentos linfóides (baço e linfonodo) de camundongos, foi descrito a produção de IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IFN- γ , TNF- α e TGF- β em camundongos resistentes e susceptíveis a infecção com o *T. cruzi* (Reed *et al.* 1994, Zhang & Tarleton 1996). Entretanto, ao início da fase crônica IL-4 e IL-5 foram detectadas apenas nos camundongos susceptíveis. Outros autores associaram também a produção de maiores níveis de IL-10 e IL-4 em camundongos susceptíveis a infecção (Tarleton & Nabors 1991, Reed *et al.* 1994). Por outro lado, não foi descrita correlação entre a patologia cardíaca dos animais e os níveis de produção de diferentes citocinas em órgãos linfóides.

A presença de 0%, 50% e 25% de linfadenopatia cervical nos animais infectados pelas cepas Y, Berenice-78 e ABC, respectivamente. Pode indicar diferença no recrutamento celular, havendo um estímulo para a migração de células para os linfonodos cervicais nos animais infectados com a cepa Berenice-78, enquanto nos animais infectados com a cepa Y e ABC células do sistema imune sejam principalmente recrutadas para a musculatura cardíaca, fator que pode estar associado à inflamação e a fibrose cardíaca.

A cardiomegalia, a inflamação e a fibrose foram demonstradas durante a fase crônica em 100%, 50% e 100% dos animais infectados com as cepas Y, Berenice-78 e ABC, respectivamente. Houve a produção de IgG2 e IFN- γ *in situ* no coração em níveis elevados durante a fase crônica nos animais infectados com as três cepas de *T. cruzi*. Entretanto, a subclasse IgG1 e a citocina IL-10 *in situ* no coração foram detectadas durante a fase crônica apenas nos animais infectados com a cepa Berenice-78. Entre os animais infectados com a cepa Berenice-78, aqueles que produziram níveis baixos de IgG1 e IL-10 *in situ* no coração apresentaram inflamação, fibrose e cardiomegalia, porém menos acentuada que os animais infectados com as cepas Y e ABC.

Assim como observado por Morgan *et al.* (1996) em pacientes, os animais com danos cardíacos mais intensos tiveram a síntese preferencial de IgG2 enquanto naqueles que produziram IgG1, os danos cardíacos foram menos intensos (fibrose e inflamação). Ademais, pacientes na forma indeterminada produzem um balanço entre citocinas inflamatórias e anti-

inflamatórias (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 1999; Correa-Oliveira *et al.*, 1999; Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Gomes *et al.*, 2003, 2005). Havendo uma correlação inversa entre os níveis de IgG1 (fenótipo LTh2) e as alterações cardíacas (inflamação, fibrose e cardiomegalia).

A análise do coração de pacientes chagásicos crônicos demonstrou que a multiplicação de formas amastigotas do *T. cruzi* no músculo cardíaco influencia a intensidade da resposta inflamatória e da fibrose (Cossio *et al.*, 1977; Santos *et al.*, 1990; *et al.*, 1975; Higuchi *et al.*, 1993, 1995). Segundo Chapadeiro (1967) o peso do coração sofre marcada influência da intensidade do infiltrado inflamatório e da fibrose que o acompanha.

A identificação de um modelo experimental que reproduz a doença de Chagas humana será de extrema importância para o entendimento da história natural da doença. Estudos sobre mecanismos imunológicos envolvidos nos fenômenos de resistência e na patogênese seriam importantes para melhorar o prognóstico de pacientes chagásicos de forma que visem diminuir a mortalidade e a alta morbidade que envolve a doença de Chagas.

O cão foi demonstrado como bom modelo experimental para a doença de Chagas, pois reproduziu a fase aguda com parasitemia patente, linfadenopatia, esplenomegalia, miocardite acompanhada de cardiomegalia e alterações eletrocardiográficas superponíveis a observada na doença humana. Este animal também reproduziu a fase crônica com as formas indeterminada (eletrocardiograma, esôfago e cólon sem alterações) e cardíaca (alterações eletrocardiográficas e insuficiência cardíaca congestiva com quadro anatomopatológico compatível à cardiopatia crônica fibrosante assinalada em pacientes) conforme já descrito em humanos (Rassi, 1979, Tafuri, 1987; Dias 1992 e 2000; Rassi Jr. *et al.*, 2000) e, no modelo canino (Johnson, 1938; Laranja, 1953; Koeberle, 1957; Anselmi *et al.*, 1966; Andrade & Andrade, 1980; Andrade *et al.*, 1981; Andrade, 1984; Lana *et al.*, 1988, 1992; Bahia *et al.*, 2002; Araújo *et al.*, 2002; Guedes *et al.* 2002 e 2004). Goble (1952) e Okumura & Correa-Neto (1961) descreveram a forma digestiva da doença de Chagas neste modelo, porém esses dados não foram reproduzidos.

Nos experimentos em que os animais foram eutanasiados na fase crônica foi observada a miocardite chagásica crônica fibrosante e difusa semelhante à humana. Onde focos inflamatórios intrafasciculares continuam formando-se lenta e progressivamente ao longo dos anos, modulados por resposta imune não totalmente eficaz que gera a miocardite crônica fibrosante. O grau de hipertrofia cardíaca, da fibrose e do infiltrado inflamatório são fatores determinantes para o desenvolvimento da insuficiência cardíaca congestiva e de alterações

eletrocardiográficas na cardiopatia chagásica. (Tafari, 1970; Lopes *et al.*, 1970; Lana *et al.*, 1988).

Poucos estudos descritos na literatura avaliaram a infecção chagásica em cães *Beagle*, entretanto, são pesquisas mais antigas e que utilizaram inóculos muito grandes que variaram entre 5×10^5 a $8,3 \times 10^7$ parasitos por animal, inóculo este muito maior daquele utilizado neste trabalho (4×10^3 /kg) (Marsden & Hagstrom, 1966, 1968; Kramer Jr., 1972; Barr *et al.*, 1991a, 1991b). Por outro lado, devido ao fato da carga parasitária influenciar as manifestações clínicas da doença, os animais apresentaram manifestações clínicas graves. Foi descrita durante a fase aguda a presença de edema periorbital semelhante ao chagoma de inoculação naqueles animais inoculados no plexo orbital, parasitemia patente, perda de peso, prostração, miocardite severa, linfadenopatia, esplenomegalia e durante a fase crônica foi descrita miocardite chagásica crônica fibrosante. Ademais, somente Barr *et al.* (1991b) descreveu poucas características imunológicas (produção de IgG total e linfoproliferação) destes animais sem obter uma relação entre os níveis de produção de IgG total ou da resposta proliferativa em relação a patogênese da doença, o que justificou uma análise mais detalhada do sistema imune para correlação com os achados clínicos da doença de Chagas utilizando um inóculo (4×10^3 /kg) padronizado em nosso laboratório no modelo *Beagle*.

Nossos resultados estão de acordo com os descritos acima, para animais sem raça definida e para cães *Beagle*, sendo observado durante a fase aguda parasitemia patente, linfadenopatia, esplenomegalia, miocardite intensa e degeneração hialina do miocárdio em todos os cães infectados com as três cepas do *T. cruzi*, além de ser detectado perda de peso em alguns animais. Na fase crônica foram também observadas as formas clínicas, indeterminada e cardíaca e correlacionadas com os aspectos da resposta imunológica dos animais, os quais foram muito semelhantes aos descritos na doença humana, corroborando a idéia de que os cães da raça *Beagle* podem ser um bom modelo para estudos de imunopatogênese da doença de Chagas. A semelhança entre os resultados descritos em nosso trabalho e a patologia da doença humana, e ainda a comparação com o modelo murino encontram-se sumarizadas a seguir no Quadro 1.

Quadro 1 – Avaliação imunológica e clínica comparativa da doença de Chagas em pacientes e em modelos experimentais (canino e murino). Semelhanças entre nossos resultados e a doença humana encontram-se destacados em azul.

Aspecto analisado	CAMUNDONGO	CÃO	HUMANO
Fase aguda e crônica da doença de Chagas	Fase aguda com parasitemia patente, porém, a fase crônica obtida é curta (2 anos), impossibilita experimentos de quimioterapia e patogênese de longa duração <i>(Andrade et al., 1985; Toledo et al., 2002; Veloso et al., 2005)</i>	Fase aguda com parasitemia patente seguida por uma fase crônica , que pode ser de longa duração (até 20 anos) <i>(Andrade et al., 1981; Lana et al., 1988, 1992; Bahia et al., 2002; Guedes et al., 2002 e 2004)</i>	Fase aguda com parasitemia patente seguida por uma fase crônica que pode durar até 70 anos <i>(Salgado et al., 1962; Salgado, 1980; Rassi, 1979; Rassi Jr. et al., 2000)</i>
Aspectos anatomopatológicos	Flacidez da musculatura cardíaca e cardiomegalia, esplenomegalia <i>(Andrade & Andrade, 1968; Andrade & Andrade, 1976; Andrade, 1990)</i>	Flacidez e cardiomegalia, esplenomegalia linfadenopatia aneurisma de ponta, hepatomegalia <i>(Johnson, 1938; Laranja, 1953; Koeberle, 1957; Andrade et al., 1981; Andrade, 1984; Lana et al., 1988, 1992; Bahia et al., 2002)</i>	Flacidez e cardiomegalia, aneurisma de ponta, hepatoesplenomegalia, linfadenopatia, edema subcutâneo, sinal de Romanã e chagoma de inoculação <i>(Salgado et al., 1962; Salgado, 1980; Rassi, 1979; Rassi Jr. et al., 2000)</i>
Forma indeterminada	Semelhante a humana <i>(Andrade et al., 1985; Toledo et al., 2002; Veloso et al., 2005)</i>	Semelhante a humana <i>(Andrade, 1984; Lana et al., 1988, 1992; Araújo et al., 2002; Guedes et al., 2002)</i>	Observada com exames sorológicos e parasitológicos positivos e sem apresentar sintomatologia clínica <i>(Salgado et al., 1962; Salgado, 1980; Rassi, 1979; Rassi Jr. et al., 2000)</i>
Forma digestiva	Não descrita, dilatação no colôn, não como da doença humana <i>(Guillén-Pernia et al., 2001)</i>	Megacolón e megaesôfago, não reproduzida posteriormente <i>(Koeberle, 1957; Okumura e Corrêa-Neto, 1961)</i>	Megacolón e megaesôfago <i>(Koeberle & Nador, 1955; Koeberle, 1957; Vago et al., 2000, Lages-Silva et al., 2001)</i>
Forma cardíaca	Miocardite e Cardiopatia chagásica crônica fibrosante e difusa Onda T de repolarização ventricular vem logo após QRS (QRST) prejudica caracterização S-T e da onda S. Outras alterações são semelhantes a humana <i>(Bolomo et al., 1982; Bijovsky et al., 1983; Andrade et al., 1985; Toledo et al., 2002; Veloso et al., 2005)</i>	Miocardite e Cardiopatia chagásica crônica fibrosante e difusa alterações ECG superponíveis a humana (nestes <i>Beagle</i> , tese Veloso VM) <i>(Andrade, 1980; Andrade et al., 1981; Andrade, 1984; Lana et al., 1988, 1992; Araújo et al., 2002; Guedes et al., 2002 e 2004)</i>	Miocardite e Cardiopatia chagásica crônica fibrosante e difusa Alterações ECG (taquicardia sinusal, disritmia ventricular, baixa voltagem do QRS, bloqueio átrio ventricular, extra-sístole ventricular, bloqueio do ramo direito do feixe de His com ou sem hemi bloqueio do esquerdo, achatamento da onda T e retificação ST) <i>(Dias & Kloetzel, 1968; Rodrigues et al., 1966; Peralta et al., 1981; Prata et al., 1993; Garzon et al., 1995)</i>
Subclasses de IgG/ patologia cardíaca	Não está descrita relação da patologia cardíaca e subclasses de IgG, produção elevada de IgG1, IgG2a e IgG2b tendo papel protetor e a formação de auto-anticorpos destas subclasses <i>(Minoprio et al., 1988; Spinella et al., 1990 e 1992; Cerban et al., 1991)</i>	Produção de IgG1 + IgG2 encontrada na forma indeterminada, IgG2 apenas relacionada a forma cardíaca	IgG1 + IgG2 encontrada na forma indeterminada, IgG2 apenas relacionada a forma cardíaca <i>(Cerban et al., 1993; Morgan et al., 1996; Cordeiro et al., 2001; Hernandez-Becerril et al., 2001)</i>
Citocinas/ patologia cardíaca	Altos níveis de IFN- γ , TNF- α e TGF- β e baixos de IL-10 e IL-4 associados a danos cardíacos, animais com poucos danos cardíacos tiveram alta produção de IL-10 ou IL-4 <i>(Powell et al 1998; Soares et al., 2001; Teixeira et al., 2002; Waghabi et al., 2002)</i>	Níveis elevados IFN-γ e IL-10 <i>in situ</i> no coração (AD) encontrados na forma indeterminada, animais com manifestações cardíacas detectou-se apenas IFN-γ durante a fase crônica	Alta produção de TNF- α e IFN- γ associada a alta produção de IL-4 e IL-10 na forma indeterminada, enquanto pacientes cardíacos produziram baixos níveis de IL-4 e IL-10 <i>(Reis et al., 1997; Bahia-Oliveira et al., 1998; Higuchi et al., 1999; Correa-Oliveira et al., 1999; Ribeirão et al., 2000; Abel et al., 2001; Gomes et al., 2003, 2005).</i>

7. CONCLUSÕES

Os dados obtidos neste estudo permitem concluir que:

1. Os padrões mais graves de alterações anatomopatológicas cardíacas foram observados nos animais infectados com as cepas Y e ABC, que apresentaram alta infectividade *in vitro* e produziram níveis elevados de parasitemia, os quais não produziram IgG1 no sangue periférico e IL-10 *in situ* no coração durante a fase crônica da infecção.
2. A ausência ou a presença de discretas alterações anatomopatológicas cardíacas foram observadas nos animais infectados com a cepa Berenice-78, que apresentou baixa infectividade *in vitro* e gerou baixos níveis de parasitemia, os quais produziram IgG1 no sangue periférico e IL-10 *in situ* no coração durante a fase crônica da infecção.
3. A detecção de níveis de IgA apenas durante a fase aguda da infecção e, sua negatificação precoce, sugere que este isotipo juntamente com IgM poderia ser um marcador auxiliar da fase aguda da doença de Chagas.
4. O cão da raça *Beagle* é um bom modelo experimental para estudos de imunopatogênese da doença de Chagas durante as fases aguda e crônica, uma vez que a produção de citocinas, imunoglobulinas e alterações cardíacas anatomopatológicas foram semelhantes à doença humana.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABEL, L. C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E.A.; TEIXEIRA, H.C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Autoimmun.* v. 17, p. 99-107, 2001.

ALCÂNTARA, A; BRENER, Z. The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop.* v. 35(3), p. 209-219, 1978.

ANDRADE, S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 85, p.17-27, 1990.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.10, p.180-187, 1968.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A. Aspectos anátomo-patológicos e resposta terapêutica na infecção chagásica crônica experimental. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*. v.18, p.268-275, 1976.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A.; SADIGURSKY, M.; MAGUIRE, J.H. Experimental Chagas' disease in dogs. A pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Arch. Pathol. Lab. Med.* v.105, p.460-464, 1981.

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

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. Pathology of experimental Chagas disease in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.75 (3), p.77-95, 1980.

ANDRADE, Z. A. The canine model of Chagas' disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.79, p.77-83, 1984.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M.; WENTHOLD, J.R.; HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural

characterization of cardiac changes in the canine model. *Am. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.57(3), p.328-336, 1997.

ÃNEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE G., ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALES, N.; PERCOCO, E.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.60, p.726-732, 1999.

ANONIMOUS. Recommendations from a Satellite Meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v.94(Suppl), p.513 -517, 1999.

ANSEMI, A.; PIFANO, F.C.; SUAREZ, J.A.; DOMINGUEZ, A.; VAZQUEZ, A.O.; ANSEMI, G. Experimental *Schizotrypanum cruzi* myocarditis. Correlation between histopathologic and eletrocardiografic findings in experimental Chagas' heart disease. *Am. Heart. J.*, v.70 (4), p.638-656, 1965.

ANSEMI, A.; PIFANO, F.C.; SUAREZ, J.A.; GURDIEL, O. Miocardiopathy in Chagas' disease. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas myocarditis. *Am. Heart. J.*, v.72 (4), p.469-481, 1966.

ARAÚJO, F.M.G; BAHIA, M.T., MAGALHÃES, N.M., MARTINS-FILHO, O., VELOSO, V.M., CARNEIRO, C.M., TAFURI, W.L., LANA, M. Follow-up of experimental chronic Chagas' disease in dogs: use of polymerase chain reaction (PCR) compared with parasitological and serological methods. *Acta Trop.* v.81(1):21-31,2002.

ARAÚJO-JORGE T.C. & CASTRO S.L. Doença de Chagas – Manual para experimentação animal. Ed. Fiocruz, Rio de Janeiro, p.134-140, 2000.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; GOMES, J. A. S.; ROCHA, M. O. C.; MOREIRA, M. C. V.; LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M. P.; PEREIRA, M. E. S.; COFFMAN, R. L.; DIAS, J. C. P.; CANÇADO, J. R.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. IFN- γ in human Chagas' disease: protection or pathology? *Braz. J. Med. and Biol. Res.* v.31, p.127-131, 1998.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; GOMES, J.A.S.; CANÇADO, J.R.; FERRARI, T.C.; LEMOS, E.M.; LUZ, Z.M.P.; MOREIRA, M.C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. *J. Infect. Dis.* v.182, p.634-638, 2000.

BAHIA, M.T.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V., VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; COELHO, G.L.; LANA, M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.35(4), p.339-345, 2002.

BAMBIRRA, E.A. *Infecção experimental em cães Pinscher pelo T. cruzi (Chagas, 1909). Resposta imunitária do parasita a antígenos exógenos e de tecidos do hospedeiro, no decurso da infecção.* 1982. 156f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

BARBOSA, A.J.A.; GOBBI, H.; LINO, B.T.; LAJES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; TEIXEIRA, V.P.A.; ALMEIDA, H.O. Estudo comparativo entre o método convencional e o método peroxidase antiperoxidase na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crônica. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.28, p.91-96, 1986.

BARR, S.C.; SCHMIDT, S.P.; BROWN, C.C.; KLEI, T.R.. Pathologic features of dogs inoculated with North American *Trypanosoma cruzi* isolates. *Am J. Vet. Res.* v.52(12), p.2033-2039, 1991a.

BARR, S.C.; DENNIS, V.A.; KLEI, T.R.; NORCROSS, N.L. Antibody and lymphoblastogenic responses of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* isolates from North American mammals. *Vet. Immunol. Immunopathol.* v.29, p.267-283, 1991b.

BARR, S.C.; WARNER, K.L.; KORNREIC, B.G.; PISCITELLI, J.; WOLFE, A.; BENET, L.; MCKERROW, J.H. A cysteine protease inhibitor protects dogs from cardiac damage

during infection by *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrob Agents Chemother.* v.49(12), p.5160-5171, 2005.

BELLOTTI, G.; BOCCHI, E.A.; DE MORAES, A.V. “*In vivo*” detection of *Trypanosoma cruzi* in patient with chronic Chagas’ heart disease. *Amer. Heart. J.*, v.113, p.716-724, 1996.

BERTELLI, M.S.; BRENER, Z. Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol.* v. 66(6), p.992-997, 1980.

BERTELLI, M.S.; GOLGHER, R.R.; BRENER, Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. *J. Parasitol.* v.63, p.434-437, 1977.

BIJOVSKY, A.T.; ELIZARI, M.V., MULLER, L.A.; KATZIN, V.I.; GONZALLES-CAPPA, S.M. Chronic infection in mice, with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc. Bras. Med. Trop. São Paulo*, v.25, p.207-214, 1983.

BOLOMO, N.J.; MORALES, M.C.; BASOMBRIIO, M.A.; MILEI, J.; DE LA VEJA, M.; COSSIO, P.M. El raton Swiss modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Bol. Acad Nac (Buenos Aires)*, v.60, p.133-143, 1982.

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

BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v.59, p.19-26, 1965.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo* v.5, p.220-244, 1963.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas’ disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, v.114, p.103-110, 1997.

BRENER, Z.; GOLGHER, R.; BERTELLI, M.S.; TEIXERA, J.A. Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. *J. Protozool.* v.23(1), p.147-150, 1976.

BRENER, Z.; KRETLI, A.U. Immunology of Chagas disease. In Modern parasite biology. Wyler. D.J. Ed. W.H. Treeman. New York. p.247, 1990.

BRIERE, F.; SERVET-DELPRATE, C.H.; BRIDON, J.M. Human interleukin 10 induces nave surface immunoglobulin D+ (slgD+) B cells to secrete IgG1 e IgG3. *J. Exp. Med.*, v.179, p.757-762, 1994.

BRODSKY, C.I.; SILVA, A.M.; TAKEHARA, H.A.; MOTA I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunol Cell Biol.* v.67(6) p.343-348, 1989.

CALIARI, M.V. *Princípios de morfometria digital. KS300 para iniciantes*. Belo Horizonte: Editora da Universidade Federal de Minas Gerais, 1997. p.1-149.

CALIARI, M.V. Estudo histopatológico, imuno-histoquímico e morfométrico da miocardite chagásica aguda e crônica de cães experimentalmente infectados. 2001. 100f. Tese (Doutorado em Parasitologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.

CALIARI, M.V.; PILAR MACHADO, R.; DE LANA, M.; CAJA, R.A.; CARNEIRO, C.M.; BAHIA, M.T.; DOS SANTOS, C.A.; MAGALHAES, G.A.; SAMPAIO, I.B.; TAFURI, W.L. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* v.44(5), p.273-278, 2002.

CASEY, T.T.; COUSAR, J.B.; COLLINS, R.D. A simplified plastic embedding and immunohistologic technique for immunophenotypic analysis of human hematopoietic and lymphoid tissues. *Am. J. Path.*, v.131, p.183-189, 1988.

CERBAN, F.M.; GRUPPI, A., GEA, S.; VOTTERO-CIMA, E. IgG isotype profiles induced in mice by two *Trypanosoma cruzi* electronegative antigens. *Int. Arch. Allergy Appl. Immunol.* v.96(1), p.35-40, 1991.

CERBAN, F.M.; GEA, S.; MENSIO, E.; VOTTERO-CIMA, E. Chagas' disease: IgG isotypes against *Trypanosoma cruzi* cytosol acidic antigens in patients with different degrees of heart damage. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.67 (1), p.25-30, 1993.

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

CHAPADEIRO, E. Weight of the heart and severity of the inflammatory process in chronic Chagas' disease. *Bol. Oficina Sanit. Panam.* v.63(3), p.236-239, 1967.

CHATTERJEE, M.; BASU, K.; BASU, D.; BANNERJEE, D.; PRAMANIK, N.; GUHA, S.K.; GOSWAMI, R.P.; SAHA, S.K.; MANDAL, C. Distribution of IgG subclasses in antimonial unresponsive Indian kala-azar patients. *Clin. Exp. Immunol.* v.114(3), p.408-413, 1998.

CORREA-OLIVEIRA, R.; GOMES, J.; LEMOS, E.M.; CARDOSO, G.M.; REIS, D.D.; ADAD, S.; CREMA, E.; MARTINS-FILHO, O.A.; COSTA, M.O.; GAZZINELLI, G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.94(1), p.253-255, 1999.

CORDEIRO, F.D.; MARTINS-FILHO, O.A.; ROCHA, M.O.C.; ADAD, S.J.; CORRÊA-OLIVEIRA, R.; ROMANHA, A.J. Anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin G1 can be a useful tool for diagnosis and prognosis of human Chagas' disease. *Clin. Diag. Lab. Immunol.*, v.1(8), p.112-118, 2001.

COSSIO, P.M.; DIEZ, D.; SZARFMAN, A.; ARANA, R. M. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globin factor which reacts with endocardium and vascular structures. *Circulation*, v.49, p.13-21, 1974.

COSSIO, P.M.; LAGUENS, R.P.; KREUTZER, E.; DIEZ, C.; SEGAL, A.; ARANA, R.M. Chagasic cardiopathy. Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *Am. J. Pathol.* v.86(3), p.533-544, 1977.

COURA, J.R.; ANUNZIATO, N.; WILLCOX, H.P. Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.78(3), p.363-372, 1983.

CUÑA, W.R.; CUÑA, C.R. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* v.90, p.503-507, 1995.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' disease: identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cells clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. *J. Clin. Invest.,* v.98, p.1709-1712, 1996.

CUNHA-NETO, E.; RIZO, L. V.; ALBUQUERQUE, F.; ABEL, L.; GUILHERME, L.; BOCCHI, E.; BACAL, F.; CARRARA, D.; IANNI, B.; MADY, C.; KALIL., J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Braz. J. Med. Biol. Res.* v.31, p.133-137, 1998.

DEPLAZES, P.; SMITH, N.C.; ARNOLD, P.; LUTZ, H.; ECKERT, J. Specific IgG1 and IgG2 antibody responses of dogs to *Leishmania infantum* and other parasites. *Paras. Immunol.* v.17, p.451-458, 1995.

DIAS, J.C.; KLOETZEL, K. The prognostic value of the electrocardiographic features of chronic Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* v.10(3), p.158-162, 1968.

DIAS, J.C.P. Epidemiology of Chagas' disease. In: WENDEL, S.; BRENER, Z.; CAMARGO, M. E.; RASSI, A. *Chagas disease (american trypanosomiasis) : Its Impact on Transfusion And Clinical Medicine.* São Paulo: Ed. ISBT BRAZIL – Sociedade Brasileira Hematologia Hemoterapia, 1992. cap. 5, p.49-80.

DIAS, J.C.P. Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad. Saúde Pública.*, v.16(2), p.43-59, 2000.

DRUILHE, P.; BOUHAROUM-TAYOUN, H. Natural immunities. *Res Immunol.* v.142(8), p.637-643, 1991.

DUTRA, W.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; CANÇADO, J.R.; PINTO-DIAS, J.C.; BRENER, Z.; FREEMAN JUNIOR, G.L.; COLLEY, D.G.; GAZZINELLI, G.; PARRA, J.C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int. Immunol.* v.6(4), p.499-506, 1994.

DUTRA, W.O.; DA LUZ, Z.M.; CANÇADO, J.R.; PEREIRA, M.E.; BRIGIDO-NUNES, R.M.; GALVÃO, L.M.; COLLEY, D.G.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G.; CARVALHO-PARRA, J.F. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Paras. Immunol.* v.18(11), p.579-585, 1996.

DUTRA, W.O.; GOLLOB, K.J.; PINTO-DIAS, J.C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COFFMAN, R.L.; CARVALHO-PARRA, J.F. Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. *Scand. J. Immunol.* v.45(1), p.74-80, 1997.

EKSI, S.; WASSOM, D.L.; POWELL, M.R. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Profiles and compartmentalization of IL-2, 4, 5, 10, and IFN gamma producing cells. *J. Parasitol.*, v.82, p.59-65, 1996.

ELASSAD, A.M.; YOUNIS, S.A.; SIDDIG, M.; GRAYSON, J.; PETERSEN, E.; GHALIB, H.W. The significance of blood levels of IgM, IgA, IgG and IgG subclasses in Sudanese visceral leishmaniasis patients. *Clin. Exp. Immunol.* v.95(2), p.294-299, 1994.

FERREIRA, M.U.; CAMARGO, L.M.; DE CARVALHO, M.E.; NINOMIA, R.T.; GARCIA, L.A.; DOS SANTOS, F.R. Prevalence and levels of IgG and IgM antibodies against *Plasmodium falciparum* and *P. vivax* in blood donors from Rondonia, Brazilian Amazon. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.88(2), p.263-269, 1993.

FERREIRA, M.U.; KIMURA, E.A.; DE SOUZA, J.M.; KATZIN, A.M. The isotype composition and avidity of naturally acquired anti-*Plasmodium falciparum* antibodies: differential patterns in clinically immune Africans and Amazonian patients. *Am. J. Trop. Méd. Hyg.* v.55(3), p.315-323, 1996.

FERREIRA, M.U.; KIMURA, E.A.; KATZIN, A.M.; SANTOS-NETO, L.L.; FERRARI, J.O.; VILLALOBOS, J.M.; DE CARVALHO, M.E. The IgG-subclass distribution of naturally acquired antibodies to *Plasmodium falciparum*, in relation to malaria exposure and severity. *Ann. Trop. Med. Parasitol.* v.92(3), p.245-256, 1998.

FINKELMAN, F.D.; HOLMES, J.; KATONA, I.M. Lymphokine control of in vivo immunoglobulin isotype selection. *Ann. Rev. Immunol.*, v.8, p.303-333, 1990.

FREITAS, JLP; LION, M.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. São Paulo.* v.8, p.81-92, 1953.

GALVÃO, L.M.C.; NUNES, R.M.B.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z.; KRETTLI, A.U. Lytic antibody titre as a means of assessing cure after treatment of Chagas' disease. *Trans. R. Trop. Med. Hyg.*, v.87, p.220-223, 1993.

GARZON, S.A.; LORGA, A.M.; NICOLAU, J.C. Electrocardiography in Chagas' heart disease. *Sao Paulo Med J.* v.113(2), p.802-813, 1995.

GIORDANENGO, L.; FRETES, R.; DIAZ, H.; CANO, R.; BACILE, A.; VOTTERO-CIMA, E.; GEA, S. Cruzipain induces autoimmune response against skeletal muscle and tissue damage in mice. *Muscle Nerve.* v.23(9), p.1407-1413, 2000.

GIRONES, N.; RODRIGUEZ, C.I.; CARRASCO-MARIN, E.; HERNAEZ, R.F.; DE REGO, J.L.; FRESNO, M. Dominant T and B-cell epitopes in an autoantigen linked to Chagas' disease. *J. Clin. Invest.*, v.107, p.985-993, 2001.

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

GOBLE, F.C. Observations on experimental Chagas' disease in dogs. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.1, p.189-204, 1952.

GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M.; ROCHA, M.O.; MARTINS-FILHO, O.A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun.* v.71(3), p.1185-1193, 2003.

GOMES, J.A.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M., ROCHA, M.O., BUSEK, S.C., TEIXEIRA, M.M., SILVA, J.S.; CORREA-OLIVEIRA R. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. *Infect. Immun.* v73(12), p7960-7966, 2005.

GRAUERT, M.R.; HOUDAYER, M.; HONTEBEYRIE-JOSKOWCIZ, M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.* v.93(1), p.85-92, 1993.

GUEDES, P.M.M.; VELOSO, V.M.V.; TAFURI, W.L.; GALVÃO, L.M.C.; CARNEIRO, C.M.; LANA, M.; CHIARI, E.; SOARES, K.A.; BAHIA, M.T. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop.*, v.84, p.9-17, 2002.

GUEDES, P.M.; URBINA, J.A.; LANA, M.; AFONSO, L.C.; VELOSO, V.M.; TAFURI, W.L.; MACHADO-COELHO, G.L.; CHIARI, E.; BAHIA, M.T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* in dog hosts. *Antimicrob. Agents Chemother.* v.48(11), p.4286-4292, 2004.

GUILLEN-PERNIA, B.; LUGO-YARBUH, A.; MORENO, E. Dilatación del tracto digestivo de ratones infectados con *Trypanosoma cruzi*. *Invest. Clin.* v.42, p.195-209, 2001.

GUSMÃO, R.D.; RASSI, A.; RESENDE, J.M.; NEVA, F.A. Specific and non-specific lymphocyte blastogenic responses in individuals infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.33 (5), p.827-834, 1984.

HERNANDEZ-BECERRIL, N.; NAVA, A.; REYES, P.A.; MONTEON, V.M. IgG subclass reactivity to *Trypanosoma cruzi* in chronic chagasic patients. *Arch Cardiol Mex.* v.71(3), p.199-205, 2001.

HIGUCHI, M.L.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTI, G.; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic Chagas' disease myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Archiv. A. Pathol. Anat.*, v.423, p.157-160, 1993.

HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* and myocardial infiltrate in chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.*, v.2, p.101-106, 1993.

HIGUCHI, M.L. O parasita e a patogenia da forma crônica da doença de Chagas. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.64, p.251-254, 1995.

HIGUCHI, M. L. 1999. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines, and microvascular abnormalities. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.94, p.263-267, 1999.

HINDS, L.B.A.; ALEXANDRE-MOREIRA, M.S.; DECOTÉ-RICARDO, D.; NUNES, M.P.; PEÇANHA, L.M.T. Increased immunoglobulin secretion by B lymphocytes from *Trypanosoma cruzi* infected mice after B lymphocytes-natural killer cell interaction. *Paras. Immunol.*, v.23, p.581-586, 2001.

JOHNSON, C.M. Cardiac changes in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am. J. Trop. Med.*, v.18, p.197-206, 1938.

JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.48, p.348-357, 1993.

KAWANO, Y.; NOMA, T.; YATA, J. Regulation of human IgG subclass production by cytokines IFN- γ and IL-6 act antagonistically in the induction of human IgG1 but additively in the induction of IgG2. *J. immunol.*, v.153, p.4948-4958, 1994.

KERNER, N.; LIEGEARD, P.; LEVIN, M.J.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi*: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas' disease cross-react with mammalian cytoskeleton. *Exp. Parasitol.*, v.73, p.451-459, 1991.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clin. Microbiol Rev.*, v.12, p.210-223, 1999.

KOEBERLE, F.; NADOR, E. Etiologia e patogenia do megaesôfago no Brasil. *Rev. Paul. Medicina.* v.47, p.643-661, 1955.

KOEBERLE, F. Patologia da moléstia de Chagas. Estudo dos órgãos musculares ocos. *Rev. Goiana Med.* v.3 (3), p.155-157, 1957.

KOEBERLE F. Cardiopatia chagásica. *O hospital* v.53(3), p.9-50, 1958.

KRAMER JR, A.W. Experimental Chagas disease in purebred Beagle dogs acutely infected with *Trypanosoma cruzi* (B strain). *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* v.(5)14, p.291-300, 1972.

KRAUTZ, G.M.; GALVAO, L.M.; CANCADO, J.R.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; OUAISSI, A.; KRETTLI, A.U. Use of a 24-kilodalton *Trypanosoma cruzi* recombinant protein to monitor cure of human Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* v.33(8), p.2086-2090, 1995.

KRAUTZ, G.M.; KISSINGER, J.C.; KRETTLI, A.U. The targets of the lytic antibody response against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Today* v.16(1), p.31-34, 2000.

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

KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *J. Immunol.* v.129, p.2009-2012, 1982.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L.E.; MACEDO, A. M.; PENA, S.D.; CHIARI, E. Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.65 (5), 435-441, 2001.

LANA, M.; CHIARI, C..A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenece-78 de *Trypanosoma cruzi*, isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.81, p.247-253, 1986.

LANA, M.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V.; BAMBIRRA, E.A.; CHIARI, C..A.; RIOS LEITE, V.H.; BARBOSA, A.J.A.; TOLEDO, M.J.O.; CHIARI, E. Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanossomíase cruzi experimental no cão. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, (3), p.113-121, 1988.

LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L. Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v.87 (1), p.59-71, 1992.

LARANJA, F.S.; PELLEGRINO, J.; DIAS, E. Experimental Chagas' heart disease. *Am. Heart j* v.4, p.646-651, 1949.

LARANJA, F.S. Aspectos clínicos da moléstia de Chagas. *Rev. Bras. Med.* v.10(7), p.482-491, 1953.

LARANJA, F.S.; ANDRADE, Z.A. Chronic cardiac form of chagas disease in dogs. *Arq. Bras. Cardiol.*, v.35 (5), p.377-380, 1980.

LAURICELLA, M.A.; CASTANERA, M.B.; GURTLER, R.E.; SEGURA, E.L. Immunodiagnosis of *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease) infection in naturally infected dogs. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.93(4), p.501-507, 1998.

LEON, J.S.; GODSEL, L.M.; WANG, K.; ENGMAN, D.M. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas heart disease. *Infect. Immun.*, v.69, p.5643-5649, 2001.

LEVIN, M.J.; MESRI, E.; BENAROUS, R.; LEVITUS, G.; SCHIJMAN, A.; LEVY-YEYATI, P.; CHIALE, P.A.; RUIZ, A.M.; KAHN, A.; ROSENBAUM, M.B. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.41, p.530-538, 1989.

LEVIN, M.J.; LEVITUS, G.; KERNER, N.; LAFON, S.; SCHIJMAN, A.; LEVY-YEYATI, P.; FINKIELTEIN, C.; CHIALE, P.; SCHEJTMAN, D.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICS, M. Autoantibodies in Chagas' heart disease: possible markers of severe Chagas' heart complaint. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.85(4), p.539-543, 1990.

LEVIN, M.J.; FRANCO DA SILVA, J.; FRASCH, A.C.C.; CAMARGO, M.E.; LAFON, S. Recombinant *Trypanosoma cruzi* antigens Nd Chagas' disease diagnosis: analysis of a workshop. *Fems Microb. Immunol.* v.89, p.1-9, 1991.

LOPES-BERGAMI, P. Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic. *FASEB J.*, v.15, p.2602-2612, 2001.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W.L.; ALMEIDA, H.O.; ABRAO, D. Heart weight and type of death in the patient with chronic Chagas' disease. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.* v.12(5), p.293-297, 1970.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; ALMEIDA, H.O.; ROCHA, A. Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.9, p.269-282, 1975.

LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.*, v.193, p.265-275, 1951.

MAGNANI, M.A.; FERRIOLLI FILHO, F.; DE SIQUEIRA, A.F. Specific immunoglobulins (IgA, IgG, and IgM) in serum of patients with chronic Chagas' disease analyzed by indirect immunofluorescence reactions *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo*. v.15(2), p.72-75, 1973.

MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALIBERTI, J. C.; MESTRINER, F. L.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J.S. *Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulat.* v.102, p.3003-3008, 2000.

MARQUES DE ARAÚJO, S.M.; CHIARI, E. Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi* in inbred C3H mice *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*. v.83(2), p.175-181, 1988.

MARSDEN, P.D.; HAGSTROM, W.C. *Trypanosoma cruzi* in the saliva of Beagle puppies. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.60(2), p.189-191, 1966.

MARSDEN, P.D.; HAGSTROM, W.C. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Beagle puppies. The effect of variations in the dose and source of infecting trypanosomes and the route of inoculation of the course of the infection. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v.62(6), p.816-824, 1968.

MARTINS-FILHO, O.A.; PEREIRA, M.E.S.; CARVALHO, J.F.; CANÇADO, J.R.; BRENER, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, v.2, p.569-573, 1995.

MARTINS, M.S.; HUDSON, L.; KRETTLI, A.U.; CANCADO, J.R.; BRENER, Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Clin. Exp. Immunol.* v.61(2), p.343-350, 1985.

MEDRANO-MERCADO, N.; LUZ, M.R.; TORRICO, F.; TAPIA, G.; VAN LEUVEN, F.; ARAUJO-JORGE, T.C. Acute-phase proteins and serologic profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.54(2), p.154-161, 1996.

MEIRA, W.S.; GALVAO, L.M.; GONTIJO, E.D.; MACHADO-COELHO, G.L.; NORRIS, K.A.; CHIARI, E. Use of the *Trypanosoma cruzi* recombinant complement regulatory protein to evaluate therapeutic efficacy following treatment of chronic chagasic patients. *J. Clin. Microbiol.* v.42(2), p.707-712, 2004.

MICHAILOWSKY, V.; LUHRS, K.; ROCHA, M.O.; FOUTS, D.; GAZZINELLI, R.T.; MANNING, J.E. Humoral and cellular immune responses to *Trypanosoma cruzi*-derived paraflagellar rod proteins in patients with Chagas' disease. *Infect. Immun.* v.71(6), p.3165-3171, 2003.

MINOPRIO, P.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERT, B.; ANDRADE, L.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand. J. Immunol.* v.28(5), p.553-561, 1988.

MONCAYO, A. Progress towards interruption of transmission of Chagas disease. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.*, v.94 (1), p.401-404, 1999.

MONCAYO, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.98(5), p.577-591, 2003.

MONCAYO, A.; LUQUETTI, A.O. Multicentre double blind study for evaluation of *Trypanosoma cruzi* defined antigens as diagnostic reagents. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.85, p.489-495, 1990.

MONTENEGRO, V.M.; JIMENEZ, M.; DIAS, J.C.; ZELEDON, R. Chagas disease in dogs from endemic areas of Costa Rica. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v.97(4), p.491-494, 2002.

MORGAN, J.; DIAS, J.C.P.; GONTIJO, E.D.; BAHIA-OLIVEIRA, L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; COLLEY, D.G.; POWELL, M.R. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.55, p.355-359, 1996.

MOSMANN, T.R.; COFFMAN, R.L. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu. Rev. Immunol.* v.7, p.145-173, 1989.

MOTRAN, C.C.; SERRA, H.M.; GEA, S.E.; VULLO, C.M.; VOTTERO-CIMA, E. Antibody isotypes profiles against *Trypanosoma cruzi* acidic antigens in two Amerindian populations from a Chagas' disease endemic area. *Acta Trop.* v.58(2), p.105-114, 1994.

NORRIS, K.A.; HARTH, G.; SO, M. Purification of a *Trypanosoma cruzi* membrane glycoprotein which elicits lytic antibodies. *Infect. Immun.* v.57(8), p.2372-2377, 1989.

NORRIS KA, BRADT B, COOPER NR, SO M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *J. Immunol.* v.147(7), p.2240-2247, 1991.

OKUMURA, M.; CORREA NETO, A. Produção experimental de “megas” em animais inoculados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Hosp. Clin.* v.16, p.338-341, 1961.

OUAISSI, M.A. ; TAIBI, A.; LOYENS, M.; MARTIN, U.; AFCHAIN, D.; MAIDANA, C.; CAUDIOTI, C.; CORNETTE, J.; MARTELLEUR, A.; VELGE, P. *Trypanosoma cruzi*: a carbohydrate epitope defined by a monoclonal antibody as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.45(2), p.214-25, 1991.

PERALTA, J.M.; GINEFRA, P.; DIAS, J.C.; MAGALHÃES, J.M.; SZARFMAN, A. Autoantibodies and chronic Chagas's heart disease. *Trans. R. Soc. Trop. Méd. Hyg.* v.75(4), p.568-569, 1981.

PEREIRA, V.R.; DE LORENA, V.M.; GALVAO DA SILVA, A.P.; NAKAZAWA, M.; DA SILVA, E.D.; FERREIRA, A.G.; MONTARROYOS, U.; COUTINHO EDE, M.; GOMES YDE, M. Hematological and histopathological evaluation of BALB/c and C57BL/6 mice exposed to Cytoplasmic Repetitive Antigen and Flagellar Repetitive Antigen recombinant antigens of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Méd. Trop.* v.36(6), p.739-742, 2003.

PELLEGRINO, J. O eletrocardiograma na fase crônica da doença de Chagas experimental no cão. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* v.4, p.615-647, 1946.

PELLEGRINO, J. O eletrocardiograma na doença de Chagas experimental no cão. *Brasil Médico* v.41(33), p.9-11, 1947.

PETRY, K.; EISEN, H. Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today*, v.5, p.111-121, 1989.

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*. *Paras. Immunol.* v.20(10), p.463-471, 1998.

PRATA, S.P.; DA CUNHA, D.F.; DA CUNHA, S.F.; PRATA, S.C.; NOGUEIRA, N. Prevalence of electrocardiographic abnormalities in 2,000 aged and non-aged chagasic patients. *Arq. Bras. Cardiol.* v.60(6), p.369-372, 1993.

RASSI, A. Clínica: Fase aguda. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi e a doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan S.A., 1979. cap. 7, p.249-264.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE, W.C. Chagas' heart disease. *Clin. Cardiol.* v.23(12), p.883-889, 2000.

REED, S.G.; SCOTT, P. T-cell and cytokine responses in leishmaniasis. *Curr. Opin. Immunol.* v.5(4), p.524-31, 1993.

REED, S.G.; BROWNELL, C.E.; RUSSO, D.M.; SILVA, J.S.; GRABSTEIN, K.H.; MORRISSEY, P.J. IL-10 mediates susceptibility in *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, v.153, p.3135-3140, 1994.

REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, J.R.S.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D.G.; MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α^+ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.48(5), p.637-644, 1993.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; AIELLO, V.D.; GUTIERREZ, P.S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, v.83(2), p.165-172, 1997.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.L.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A. Growth factors in the myocardium of patients with chronic *chagasic* cardiomyopathy. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.33 (6), 509-518, 2000.

RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L.; RENIA, L.; FRAGATA-FILHO, A.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M. M. Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase. *Paras. Immunol.* v.22, p.49-53, 2000.

ROCHA, M.O.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Clinical management of chronic Chagas cardiomyopathy. *Front. Biosci.* v.8, p.44-54, 2003.

RODRIGUES, N.; FERREIRA, E.P.; DIAS, J.P. The electrocardiogram in chronic Chagas disease. Study of 100 cases. *Arq. Bras. Cardiol.* v.19(3), p.225-234, 1966.

ROMAGNANI, S. Type 1 T helper and type 2 T helper cells: functions, regulation and role in protection and disease. *Int. J. Clin. Lab. Res.* v.21(2), p.152-158, 1991.

ROWLAND, E.C.; MIKHAIL, K.S.; MCCORMICK, T.S. Isotype determination of anti-*Trypanosoma cruzi* antibody in murine Chagas' disease. *J. Parasitol.*, v.78 (3), p.557-561, 1992.

ROWLAND, E.C.; LUO, H.; MCCORMICK, T. Infection characteristics of an Ecuadorian *Trypanosoma cruzi* strain with reduced virulence. *J. Parasitol.*, v.81, 123-126, 1995.

SA FERREIRA, J.A.; GALVAO-CASTRO, B.; MACEDO, W.; CASTRO, C. Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas' disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. *Clin. Exp. Immunol.* v.52(2), p.266-270, 1983.

SALDANA, A.; SOUSA, O.E. *Trypanosoma rangeli*: epimastigote immunogenicity and cross-reaction with *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.* v.82(2), p.363-366, 1996.

SALGADO, J.A.; GARCEZ, P.M.; OLIVEIRA, C.A.; GALIZZI, J. Revisão clínica atual do primeiro caso humano descrito da doença de Chagas. *Rev. Inst. Méd. Trop. São Paulo.* v. 4, p.330-337, 1962.

SALGADO, J.A. O centenário de Carlos Chagas e a menina Berenice. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.75(1), p.193-195, 1980.

SANTOS, F.R.; PENA, S.D.J.; EPPLEN, J.T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. *Hum. Genet.* v.90, p.655-656, 1993.

SANTOS, R.R.; LAUS, J.L.; MENGEL, J.O.; SAVINO, W. Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in the anti-heart autoreactivity. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.85(3), p.367-369, 1990.

SATO, M.N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E.H.; TANJI, M.M.; KANENO, R.; HIGUCHI, M.L.; DUARTE, A.J.S. CD8⁺ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Infect. Immun.*, v.60, p.1024-1030, 1992.

SCHATTSCHNEIDER, W.; LOPES, E.R.; DE ALENCAR, J.E.; BIENZLE, U.; FELDMEIERS, H. A comparative study of four serological methods for diagnosis of acute and chronic Chagas' disease in Brazilian patients. *Trop. Geogr. Med.* v.44(3), p.210-218, 1992.

SCHMIDT, D.R.; HOGH, B.; ANDERSEN, O.; FUCHS, J.; FLEDELIUS, H.; PETERSEN, E. The national neonatal screening programme for congenital toxoplasmosis in Denmark: results from the initial four years, 1999-2002. *Arch. Dis. Child.* v.91(8), p.661-665, 2006.

SCOTT, M.T.; GOSS-SAMPSON, M. Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. Exp. Immunol.* v.58(2), p.372-379, 1984.

SHADOMY, S.V.; WARING, S.C.; MARTINS-FILHO, O.A.; OLIVEIRA, R.C.; CHAPPELL, C.L. Combined use of enzyme-linked immunosorbent assay and flow cytometry to detect antibodies to *Trypanosoma cruzi* in domestic canines in Texas. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* v.11(2), p.313-319, 2004.

SIGNORELL, L.M.; SEITZ, D.; MERKEL, S.; BERGER, R.; RUDIN, C. Cord blood screening for congenital toxoplasmosis in northwestern Switzerland, 1982-1999. *Pediatr. Infect. Dis. J.* v.25(2), p.123-128, 2006.

SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.*, v.20, p.191-203, 1953.

SOARES, M.B.; SILVA-MOTA, K.N.; LIMA, R.S.; BELLINTANI, M.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. *Am. J. Pathol.* v.159, p.703-709, 2001.

SOLANA, M.E.; KATZIN, A.M.; UMEZAWA, E.S.; MIATELLO, C.S. High specificity of *Trypanosoma cruzi* epimastigote ribonucleoprotein as antigen in serodiagnosis of Chagas' disease. *J. Clin. Microbiol.* v.33(6), p.1456-1460, 1995.

SOSA ESTANI, S.; SEGURA, E.L.; RUIZ, A.M.; VELAZQUEZ, E.; PORCEL, B.M.; YAMPOTIS, C. Efficacy of chemotherapy with benznidazole in children in the indeterminate phase of Chagas' disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.59 (4), p.526-529, 1998.

SOUZA, P.E.; ROCHA, M.O.; ROCHA-VIEIRA, E.; MENEZES, C.A.; CHAVES, A.C.; GOLLOB, K.J.; DUTRA, W.O. Monocytes from patients with indeterminate and cardiac forms of Chagas' disease display distinct phenotypic and functional characteristics associated with morbidity. *Infect. Immun.* v.72(9), p.5283-5291, 2004.

SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; GUILBERT, B.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Anti-Ia treatment modulates specific and polyclonal antibody responses in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J. Autoimmun.* v.2(6), p.791-802, 1989.

SPINELLA, S.; MILON, G.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. A CD4⁺ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response *in vivo*. *Eur. J. Immunol.* v.20(5), p.1045-1051, 1990.

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

STEFANI, M.M.; TAKEHARA, H.A.; MOTA, I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *Immunol. Lett.*, v.7, p.91-97, 1983.

STERIN-BORDA, L.; GIORDANENGO, L.; JOENSEN, L.; GEA, S. Cruzipain induces autoantibodies against cardiac muscarinic acetylcholine receptors. Functional and pathological implications. *Eur. J. Immunol.* v.33(9), p.2459-2468, 2003.

SUN, J.; TARLETON, R.L. Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.48, p.161-169, 1993.

TAFURI, W.L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.19(3), p.405-417, 1970.

TAFURI, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.29, p.194-199, 1987.

TAFURI, W.L.; LANA, M.; CHIARI, E.; CALIARI, M.V.; BAMBIRRA, E.A.; RIOS-LEITE, V.H.; BARBOSA, A.J.A. O cão como modelo experimental para o estudo da História Natural da Doença de Chagas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.21, p.77-82, 1988.

TAKEHARA, H.A.; PERINI, A.; DA SILVA, M.H.; MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp. Parasitol.* v.52(1), p.137-146, 1981.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; BARCELOS, L.S.; GOMES, Y.M.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M. Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic ardiomyopathy. *Clin. Infect. Dis.*, v. 38(7), p. 943-950, 2004a.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; RIBEIRO, A.L.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TEIXEIRA, M.M. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *J. Infect. Dis.* v. 189(2), p. 214-20, 2004b.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; RIBEIRO, A.L.; BORDA, E.; STERIN-BORDA, L.; TEIXEIRA, M.M. Levels of anti-M(2) and anti-beta(1) autoantibodies do not correlate with the degree of heart dysfunction in Chagas' heart disease. *Microbes Infect. In press* 2006.

TARLETON, R.L. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol.* v. 73(1), p. 106-109, 1991.

TARLETON, R.L.; NABORS, G.S. Regulation of cytokine production in Chagas' disease. In *Molecular and Immunological Aspects of Parasitism*. C.C. Wang ed. American Association for the Advancement of Science, Washington, pp. 15-30, 1991.

TARLETON, R.L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect. Immun.*, v.62, p.1820-1829, 1994.

TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *T. Parasitol.* v.18, p.262-265, 2002.

TIBBETTS, R.S.; MCCORMICK, T.S.; ROWLAND, E.C.; MILLER, S.D.; ENGMAN, D.M. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Immunol.*, v.152, p.1493-1499, 1994.

TOSTE JÚNIOR, S.; LOPES, E.R.; LIMA PEREIRA, F.E.; CHAPADEIRO, E. Miocardite chagásica crônica humana: Estudo quantitativo dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no exsudato inflamatório. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, v.27, p.127-134, 1994.

UMEZAWA, E.S.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; GRUBER, A.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; ZINGALES, B. *Trypanosoma cruzi* defined antigens in the serological evaluation of an outbreak of acute Chagas disease in Brazil (Catole do Rocha, Paraíba). *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* v.91(1), p.87-93, 1996.

UMEZAWA, E.U.; LEVY, A.M.A.; GALVÃO, L.M.C.; GOMES, L.M.; SHIKANAI-YASUDA, M.A.; LUQUETTI, A.O. (1999). O papel da sorologia em pacientes chagásicos submetidos à quimioterapia anti-*Trypanosoma cruzi*. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* v.32 (II), p.80, 1999.

VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P.; ANDRADE, L.O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M.C.; SIMPSON, A.J.G.; TOSTES, S.; PENA, S.D.J. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *Am. J. Pathol.*, v.149, p.2153-2159, 1996.

VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES, S. J.R.; MOREIRA, M.C.; FILHO, G.B.; PENA, S.D. Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *Am. J. Pathol.*, v.156(5), p.1805-1809, 2000.

VANDEKERCKHOVE, F.; DARJI, A.; RIVERA, M.T; CARLIER, Y.; VRAY, B.; BILLIAU, A.; DE BAETSELIER, P. Modulation of T-cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection: analysis in different lymphoid compartments. *Paras. Immunol.*, v. 16, p.77 85, 1994.

VITOR, R.W.; CHIARI, E. Evaluation of *Trypanosoma cruzi* antigens for the indirect hemagglutination reaction. II. Antigens of different samplings and evolutive forms. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, v.29(3), p.183-188, 1987.

VOLLER, A.; BIDWELL, D.E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. *Bull. W.H.O.*, v.53, p.55-65, 1976.

VOS, Q.; ORTALDO, J.R.; CONAN-CIBOTTI, M. Phenotypic and functional characterization of a panel of cytotoxic murine NK cell clones that are heterogeneous in their enhancement of ig secretion *in vitro*. *Int. Immunol.*, v.10, p.1093-1101, 1998.

WILLIAMS, D.L. Studies of canine leucocyte antigens: a significant advance in canine immunology. *Veter. J.*, v.153, p.31-39, 1997.

WAGHABI, M.C.; COUTINHO, C.M.; SOEIRO, M.N.; PEREIRA, M.C.; FEIGE, J.J.; KERAMIDAS, M.; COSSON, A.; MINOPRIO, P.; VAN LEUVEN, F.; ARAUJO-JORGE, T.C. Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin. *Infect. Immun.* v.70(9), p.5115-5123, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the scientific working group on the development and evaluation of animal models for Chagas' disease. *World Health Organization Tech. Rep. Ser.*, Geneva, 1984.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas disease. *World Health Organization Tech. Rep. Ser.*, v.811, p.1-91, 1991.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of Chagas' disease. Second Report of the WHO Expert Committee. *WHO Technical Report Series*. 905, Geneva, 109p, 2002.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tropical Disease Research: progress 2003-2004 Seventeenth Programme Report of the UNICEF/UNDP/World Bank/WHO. Special Programme for Research & Training in Tropical Diseases. Programme Report n.17, Geneva, 2005.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and T helper type 2 cytokine production, *Europ. J. Immunol.*, v.26, p.102-109, 1996.

ZELEDON, R.; SOLANO, G.; BURSTIN, L.; SWARTZWELDER, J.C. Epidemiological pattern of Chagas' disease in an endemic area of Costa Rica. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* v.24(2), p.214-225, 1975.