Cláudio Romero Farias Marinho

A INFECÇÃO MURINA PELO CLONE SYLVIO X10/4 DE
Trypanosoma cruzi: UM MODELO PARA ESTUDO DA
PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS CRÔNICA

Tese apresentada ao Instituto de Ciências Biomédicas da
Universidade de São Paulo, para obtenção do título de
Doutor em Ciências (Imunologia)

SÃO PAULO

2003

DADOS DE CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)
Serviço de Biblioteca e Informação Biomédica do
Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Marinho, Claudio Romero Farias.

A infecção murina pelo clone Sylvio X10/4 de *Trypanosoma cruzi*: um modelo para estudo da patogenia da doença de Chagas crônica / Claudio Romero Farias Marinho. -- São Paulo, 2003.

Tese (Doutorado) -- Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo. Departamento de Imunologia.

Área de concentração: Imunologia.

Linha de pesquisa: Imunologia da doença de Chagas.

Orientador: Alvarez-Mosig, Jose Maria.

Versão do título para o inglês: The murine infection with the clone Sylvio X10/4 of *Trypanosoma cruzi*: a model to study the pathogenesis of chronic Chagas' disease.

Descritores: 1. Doença de Chagas 2. *Trypanosoma cruzi* 3. Patologia 4. Clone Sylvio X10/4 5. Genética 6. Linhagens isogênicas (A/J e C3H/HePAS)

ICB/SBIB222/2003

Candidato(a): Claudio Romero Farias Marinho.

Título da Tese: A infecção murina pelo clone Sylvio X10/4 de *Trypanosoma cruzi*: um modelo para estudo da patogenia da doença de Chagas crônica.

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Tese de Doutorado, em sessão pública realizada a/...../....., considerou o(a) candidato(a):

() **Aprovado(a)**

() **Reprovado(a)**

1) Examinador(a) _____

2) Examinador(a) _____

3) Examinador(a) _____

4) Examinador(a) _____

5) Presidente _____

1. ABREVIATURAS	6
2. RESUMO	9
3. INTRODUÇÃO	11
3.1 O ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	12
3.2 A patologia	13
3.3 O sistema imune na infecção pelo <i>T. cruzi</i>	14
3.3.1 Mecanismos de invasão	14
3.3.2 Mecanismos naturais de resistência	15
3.3.3 A resposta imune humoral	17
3.3.4 A resposta imune celular	20
3.3.5 As citocinas	22
3.3.6 Ação das quimiocinas	29
3.3.7 Mecanismos de patogênese	31
3.3.8 A cepa Sylvio-X10/4 do <i>T. cruzi</i>	34
3.3.9 Fatores genéticos da infecção pelo <i>T. cruzi</i>	35
3.3.10 Análise de loci de características quantitativas (QTLs) e mapeamento genético	37
4. OBJETIVOS	42
5. MATERIAIS E MÉTODOS	44
5.1 Abordagem experimental	45
5.2 Animais	45
5.3 Manutenção da cepa de <i>T. cruzi</i>	46
5.4 Infecção	46
5.5 Avaliação das parasitemias na fase aguda	46
5.6 Avaliação das parasitemias na fase crônica	46
5.7 Obtenção de formas tripomastigotas de cultura e preparo de antígeno de <i>T. cruzi</i>	47
5.8 Dosagem de anticorpos anti- <i>t. cruzi</i>	47
5.9 Histopatologia	48
5.10 Meios de cultura	49
5.11 Isolamento de leucócitos sanguíneos	49
5.12 Isolamento de leucócitos cardíacos	49
5.13 Isolamento de leucócitos intra-hepáticos	50
5.14 Anticorpos e conjugados fluorescentes	51
5.15 Citometria de fluxo (FACS)	51
5.16 Extração de RNA mensageiro e conversão para cDNA	52
5.17 Quantificação de RNAm por PCR em tempo real (Real Time PCR)	53
5.18 Extração de DNA genômico	54
5.19 Análise dos marcadores genômicos	54
5.20 Análise estatística	55
6. RESULTADOS	56
6.1 ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL	57

6.2 ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS, PARASITOLÓGICOS E CURVA DE MORTALIDADE EM CAMUNDONGOS CRÔNICOS DE DIFERENTES LINHAGENS ISOGÊNICAS	57
6.2.1 Histopatologia do coração, fígado e músculo esquelético em camundongos cronicamente infectados com cepa Sylvio-X10/4	58
6.2.2 Taxa de mortalidade nos camundongos C3H/HePAS e A/J cronicamente infectados	65
6.2.3 Avaliação da carga parasitária na fase aguda e crônica da infecção.....	65
6.3 ESTUDOS IMUNOLÓGICOS.....	67
6.3.1 Caracterização das diferentes populações linfocitárias no coração de camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados	67
6.3.2 Expressão de RNAm para quimiocinas no coração de animais C3H/HePAS cronicamente infectados.....	68
6.3.3 Expressão de RNAm para quimiocinas no fígado de animais A/J cronicamente infectados	70
6.3.4 Análise das populações de leucócitos intra-hepáticos de camundongos cronicamente infectados e o comportamento do fígado do animal crônico após o desafio com o <i>T. cruzi</i>	75
6.3.5 Estudo das citocinas na infecção pela cepa Sylvio-X10/4 de <i>T. cruzi</i>	86
6.4 ESTUDO GENÉTICO	91
6.4.1 Análise histopatológica dos camundongos F ₁ (A/J x C3H/HePAS) e F ₂ (A/J x C3H/HePAS).. ..	91
6.4.2 Análise multiparamétrica dos fatores dependentes do hospedeiro	95
6.4.3 Detecção e localização de <i>loci</i> de características quantitativas (QTLs) envolvidos na patologia cardíaca de camundongos cronicamente infectados pelo <i>T. cruzi</i> Sylvio X10/4.....	98
7. DISCUSSÃO	100
8. CONCLUSÕES	114
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	116
10. ABSTRACT	146
11. ANEXOS	148
11.1 Anexo 1: Pathology affects different organs in two mouse strains chronically infected by a <i>Trypanosoma cruzi</i> clone: A model for genetic studies in Chagas' disease. CLAUDIO R.F. MARINHO, DANIELLA Z. BUCCI, MARIA LÚCIA Z. DAGLI, KARINA R.B. BASTOS, MARCOS G. GRISOTTO, LUIZ R. SARDINHA, CRISTIANE R.G.M. BAPTISTA, CARLOS PENHA GONÇALVES, MARIA REGINA D'IMPÉRIO LIMA AND JOSÉ M. ÁLVAREZ.....	149
11.2 Anexo 2: Challenge of <i>T. cruzi</i> chronically-infected mice with trypomastigotes activates the immune system and reduces sub-patent parasitemia levels. CLAUDIO R.F. MARINHO, KARINA R.B. BASTOS, LUIZ R. SARDINHA, MARCOS G. GRISOTTO, MARIA REGINA D'IMPÉRIO LIMA AND JOSÉ M. ÁLVAREZ.....	149

1. ABREVIATURAS

ADCC - Citotoxicidade celular dependente de anticorpos (*Antibody-dependent cell cytotoxicity*)

BSA - Albumina sérica bovina (*Bovine serum albumin*)

C3,C4,C5 - Componentes 3,4 e 5 do sistema complemento

CCR 3- (*Human eotaxin-receptor CCR3*)

CD - Grupos de diferenciação (*Cluster of differentiation*)

ConA - Concanavalina A (*Concanavalin A*)

CR - Receptor de complemento (*Complement receptor*)

Cy- (*Cy-chrome*)

DEPC - Diethyl pyrocarbonate

DMEM – (*Dulbecco's modified eagle médium*)

ELISA - Ensaio imunoenzimático (*Enzyme-linked immunoabsorbent assay*)

FACS - Separador de células fluorescentes (*Fluorescence-activated cell sorter*)

Fc - Fragmento cristalizável (*Fragment cristalizável*)

FCS - Soro fetal bovino (*Fetal calf serum*)

FITC - Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein Isothiocyanate*)

FSC - Parâmetro de tamanho (*Forward scatter*)

GM-CSF - Fator estimulante de colônias de macrófagos e granulócitos (*Granulocyte-macrophage colony stimulant factor*)

H₂O₂ - Água Oxigenada

i.p. - Intraperitoneal

IFN_γ - Interferon gama

Ig - Imunoglobulina

IL - Interleucina

iNOS – (*Inducible nitric oxide sintase*)

IP-10 – (*Interferon-inducible protein 10*)

KO - (*Knock out*)

LIT - (*Liver infusion tryptose*)

L-NMMA - L-N-monometil arginina

LPS - Lipopolissacarídeo (*Lipopolysaccharide*)

MCP-1 - Proteína quimiotática para monócitos-1 (*Monocyte chemoattractant protein-1*)

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal (*Major histocompatibility complex*)

MIG – (*Monokine induced by interferon- γ*)

Min. - Minutos

MIP – (*Macrophage inflammatory protein*)

NK - Citotóxica natural (*Natural killer*)

NKT - Citotóxica natural T (*Natural killer T*)

NO - Óxido nítrico (*Nitric oxide*)

OMS - Organização Mundial da Saúde

OPD - o-Fenilenodiamina (*o-Phenylenediamine*)

p/v - peso por volume

PBS - Salina tamponada com fosfato (*Phosphate buffered saline*)

PCR - “Polymerase Chain Reaction”

PE - Ficoeritrina (*Phycoerythrin*)

QTL – (*Quantitative trait locus*)

RANTES – (*Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted*)

SBF - Soro bovino fetal

SNC - Sistema Nervoso Central

SSC - Parâmetro de granulocidade (*Side scatter*)

TCR - Receptor de linfócitos T (*T cell receptor*)

TGF β - Fator indutor de crescimento (*Transforming growth factor β*)

Th - Linfócito T auxiliador (*Lymphocyte T helper*)

TNF - Fator de necrose tumoral (*Tumor necrosis factor*)

TNF α - Fator de Necrose Tumoral α (*Tumor Necrosis Factor α*)

U – Unidade

2. RESUMO

Este trabalho descreve um novo modelo murino para o estudo da infecção crônica pelo *T. cruzi* usando o clone Sylvio-X10/4. A infecção crônica de camundongos C3H/HePAS é caracterizada por intensas lesões inflamatórias no coração que podem ser comparáveis às observadas na doença de Chagas humana. Lesões moderadas também estavam presente na musculatura estriada esquelética desses animais. No coração dos animais crônicos foram detectados parasitas viáveis, confirmando a hipótese de que o desenvolvimento da patologia cardíaca na doença de Chagas está diretamente relacionada com a persistência do *T. cruzi* no tecido inflamado. Em contraste, camundongos A/J cronicamente infectados desenvolvem lesões no fígado e no músculo esquelético, enquanto que no coração, não foram observados lesões nem parasitas. A análise fenotípica das gerações F₁ e F₂ (A/J X C3H/HePAS) sugere que a predisposição genética para desenvolver lesões teciduais na infecção pelo *T. cruzi* é heterogênea uma vez que a patologia no coração e no fígado é segregada na geração F₂. Nossos resultados corroboram a hipótese que a heterogeneidade na patologia observada em pacientes com a doença de Chagas (ausência ou presença de lesões cardíacas ou digestivas) pode ser atribuída a fatores genéticos.

3. INTRODUÇÃO

A doença de Chagas endêmica na América Latina, foi descoberta em 1909 por Carlos Chagas (CHAGAS, 1909). A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que cerca de 20 milhões de pessoas estejam infectadas pelo *Trypanosoma cruzi*, o agente etiológico desta doença, em dezoito países latino-americanos, com cerca de 90 milhões ainda expostas ao risco de infecção (WHO, 2002).

No Brasil, a doença afeta principalmente zonas rurais. No entanto, ela tem se tornado cada vez mais um fenômeno urbano devido às migrações de populações por fatores sócio-econômicos, transmissões congênitas ou transfusionais. Esta doença continua ainda tendo um grande impacto social, que se reflete em elevados custos médico-hospitalares e taxas de aposentadoria precoce que ocorrem como consequência direta da infecção pelo parasita (TEIXEIRA, 1987).

3.1 O ciclo evolutivo do *T. cruzi*.

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado da família Trypanosomatidae que tem um ciclo de vida digenético, envolvendo estágios morfo e fisiologicamente distintos, tanto no hospedeiro vertebrado, como nos insetos hematófagos, membros da sub-família *Triatominae*. O inseto vetor, ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, defeca nas proximidades da picada podendo transmitir através da pele lesada ou das mucosas íntegras as formas tripomastigotas metacíclicas infectantes. Estas formas parasitam diferentes tipos de células, principalmente fagócitos mononucleares, fibras musculares e fibroblastos. Ao penetrar no citoplasma destas células o parasita transforma-se na forma amastigota que se reproduz por divisão binária. Posteriormente, as amastigotas transformam-se em tripomastigotas que são liberadas, alcançando a circulação e disseminando a infecção. Os tripomastigotas sanguíneos podem ser ingeridos pelo inseto vetor onde, no lúmen do trato digestivo, transformam-se nas formas epimastigotas. Estas formas multiplicam-se no tubo digestivo do inseto, diferenciando-se na sua porção terminal em tripomastigotas metacíclicos que

podem ser transmitidos ao hospedeiro vertebrado fechando assim, seu ciclo de vida (BRENER & ANDRADE, 1987, REY, 1991, RUPPERT & BARNES, 1994).

3.2 A patologia

Com base nas características clínicas, três fases da infecção têm sido descritas: aguda, indeterminada e crônica. A fase aguda pode durar de 3 a 4 meses, muitas vezes totalmente assintomática para adultos a despeito da presença de parasitas circulantes no sangue. Sinais clínicos como reação inflamatória local na porta de entrada do parasita (chagoma de inoculação, sinal de Romaña), febre, esplenomegalia e miocardite são encontrados com maior frequência em crianças e raramente em adultos. As alterações histopatológicas observadas no miocárdio durante esta fase, incluem a presença de infiltrado inflamatório, miocardite degenerativa, formação de cistos, além de destruição neuronal que tem sido relacionada a danos teciduais provocados tanto pelo parasita, quanto pela resposta imune. Essas alterações podem ser determinantes na severidade dos sintomas apresentados mais tarde durante a fase crônica (ANSELMi & MOLEIRO, 1972). Estima-se que 5 a 10% dos casos agudos não tratados são fatais, sobretudo em crianças.

À medida que a resposta imune progride e a parasitemia é controlada, as alterações cardíacas retornam ao normal e os infiltrados inflamatórios tendem a regredir. Assim, a doença evolui para a fase indeterminada, onde o indivíduo não apresenta nenhum tipo de manifestação clínica e na qual os parasitas só podem ser detectados por xenodiagnóstico, hemocultura, e mais recentemente, pela amplificação enzimática do DNA do parasito (BRENER, 1980, BRENER & ANDRADE, 1987, GUHL et al., 2002).

A fase indeterminada pode persistir por toda a vida do indivíduo. Entretanto, cerca de 30% dos pacientes infectados vêm a desenvolver a síndrome característica da fase crônica, caracterizada pelo aparecimento das manifestações cardíacas e/ou digestivas. As alterações nesta fase podem incluir redução da função cardíaca com dilatação das câmaras e alterações eletrocardiográficas

(BRENER & ANDRADE, 1987). As anormalidades digestivas manifestam-se pela dilatação principalmente do cólon e do esôfago, como consequência da desnervação de células ganglionares do plexo mesentérico (EARLAM, 1972, CAMPOS & TAFURI, 1973).

Até o presente momento, não se conhecem relatos de cura espontânea na doença de Chagas, isto é, não há evidências de que se desenvolva uma imunidade esterilizante que leve a total eliminação do parasita. Quanto à quimioterapia específica, existem apenas duas drogas que são parcialmente eficazes contra o parasita: o Nifurtimox e o Benzonidazol (CERECETTO & GONZALEZ, 2002). A eficácia do tratamento é maior quando estas drogas são administradas logo após a infecção; no entanto, elas parecem ser menos ativas em estágios avançados da doença, além de serem tóxicas e totalmente ineficazes contra determinadas cepas do parasita (CANÇADO & CHUSTER, 1985).

3.3 O sistema imune na infecção pelo *T. cruzi*

3.3.1 Mecanismos de invasão

Os mecanismos utilizados pelo parasita para invadir as células do hospedeiro ainda não estão totalmente esclarecidos. Vários elementos parecem estar envolvidos. A cruzipaina, uma importante cisteíno-protease presente na membrana do parasita, ao ativar a cascata das cininas (LIMA et al., 2002) promove uma sinalização celular que resulta em um aumento da penetração e colonização intracelular pelo *T. cruzi*. A trans-sialidase, enzima do parasita que promove a captação do ácido siálico a partir de substratos do hospedeiro, parece ser também importante no processo de invasão celular, uma vez que a penetração depende da presença de resíduos de ácido siálico na superfície do *T. cruzi* (COLLI, 1993, BURLEIGH & ANDREWS, 1995, FRANCHIN et al., 1997). Finalmente, o aumento drástico da invasão celular pelo *T. cruzi* que acontece na presença de TGF- β , junto ao baixo nível de colonização na ausência de receptores para esta citocina, sugere um papel fundamental para o TGF- β no

processo de invasão (MING et al., 1995). Por outro lado, o fato dos tripomastigotas ficarem recobertos por iC3b na presença de complemento é considerado importante para a penetração do parasita em células mononucleares fagocíticas CR3 positivas (KRETTLI & PONTES DE CARVALHO, 1979, TANOWITZ et al., 1992).

3.3.2 Mecanismos naturais de resistência

Na doença de Chagas os mecanismos de resistência natural do hospedeiro não são totalmente eficazes no controle da infecção, necessitando da cooperação do sistema linfocitário para a destruição dos parasitas.

Os diferentes estágios evolutivos do *T. cruzi* têm capacidade variada de ativar o **sistema complemento**, diferindo na suscetibilidade à lise pelo mesmo. As formas epimastigotas encontradas no inseto vetor ou provenientes de cultura são altamente sensíveis à lise pelo complemento, enquanto as formas tripomastigotas e amastigotas são resistentes (BUDZKO et al., 1975, KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976, KIERSZENBAUM & LIMA, 1983, KIPNIS et al., 1985).

Apesar da ativação do complemento não prosseguir até a formação do complexo de ataque à membrana com a conseqüente lise do parasita, os tripomastigotas ficam recobertos de iC3b. Como citado acima, o depósito destas moléculas auxilia o parasita na penetração em células mononucleares fagocíticas que possuem receptores CR3 (KRETTLI & PONTES DE CARVALHO, 1979, TANOWITZ et al., 1992).

A participação do complemento na lise de tripomastigotas mediada por anticorpos parece não ter um papel fundamental *in vivo*, uma vez que a parasitemia e a patologia, assim como o “clearance” do *T. cruzi* do sangue, não são alterados em animais deficientes de C5 ou C4 (DALMASSO & JARVINEN, 1980, UMEKITA & MOTA, 2000). O sistema complemento parece ter, entretanto, uma função importante no controle da infecção pelo *T. cruzi* provavelmente devido à sua capacidade opsonizadora, uma vez que, animais depletados de C3 pelo

tratamento com o CVF (fator de veneno de cobra) têm um agravamento da infecção (BUDZKO et al., 1975).

As células do **Sistema Fagocítico Mononuclear** (monócitos e macrófagos) são fundamentais no controle do parasita no sangue e nos tecidos. Entretanto, elas podem desempenhar um papel duplo na infecção pelo *T. cruzi*, ora servindo como células efectoras da resposta imune frente ao parasita, ora como células hospedeiras responsáveis pela multiplicação e diferenciação do mesmo (COHN, 1978, NOGUEIRA et al., 1982). Entretanto, é inegável o fato de que a fagocitose por estas células tem uma certa capacidade de limitar a replicação do parasita. A administração de partículas de sílica (composto seletivamente tóxico para macrófagos) no início da infecção, para camundongos infectados com *T. cruzi*, aumenta acentuadamente a parasitemia e a mortalidade dos animais (KIERSENBAUM et al., 1974). Apesar deste fato, a fagocitose não parece ser um mecanismo suficientemente eficiente para a destruição dos parasitas, uma vez que, quando fagocitados, muitos conseguem passar para o citoplasma, onde diferenciam-se em amastigotas possibilitando a sua perpetuação (ALCANTARA & BRENER, 1978). Por outro lado, como veremos mais adiante, após a ativação linfocitária, os macrófagos tornam-se elementos fundamentais no controle do parasita mediando a destruição intracelular destes.

As **células NK** (do inglês, Natural Killer) parecem ter um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*. Um aumento precoce e significativo da atividade das células NK tem sido reportado em animais infectados com *T. cruzi*. HATCHER & KUHN (1982) foram os primeiros a demonstrar em ensaios *in vitro* a participação efetiva das células NK na destruição de epimastigotas e tripomastigotas. CARDILLO et al. (1996) sugeriram que nos estágios iniciais da infecção, as células NK, através da produção de interferon- γ (IFN- γ), promoveriam a ativação de macrófagos para a destruição intracelular do parasita. Assim, as células NK seriam as principais produtoras de IFN- γ nesta fase da infecção, processo este provavelmente dependente da produção de interleucina 12 (IL-12) pelos macrófagos (ALIBERTI et al., 1996, GALVAO DA SILVA & DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, 2001). Este aumento na atividade de células NK no início da

infecção pode contribuir para a limitação da replicação do parasita até o estabelecimento da resposta imune específica (UNE et al., 2000). As células NK representam uma importante ponte entre a imunidade inata, que opera com limitada especificidade e eficiência, e a imunidade específica, caracterizada pela seleção clonal e a expansão de linfócitos específicos para o antígeno (KOS & ENGLEMAN, 1996).

3.3.3 A resposta imune humoral

Os **anticorpos específicos** têm um papel fundamental na defesa do hospedeiro vertebrado contra o *T. cruzi* pelo seu papel efetor frente às formas tripomastigotas circulantes e tissulares. Eles são em grande parte responsáveis pelo controle da parasitemia no fim da fase aguda e pela manutenção de baixos níveis de parasitas circulantes durante as fases indeterminada e crônica.

Destaca-se a participação dos anticorpos em diversos processos efetores contra o parasita. Dentre eles, pode-se citar:

i) remoção, por macrófagos e outras células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), dos tripomastigotas recobertos por anticorpos e complemento, do sangue, processo que pode resultar na destruição dos parasitas intracelulares (ALCANTARA & BRENER, 1978).

ii) opsonização e destruição dos parasitas nos tecidos, mediada por polimorfonucleares (PMN) ou macrófagos (ALCANTARA & BRENER, 1978, KIPNIS et al., 1981).

iii) destruição dos parasitas nos tecidos, por citotoxicidade dependente de anticorpos (ADCC) mediada por diversos elementos celulares tais como células NK, eosinófilos, neutrófilos e mastócitos (ABRAHAMSOHN & SILVA, 1977, KIERSZENBAUM & HAYES, 1980, KIPNIS et al., 1981, TAMBOURGI et al., 1989).

iv) controle do *T. cruzi* por plaquetas que destroem parasitas sanguícolas opsonizados por anticorpos e complemento (UMEKITA & MOTA, 1989).

Reforçando a importância da resposta imune humoral frente à infecção, KIERSZENBAUM & HOWARD (1976), utilizando camundongos Biozzi maus e bons produtores de anticorpos, observaram uma correlação inversa entre a capacidade de produção de anticorpos e a suscetibilidade à infecção por *T. cruzi*. Posteriormente, foi mostrado que injeções neonatais de anticorpos anti-cadeia μ , que resultam na eliminação das células B, promovem um aumento de suscetibilidade na fase aguda (RODRIGUEZ et al., 1981).

Atualmente, existe o consenso de que os anticorpos protetores são imunoglobulinas (Ig) pertencentes à classe IgG (TAKEHARA et al., 1981, SCOTT & GOSS-SAMPSON, 1984). Em experimentos de transferência passiva em camundongos, a atividade protetora está associada principalmente aos anticorpos das subclasses IgG2a e IgG2b (TAKEHARA et al., 1981). Estes isótipos são considerados mais efetivos contra o parasita, uma vez que, dentre as diferentes subclasses de IgG, são os que têm uma maior capacidade de ativar o sistema complemento após a sua ligação com o antígeno. Além do mais, são aqueles que interagem com maior afinidade com os receptores para Fc (FcR), facilitando desta maneira, a sua ingestão por macrófagos (KLAUS et al., 1979, STEFANI et al., 1983).

Durante a infecção aguda murina pelo *T. cruzi* observa-se uma **ativação policlonal** dos linfócitos que se prolonga até a fase crônica (MINOPRIO et al., 1989). Esta ativação é caracterizada por uma expansão e diferenciação maciça dos linfócitos T e B, com hipergamaglobulinemia (ORTIZ-ORTIZ et al., 1980, D'IMPERIO LIMA et al., 1985, D'IMPERIO LIMA et al., 1986, MINOPRIO et al., 1986); sendo a IgG2a ou a IgG2b os isótipos predominantes (SCOTT & GOSS-SAMPSON, 1984, MINOPRIO et al., 1986, SPINELLA et al., 1992). A ativação policlonal é caracterizada pelo predomínio de uma resposta não específica frente ao parasita (MINOPRIO et al., 1988, SPINELLA et al., 1992), que é acompanhada por imunossupressão das respostas humorais e celulares contra antígenos heterólogos e homólogos (ROWLAND & KUHN, 1978, TEIXEIRA et al., 1978, CUNNINGHAM & KUHN, 1980, REED et al., 1983, MINOPRIO et al., 1989). MINOPRIO et al.(1989) sugeriram que a ativação policlonal pode desempenhar

um papel importante no estabelecimento da patologia da doença de Chagas, uma vez que a expansão linfocitária inclui clones autorreativos, determinando a produção de autoanticorpos. Assim, tanto no soro do homem quanto no do camundongo infectado pelo *T. cruzi*, são detectados autoanticorpos contra componentes próprios tais como estruturas cardíacas e vasculares, (GEA et al., 1990, LAGUENS et al., 1991, TIBBETTS et al., 1994) laminina (em humanos), (TOWBIN et al., 1987, GAZZINELLI et al., 1988, MILEI et al., 1993), estruturas nervosas (WOOD et al., 1982, GEA et al., 1993), receptores adrenérgicos (STERIN-BORDA et al., 1988), miosina (CUNHA-NETO et al., 1995), actina, tubulina, mioglobina, DNA (TERNYNCK et al., 1990) e proteína ribossomal P (SKEIKY et al., 1993).

A ativação policlonal tem sido apontada como um importante mecanismo de evasão do sistema imunológico utilizado pelo *T. cruzi* (MINOPRIO et al., 1988); a redução da sua intensidade se correlaciona com aumento de resistência à infecção e diminuição da cardiopatia em modelos murinos (REINA-SAN-MARTIN et al., 2000, MINOPRIO, 2001). Entretanto, até pouco tempo atrás; os fatores responsáveis pela ativação policlonal eram desconhecidos. Apenas recentemente identificou-se na superfície do *T. cruzi* uma proteína responsável pela ativação policlonal; trata-se de uma enzima prolina racemase, chamada TcPa45, que possui uma potente atividade mitogênica para células B (REINA-SAN-MARTIN et al., 2000, CHAMOND et al., 2002).

Minóprio et al. (2001) utilizando uma vacina de DNA contendo o gene TcPa45, conseguiram uma diminuição de 85% da parasitemia nos camundongos vacinados depois do desafio com formas infectantes do parasita. Os mesmos autores também demonstraram que a injeção de doses sub-mitogênicas da proteína recombinante foi também capaz de diminuir 95% da parasitemia após o desafio, mostrando desta maneira que ambos os protocolos de imunização são capazes de induzir uma intensa produção de anticorpos neutralizantes anti-rTcPa45. Ao se considerar o grau de distúrbios imunológicos provocados pela ativação policlonal, a indução de uma resposta imune específica contra a TcPa45 e a conseqüente neutralização de sua atividade enzimática pode ser uma

importante estratégia para o delineamento de uma vacina contra o *T. cruzi* (MINOPRIO, 2001).

3.3.4 A resposta imune celular

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são fundamentais no estabelecimento da resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. Camundongos deficientes de células TCD4⁺, TCD8⁺ ou ambas, quando infectados pelo *T. cruzi*, revelam uma suscetibilidade aumentada à infecção. A depleção destas populações celulares induzem nos animais altos níveis de parasitemia e mortalidade (RUSSO et al., 1988, ARAUJO, 1989, TARLETON, 1990, TANOWITZ et al., 1992, ROTTENBERG et al., 1993, ROTTENBERG et al., 1995, RUSSO et al., 1996).

RUSSO et al.(1988) observaram que, em camundongos, a depleção de linfócitos T CD4⁺, através do tratamento com anticorpos monoclonais durante a fase aguda, claramente inibia as atividades dependentes das mesmas, como ativação de macrófagos peritoneais e de linfócitos B. Nesses animais, o número de parasitas encontrados no sangue e nos tecidos aumentou, enquanto que o número de infiltrados inflamatórios no coração diminuiu. Posteriormente, estes resultados foram confirmados por ROTTEMBERG et al. (1995) utilizando-se camundongos deficientes de linfócitos T CD4⁺.

De forma análoga, TARLETON (1990) demonstrou que animais depletados de células TCD8⁺, previamente à infecção, tornavam-se altamente suscetíveis na fase aguda da doença. Entretanto, quando esta depleção ocorria na fase crônica, os grupos experimentais tinham índices de sobrevida semelhantes aos do controle e não sofriam agravamento da parasitemia, sugerindo que as células TCD8⁺ são fundamentais no controle da infecção aguda, mas não na manutenção da imunidade na fase crônica. Posteriormente, o papel dessas células na fase aguda foi confirmado, pelo mesmo autor, em animais deficientes de β 2-microglobulina que não possuem células TCD8⁺ (TARLETON et al., 1992).

ROTTEMBERG et al. (1995) utilizando animais deficientes de linfócitos T CD4⁺, CD8⁺, ou de ambas populações, demonstraram que apenas os animais

deficientes de células TCD4⁺ são incapazes de controlar o parasita no coração. Posteriormente, foi proposto por RUSSO et al. (1996) que o controle exercido por estas populações celulares pode ser diferente, dependendo do órgão parasitado. Desta maneira, células TCD4⁺ estariam envolvidas no controle da infecção no coração, enquanto que ambas as populações participariam no controle do parasita no fígado. Os autores justificaram o não envolvimento das células TCD8⁺ no controle do parasitismo cardíaco em função de uma eventual baixa expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (CPH) classe I pelos cardiomiócitos (BERAH et al., 1970). Entretanto, TARLETON & ZHANG (1996) mostraram que células TCD8⁺ estão presentes nas lesões cardíacas da fase crônica. Nestas lesões foi detectado um aumento da expressão de moléculas do CPH classe I e II, assim como a presença de linfocinas inflamatórias e antiinflamatórias. Esses autores também observaram que o grupo de citocinas produzidas no local da lesão é diferente daquele encontrado nos órgãos linfóides, não havendo associação entre um grupo particular de linfocinas e o desenvolvimento da patologia.

As células TCD8⁺ poderiam destruir as células infectadas por um mecanismo dependente de perforinas. No entanto, HENRIQUES-PONS et al. (2002) mostraram que camundongos deficientes para perforina quando infectados com a cepa Y de *T. cruzi* desenvolvem os mesmos níveis de parasitemia que os animais selvagens (WT), demonstrando que esta molécula não desempenha um papel central no controle da infecção.

Embora seja a principal população linfocitária esplênica expandida na fase crônica (MARINHO et al., 1999) o papel na infecção das células TCD8⁺ permanece controvertido. Recentemente, LEAVEY & TARLETON (2003) mostraram que no tecido muscular esquelético e cardíaco do camundongo infectado as células TCD8⁺, apesar de apresentarem marcadores fenotípicos de ativação e memória (CD11a⁺CD44⁺Ly-6C⁺CD62L^{low}), têm sua capacidade efetora diminuída, evidenciada pelos baixos níveis de produção de IFN γ e ineficiência em realizar citotoxicidade quando comparadas às células TCD8⁺ esplênicas.

3.3.5 As citocinas

Continuamente o sistema imunológico entra em contato com uma diversidade grande de patógenos. Assim muitos tipos celulares participam do combate às infecções. Os linfócitos T CD4⁺ desempenham um papel crítico na resposta imunológica através da secreção de linfocinas que atuam como fatores de crescimento e diferenciação em diferentes populações celulares.

As células TCD4⁺ são comumente classificadas em duas sub-populações chamadas de Th1 e Th2 com base no conjunto de citocinas que produzem. Assim, em modelos murinos, as células do tipo Th1 produzem interleucina 2 (IL-2), IFN- γ , fator de necrose tumoral alfa (TNF α) e linfotóxina (LT), que induzem respostas do tipo celular mediadas por células TCD8⁺ e macrófagos, que são elementos críticos para eliminação de patógenos intracelulares com *Listeria monocytogenes* e *Leishmania major*. Já as células do tipo Th2 secretam interleucina 4, 5, 6, 9, 10 e 13 (IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13) que são essenciais para respostas humorais onde predominam a produção de anticorpos pelas células B e para a eliminação de parasitas extracelulares como helmintos e nematóides (MOSMANN et al., 1986, JANKOVIC et al., 2001, SZABO et al., 2003). As células TCD4⁺ participam dos dois tipos de resposta imune. Cabe enfatizar no entanto, que muitas vezes, a resposta imune contra determinados patógenos não reflete uma polarização clara dentro de um perfil Th1 ou Th2, mostrando a participação de ambos os tipos de citocinas (PAUL & SEDER, 1994).

Células TCD4⁺ “naive” que podem ser identificadas pelos marcadores de superfície CD62L^{high}, CD45RB^{high} e CD44^{low}; quando ativadas produzem unicamente IL-2 e são consideradas as precursoras (Thp) dos outros fenótipos celulares. A partir destas células Thp, ocorreria uma diferenciação com expressão simultânea dos dois conjuntos de citocinas, fenótipo que têm sido denominado de Th0. A partir deste ponto aconteceria a polarização para Th1 ou Th2, fenótipos que uma vez instaurados, seriam irreversíveis. Foi descrito ainda, um outro fenótipo de células TCD4⁺ que produzem exclusivamente altas quantidades de fator de transformação do crescimento β (TGF- β) e são denominadas células Th3 (MOSMANN & SAD, 1996).

Células TCD4⁺ também podem participar de respostas patológicas. Assim, uma excessiva produção de citocinas do tipo 1 tem sido associada à destruição tecidual encontrada em doenças autoimunes, enquanto que uma produção exacerbada de citocinas do tipo 2 estaria implicada na geração de processos alérgicos (SZABO et al., 2003).

Alguns autores têm proposto que o padrão de resistência ou suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi* está relacionado ao tipo de citocinas produzidas com participação destacada das citocinas Th1, responsáveis por promover a resistência (SILVA et al., 1992, HOFT et al., 1993, MINOPRIO et al., 1993, REED et al., 1994). Assim, o controle do parasita depende de citocinas tais como IFN- γ , TNF- α , IL-12 e GM-CSF, enquanto IL-10, IL-4 e TGF- β promoveriam a suscetibilidade. A seguir, serão descritas, sumariamente, a participação das diferentes citocinas na infecção pelo *T. cruzi*.

A **IL-2** é um indutor de crescimento para diferentes tipos celulares estando envolvida na proliferação de células T e células NK. Além disso, a IL-2 induz a síntese de múltiplas citocinas por linfócitos T e de IFN- γ por células NK (ABBAS et al., 1994). Na infecção pelo *T. cruzi* verifica-se que, ao contrário do IFN- γ , que é produzido em quantidades significantes nas fases aguda e crônica, a IL-2 é produzida apenas de maneira transitória no início da infecção (HAREL-BELLAN et al., 1983, TARLETON, 1988, SOONG & TARLETON, 1994, ZHANG & TARLETON, 1996).

Durante a infecção pelo *T. cruzi*, a IL-2 é produzida em um curto intervalo de tempo. Diversos mecanismos imunossupressores que afetam direta ou indiretamente a produção desta citocina têm sido propostos. SOONG & TARLETON (1994) propuseram que a baixa produção de IL-2 durante a infecção pelo *T. cruzi* pode estar ligada, possivelmente, a um efeito inibidor na regulação da transcrição dos genes desta citocina. As prostaglandinas (PGs) podem estar relacionadas a esta imunossupressão, uma vez que a adição de um inibidor de prostaglandinas, a indometacina, em culturas estimuladas com ConA, induz o aumento da produção de IL-2 (HAREL-BELLAN et al., 1985, TARLETON, 1988,

PINGE-FILHO et al., 1999). O óxido nítrico (NO) pode também estar envolvido na supressão de IL-2, uma vez que linfócitos T humanos ativados em presença desta substância apresentam uma diminuição da produção não somente de IL-2 mas também de IFN γ , IL-5, IL-10 e IL-4 (BAUER et al., 1997).

De acordo com TARLETON (1993), a supressão de IL-2 na doença de Chagas é interessante quando analisada em um contexto imunopatológico, uma vez que uma supressão similar tem sido observada em outras doenças autoimunes. Em ambos os casos, esta supressão não acontece por falta de células T capazes de secretar IL-2 nem pela ausência de cofatores como IL-1; células supressoras têm sido identificadas em ambos os casos e a produção normal de IL-2 pode ser restabelecida *in vitro* estimulando as células T com combinações de éster forbol e ionóforo de cálcio (Ca²⁺) ou deixando as células em repouso por 48-72 horas (VIA & SHEARER, 1988, KROEMER & WICK, 1989).

A IL-12 é produzida principalmente por macrófagos, agindo sozinha ou em sinergismo com a IL-2. Esta citocina é necessária para induzir a produção de IFN- γ pelas células T e NK, além de induzir a produção de TNF- α , GM-CSF e IL-2 (KOBAYASHI et al., 1989, CHAN et al., 1991, HSIEH et al., 1993). Induz também a ativação de células "killer" ativadas por citocinas (LAK) e de células TCD8⁺ citotóxicas (TRINCHIERI & SCOTT, 1995). Além disto, esta citocina está envolvida na diferenciação de células TCD4⁺ na direção Th1 (MANETTI et al., 1993, WU et al., 1993, MANETTI et al., 1994). Na doença de Chagas, esta citocina parece desempenhar um papel fundamental na fase inicial da infecção, uma vez que animais tratados com anticorpos anti-IL-12 têm um aumento da parasitemia e mortalidade (ALIBERTI et al., 1996). Desta maneira, a IL-12 produzida por macrófagos infectados promoveria a ativação de células NK e de células TCD4⁺ Th1, as quais, através da produção de IFN- γ , induziriam a ativação de macrófagos levando à produção de NO e destruição intracelular dos parasitas (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996, ALIBERTI et al., 1996, CARDILLO et al., 1996).

O **IFN- γ** tem sido correlacionado com a resistência e o controle do parasita na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (JAMES et al., 1982, PLATA et al., 1984, WIRTH et al., 1985, PLATA et al., 1987, REED, 1988, ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996, ROMANHA et al., 2002). Diversos modelos têm mostrado que camundongos resistentes secretam altas quantidades de IFN- γ , enquanto que camundongos suscetíveis teriam uma secreção aumentada de IL-4 e IL-10 (SILVA et al., 1992, HOFT et al., 1993, MINOPRIO et al., 1993, REED et al., 1994). O IFN- γ está envolvido na ativação de macrófagos, induzindo-os a expressar moléculas de classe II do CPH e a secretar radicais de oxigênio e nitrogênio, ambos dotados de potente atividade microbida (MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992). Tem sido relatado que o NO produzido em animais infectados está relacionado à resistência e ao controle da parasitemia (GAZZINELLI et al., 1992, VESPA et al., 1994, SILVA et al., 2003).

O IFN- γ está envolvido na mudança de classe de imunoglobulina para IgG2a e IgG3 (SNAPPER & PAUL, 1987, SNAPPER et al., 1992) e induz nos macrófagos aumento de expressão de receptores para a porção Fc de IgG (WILSON & FINBLOOM, 1992). Esta citocina é ainda responsável indiretamente por promover a diferenciação de células TCD4⁺ TH₀ na direção Th1, ao inibir a proliferação de células Th2 (PAUL & SEDER, 1994), além de ser um importante estimulador da secreção de IL-12 por macrófagos ativados (KUBIN et al., 1994). Na infecção pelo *T. cruzi*, as células T sofrem supressão para produção de IL-2 e não para IFN- γ (NABORS & TARLETON, 1991), apesar das duas citocinas terem sido classificadas como do tipo Th1.

Sub-populações de linfócitos T, assim como as células NK, poderiam estar envolvidas na produção de IFN- γ . No início da infecção, previamente à ativação das células T, as células NK parecem ser as principais responsáveis pela produção desta citocina (CARDILLO et al., 1996), enquanto que mais adiante, as células T CD4⁺ e CD8⁺, passariam a ter um papel proeminente. No entanto, em ensaios de dupla marcação com anticorpos para caracterizar *in situ* as populações produtoras desta citocina, ZHANG & TARLETON, (1996) observaram que os maiores produtores de IFN- γ no baço de animais infectados, são células com

fenótipo $\text{TCR}\alpha\beta^+$ Thy-1^+ CD4^- CD8^- . A importância destas células T duplo negativas na imunidade frente ao parasita ainda não foi totalmente esclarecida (TARLETON, 1991).

O **TNF- α** é uma citocina produzida por macrófagos, células T, células NK, mastócitos e outras populações celulares. Esta citocina é um mediador da imunidade natural e adquirida, com um amplo espectro de funções, destacando-se seu envolvimento no processo inflamatório no qual promove o recrutamento e ativação de fagócitos. Quando age sobre os macrófagos, induz a sua ativação, estimulando a produção de NO (GREEN et al., 1990, LANGERMANS et al., 1992, ALIBERTI et al., 2001). O TNF- α tem um papel importante no controle da infecção murina pelo *T. cruzi*, ativando macrófagos para a destruição intracelular do parasita. Entretanto, o TNF α também parece estar envolvido na caquexia e na morte durante a fase aguda, sendo um elemento fundamental da reação inflamatória tissular. PINGE-FILHO et al. (1999) demonstraram que uma grande quantidade de TNF α é produzida durante a fase aguda e que esta citocina tem a capacidade de estimular a produção de prostaglandinas (PG) e NO que estão diretamente envolvidas na imunossupressão que acompanha esta fase da infecção.

O seu papel em relação ao IFN- γ na ativação de macrófagos é ainda controverso. GOLDEM & TARLETON (1991) reportaram que TNF- α não sinergiza com IFN- γ no aumento da capacidade tripanosomicida; outros trabalhos porém, mostram que estas duas citocinas atuam sinergicamente na ativação de macrófagos aumentando a destruição de parasitas intracelulares (MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992, CASTANOS-VELEZ et al., 1998).

O **GM-CSF** é uma citocina responsável pela proliferação, diferenciação e ativação de células precursoras de granulócitos e macrófagos (GASSON, 1991, HAMILTON, 1993). É produzida por monócitos, macrófagos, linfócitos T e células endoteliais (METCALF et al., 1992). O GM-CSF está envolvido no controle da transcrição e da secreção de várias citocinas e também da expressão de

moléculas de classe II do CPH e de receptores para Fc (COLEMAN et al., 1988, FISCHER et al., 1988). Esta citocina exerce um importante efeito sobre a capacidade tumoricida, microbicida e no "burst" oxidativo dos macrófagos humanos e murinos (DENIS, 1991). O envolvimento de GM-CSF na infecção por *T. cruzi* é ainda pouco entendido. No entanto, em ensaios *in vitro* esta citocina diminui os níveis de infecção tanto em macrófagos não ativados, quanto em macrófagos ativados via IFN- γ (GRABSTEIN et al., 1986, REED et al., 1987). Por outro lado, OLIVARES FONTT et al. (1996) observaram que animais tratados com anticorpos monoclonais anti-GM-CSF têm uma resistência diminuída à infecção pelo *T. cruzi*.

A **IL-10**, citocina conhecida como desativadora de macrófagos, é produzida por linfócitos TCD4⁺ (Th2), linfócitos B1, queratinócitos (O'GARRA et al., 1992) e também por macrófagos (MOSMANN & MOORE, 1991). A IL-10 inibe a expressão nos macrófagos de moléculas de classe II e de moléculas coestimuladoras B7, fazendo com que estas células tenham sua capacidade de apresentar antígenos reduzida (DE WAAL MALEFYT et al., 1991). Além disso, a IL-10, também é responsável pela diminuição da síntese de IL-2 (DE WAAL MALEFYT et al., 1993), IL-12 (D'ANDREA et al., 1993) e IFN- γ (HSU et al., 1990) e serve para amortecer os efeitos potencialmente lesivos da ativação de macrófagos sobre os tecidos do hospedeiro (FIORENTINO et al., 1991, ADORINI, 2003). A IL-10 também está envolvida na supressão da proliferação de células T (DE WAAL MALEFYT et al., 1991, TAGA & TOSATO, 1992). Ensaios *in vitro* demonstram que a IL-10 é capaz de inibir a destruição intracelular do *T. cruzi* (GAZZINELLI et al., 1992, SILVA et al., 1992). Por outro lado, camundongos deficientes de IL-10 controlam mais eficientemente a infecção por *T. cruzi*, reduzindo os níveis de parasitismo e determinando um aumento significativo na secreção de IFN- γ , NO, TNF- α e IL-12 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996, HUNTER et al., 1997). Entretanto, a despeito deste efeito protetor, os animais deficientes em IL-10 sucumbem mais rapidamente à infecção pelo *T. cruzi*, o que é um provável resultado do efeito incontrolado das citocinas pró-inflamatórias na ausência de IL-10.

A **IL-4** é uma citocina que atua em diferentes estágios de ativação, proliferação e diferenciação das células B. Na proliferação destas células, esta linfocina, que pode ser secretada pelas células T CD4⁺ e mastócitos, atua como fator co-estimulador juntamente com o ligante de CD40 (BANCHEREAU et al., 1991). Em camundongos a IL-4 também é responsável pela mudança de classe de imunoglobulinas de IgM para IgG1 e IgE, e pela indução de moléculas de classe II em células B (ZURAWSKI & DE VRIES, 1994). A IL-4 está envolvida na diferenciação de linfócitos T na direção Th2 (PAUL & SEDER, 1994). Juntamente com a IL-10 e o TGF- β , tem sido considerada como uma citocina que promoveria a suscetibilidade dos camundongos na infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, a importância da IL-4 em determinar a suscetibilidade à infecção ainda não está totalmente esclarecida. Estudos *in vitro* têm demonstrado que esta citocina pode desempenhar funções contrastantes. Assim, se por um lado ela pode promover um aumento da destruição intracelular de parasitas por macrófagos (WIRTH et al., 1989), por outro, ela também pode inibir a atividade tripanocida dependente de IFN γ (GOLDEN & TARLETON, 1991). ABRAHAMSOHN et al. (2000) utilizando camundongos deficientes de IL-4 com diferentes *background* (129/J, BALB/c, e C57BL/6) infectados com *T. cruzi* da cepa Y não observaram diferenças significantes nos níveis de parasitemia e taxa de mortalidade quando comparados com os animais selvagens, demonstrando desta maneira que a produção desta citocina não é determinante para suscetibilidade a infecção. Porém, em outras infecções por parasitas intracelulares, tais como a leishmaniose e a hanseníase, a resposta exacerbada de IL-4 leva a um agravamento acentuado da doença (SALGAME et al., 1991, PAUL & SEDER, 1994).

O **TGF- β** é uma citocina produzida por diversos tipos de células, tais como macrófagos, células NK e células T. Tem propriedades imunossupressoras e anti-inflamatórias (KEHRL et al., 1991, RUSCETTI et al., 1993). Sua ausência em camundongos deficientes resulta em uma inflamação difusa por células mononucleadas em diversos órgãos vitais (CHRIST et al., 1994). O TGF- β inibe *in*

vitro a capacidade que macrófagos ativados por IFN- γ têm de matar o *T. cruzi* (SILVA et al., 1991, GAZZINELLI et al., 1992) e a sua administração em camundongos infectados induz altas taxas de parasitemia e mortalidade (SILVA et al., 1991). ZHANG & TARLETON (1996) demonstraram que o TGF- β é produzido no coração e no baço durante todo o curso da infecção, tanto em modelos resistentes, quanto nos suscetíveis à infecção por *T. cruzi*. Estes resultados sugerem que esta citocina tem um importante papel na modulação da intensa e prolongada resposta inflamatória ao *T. cruzi*, limitando os danos tissulares causados pela inflamação.

3.3.6 Ação das quimiocinas

As quimiocinas são pequenos polipeptídios secretados envolvidos na migração e ativação de células do sistema imunológico nos tecidos onde antígenos estão presentes, desempenhando um importante papel no processo inflamatório frente a infecções e doenças auto-imunes (ZLOTNIK & YOSHIE, 2000, CALZADA et al., 2001). Estes polipeptídeos de pequena massa molecular (8-12kDa) são subdivididos em 4 categorias baseadas nos 2 primeiros resíduos de cisteína amino(N)-terminal: CC, CXC, CX₃C e C, sendo atualmente descritos mais de 32 tipos diferentes de quimiocinas com pelo menos 19 tipos de receptores funcionais (PROUDFOOT, 2002).

Na infecção experimental pelo *T. cruzi* diversos grupos têm demonstrado a importância das quimiocinas no recrutamento e na permanência de leucócitos nos locais de lesão onde o parasita se encontra (DOS SANTOS et al., 2001, PETRAY et al., 2002, TEIXEIRA et al., 2002). Quimiocinas como RANTES, MIP1 α e MIP1 β desempenham um importante papel na ativação de macrófagos humanos, uma vez que a adição destas quimiocinas à cultura de macrófagos de indivíduos saudáveis induz uma maior fagocitose de *T. cruzi* bem como uma amplificação da capacidade tripanocida (LIMA et al., 1997). VILLALTA et al (1998) mostraram que o aumento da atividade microbida desencadeado por estas quimiocinas deve-se a uma maior produção de NO. Assim, esta maior atividade tripanocida pode ser

revertida através da adição de L-NMMA um potente inibidor da enzima iNOS nas culturas de macrófagos.

Resultados semelhantes também foram encontrados em modelos murinos de infecção pelo *T. cruzi*, onde se observou um aumento da expressão de mRNA para MIP1 α , RANTES e JE/MCP1 em células do exudato inflamatório peritoneal e também em cultura de macrófagos infectados. De maneira semelhante aos resultados obtidos com macrófagos humanos, a adição exógena destas quimiocinas à cultura de macrófagos murinos aumenta a fagocitose do parasita e a produção de NO e como consequência, diminui drasticamente a replicação do parasita dentro dos macrófagos (ALIBERTI et al., 1999).

A expressão de iNOS e a consequente produção de NO é um elemento chave no controle dos parasitas não só pelos macrófagos mas também por cardiomiócitos parasitados. Quimiocinas como JE, RANTES, KC, MIP-2, Mig e Crg-2 podem estar diretamente relacionados a um aumento da expressão de iNOS nos cardiomiócitos infectados como consequência da estimulação autócrina (MACHADO et al., 2000).

Recentemente PETRAY et al. (2002) demonstraram que a neutralização de MIP1 α por meio de anticorpos neutralizantes causa uma diminuição de 68% dos macrófagos e monócitos no baço de animais infectados com *T. cruzi*, indicando que MIP1 α é determinante para entrada de macrófagos em um tecido parasitado. No mesmo trabalho foi mostrado também que a neutralização desta quimiocina provoca um aumento no número de ninhos no miocárdio dos camundongos infectados com o conseqüente agravamento das lesões no coração.

Por outro lado, o recrutamento das diferentes populações leucocitárias para sítios inflamatórios e a migração para os tecidos e órgãos linfóides dependem da expressão de receptores de quimiocinas por estes tecidos. Células T *naïve* que recirculam pelos órgãos linfóides secundários possuem uma alta expressão do receptor de quimiocina CCR7 que, juntamente com a expressão de L-selectina, permitem a entrada destas células nos linfonodos através das veias de endotélio alto (LUSTER, 2002). Na ativação dos linfócitos T ocorre uma diminuição na expressão de CCR7 e um aumento na expressão de CXCR5, que auxilia na

interação do linfócito T com células B, ou de CXCR3, que promove a migração de linfócitos para sítios de inflamação (LUSTER, 2002). Sabe-se que os receptores CCR5 e CXCR3 estão preferencialmente associados a células do tipo Th1 (GAO et al., 2003) enquanto que os receptores CCR3, CCR4, CCR8 são expressos preferencialmente em células Th2 (CHIU et al., 2002).

3.3.7 Mecanismos de patogênese

O *Trypanosoma cruzi* induz direta ou indiretamente uma série de alterações moleculares e morfológicas em diferentes tecidos e órgãos, das quais decorrem os quadros anátomo-clínicos que caracterizam a doença. Uma grande diversidade de fatores atuam na patogênese da Doença de Chagas, determinando uma maior ou menor intensidade de infiltrado inflamatório e de destruição tissular. Entre estes, alguns são inerentes ao *T. cruzi*, ligados ao seu polimorfismo, tropismo e constituintes antigênicos e outros estão relacionados ao hospedeiro, como constituição genética, idade, sexo, entre outros. Nota-se que os fatores patogênicos são múltiplos e em grande parte desconhecidos (TAFURI, 1987, DE DIEGO et al., 1998, DE DIEGO et al., 1998).

Três elementos podem estar envolvidos na patologia durante a infecção pelo *T. cruzi*: i) destruição de células que contém ninhos de parasitas, ii) lesão celular que acompanha à resposta inflamatória e iii) deficiência funcional, resultante da fibrose que acompanha a resolução da inflamação. Estes processos são simultâneos e podem atingir qualquer tecido ou órgão; entretanto, o coração, o tubo digestivo e o sistema nervoso são os principais e mais importantes alvos (CHIMELLI & SCARAVILLI, 1997, PALOMINO et al., 2000). Alguns mecanismos têm sido propostos para explicar como a resposta imune poderia determinar a disfunção dos órgãos atingidos. Estes incluem: i) a destruição direta do tecido muscular, ii) a perda de função muscular conseqüente à denervação local, iii) a agregação plaquetária intravascular geradora de microinfartos, entre outros (TARLETON & ZHANG, 1999, TARLETON, 2001).

Atualmente a hipótese mais aceitável para explicar a existência de inflamação no coração, tubo digestivo, e outros órgãos lesados seria a de uma reação inflamatória frente aos parasitas que colonizam estes órgãos (ZHANG & TARLETON, 1999). Assim, as lesões crônicas seriam geradas devido a uma contínua destruição do tecido infectado por meio de uma resposta inflamatória induzida pelo parasita e mediada por clones linfocitários específicos para o *T. cruzi*. Entretanto, a ausência de ninhos nas proximidades dos infiltrados levantou a hipótese da reação inflamatória não ser mediada por clones linfocitários específicos para o parasita, mas sim por clones auto-reativos que reconheceriam antígenos próprios. Sob esta óptica, o processo inflamatório crônico e a conseqüente destruição tissular passariam a ser considerados como resultado de um processo autoagressivo (GIRONES & FRESNO, 2003, TARLETON, 2003). Neste contexto de autoimunidade, diversos antígenos tissulares foram descritos nas duas últimas décadas como elementos alvo dos linfócitos T e B autorreativos, e diversos mecanismos não excludentes, foram propostos como responsáveis pela indução de autorreatividade. Assim, foi sugerido que a perda de tolerância às estruturas próprias durante a infecção pelo *T. cruzi* seria o resultado: i) da persistente resposta inflamatória local; ii) da intensa ativação policlonal dos linfócitos nas fases aguda e crônica (MINOPRIO et al., 1989, MINOPRIO et al., 1989, VAN VOORHIS & EISEN, 1989, REINA-SAN-MARTIN et al., 2000, MINOPRIO, 2001) e iii) da reatividade cruzada entre o parasita e antígenos próprios específicos de órgãos (SADIGURSKY et al., 1982, CUNHA-NETO et al., 1995).

RIBEIRO DOS SANTOS et al. (1992) sugeriram ser a autoimunidade o principal mecanismo implicado na gênese da miocardite crônica na doença de Chagas. Estes autores investigaram a autorreatividade contra o tecido cardíaco singênico *in vivo* por meio de transplantes de coração de camundongos recém-nascidos para a base da orelha de camundongos chagásicos crônicos ou de controles não infectados. Assim, enquanto que nos animais não infectados o coração não era rejeitado, os animais crônicos rejeitavam prontamente o órgão transplantado. A rejeição parecia ser mediada por linfócitos T CD4⁺ e o estado de

tolerância podia ser restabelecido com o tratamento *in vivo* com anticorpo monoclonal anti-CD4 antes dos transplantes. Entretanto, TARLETON et al. (1997) mostrou posteriormente que a rejeição só acontecia quando o órgão transplantado estava parasitado, e que na ausência do *T. cruzi* os corações transplantados podiam permanecer sem sinais de rejeição por mais de um ano.

A hipótese de autoagressão foi considerada por muito tempo como a mais provável para explicar a patologia chagásica (CUNHA-NETO & KALIL, 2001, MINOPRIO, 2001, PONTES-DE-CARVALHO et al., 2002, KIERSZENBAUM, 2003). No entanto, nos últimos anos, muitos autores passaram a reavaliar a participação do parasita como elemento alvo dos processos inflamatórios tissulares. Isto foi resultado dos avanços tecnológicos que permitiram a detecção *in situ* de antígenos ou DNA do parasita. Assim, HIGUCHI et al. (1993) mostraram que, em humanos, a intensidade da miocardite se correlaciona diretamente com os níveis de antígenos de *T. cruzi* no coração detectados por imuno-histoquímica. Por outro lado, VAGO et al. (1996), utilizando técnicas de PCR (do inglês, Polymerase Chain Reaction) detectaram a presença do *T. cruzi* no esôfago unicamente naqueles pacientes chagásicos que apresentavam um quadro clínico de patologia digestiva. TARLETON et al. (1997) mostraram posteriormente, que corações neonatais transplantados para camundongos crônicos não exibiam quaisquer sinais de rejeição, sobrevivendo por mais de um ano totalmente livres de inflamação e de parasitas, como foi determinado por análise de PCR *in situ*. Entretanto, quando se injetavam parasitas diretamente nos corações transplantados em animais crônicos, observava-se uma rápida e intensa resposta inflamatória, sugerindo que o parasita é um fator preponderante e indispensável para o estabelecimento das lesões tissulares.

JONES et al. (1992) mostraram que o DNA do parasita não era detectado em tecido cardíaco de cadáveres soropositivos para *T. cruzi* que não mostravam sinais de cardiopatia, entretanto, o DNA do parasita sempre foi encontrado no tecido cardíaco daqueles pacientes com cardiopatia chagásica diagnosticada. Tem sido levantada a possibilidade que antígenos e DNA do parasita possam persistir nos sítios de lesão por longos períodos, o que poderia ser um indicativo

de uma infecção não ativa (BUCKNER et al., 1999). Entretanto, um estudo mostrando a persistência de amastigotas viáveis em 22 de 26 biópsias endomiocárdicas afastou a possibilidade da correlação parasita-patologia não refletir a presença de *T. cruzi* vivo (ANEZ et al., 1999).

Por outro lado, observamos que a patologia do animal crônico reflete o nível de carga parasitária na fase aguda, uma vez que camundongos infectados com alto inóculo de *T. cruzi* mostram maior parasitemia residual e patologia na fase crônica em relação aos animais infectados com inóculo cem vezes menor (MARINHO et al., 1999).

Em diferentes modelos murinos de doença crônica foram encontradas fortes correlações entre a severidade da doença e a presença de DNA do parasita no tecido muscular (ZHANG & TARLETON, 1999). O conjunto de evidências observadas em humanos e também em modelos murinos indica que, qualquer que seja o mecanismo envolvido na destruição das células do hospedeiro, o parasitismo tissular na fase crônica parece ter um papel fundamental no desenvolvimento da patologia. Se essa correlação só foi recentemente observada, deve-se ao fato dos métodos utilizados para detectar a presença do parasita na fase crônica (xenodiagnóstico e hemocultura) serem essencialmente não quantitativos (TARLETON, 1993, TARLETON, 2001).

3.3.8 A cepa Sylvio-X10/4 do *T. cruzi*

O clone X10/4 foi isolado por MILES (1974) a partir de parasitas da cepa X10 retirada de um inseto *Rhodnius prolixus* utilizado no xenodiagnóstico de um paciente com infecção aguda residente na região norte do Brasil (SILVEIRA et al., 1979). Um total de nove clones foram isolados, todos classificados como do zimodema tipo 1, sendo os clones Sylvio-X10/4 e Sylvio-X10/7 os mais bem caracterizados até o momento (POSTAN et al., 1983, POSTAN et al., 1987).

O clone Sylvio-X10/4 produz uma infecção crônica em camundongos C3H/HEN, enquanto que o clone Sylvio-X10/7, nas mesmas condições experimentais, produz uma infecção aguda fatal. Assim, a infecção com o clone

Sylvio-X10/7 cursa com uma alta parasitemia, um intenso comprometimento de vários tecidos e uma alta frequência de mortalidade na fase aguda, quando comparado com o clone Sylvio-X10/4. O clone Sylvio-X10/4 não induz no camundongo C3H/HEN uma fase aguda característica, não se observando parasitas nas amostras de sangue fresco, que entretanto podem ser detectados em diferentes momentos da infecção através de ensaios de hemocultura.

Uma grande parte dos camundongos C3H/HEM infectados com o clone Sylvio-X10/4 sobrevive mais de 200 dias sem aparente sinal de doença. A análise histopatológica revela durante as três primeiras semanas de infecção um progressivo parasitismo no estômago e no músculo esquelético. Entretanto uma diminuição dos níveis de parasitismo e inflamação ocorre nesses tecidos no segundo mês de infecção. Estes camundongos também apresentam miocardite que é mais severa durante o segundo mês de infecção regredindo gradualmente nos meses seguintes (POSTAN et al., 1983).

POSTAN et al. (1983) mostraram que na infecção de camundongos C3H/HEN por parasitas da cepa X10, o curso da infecção apresenta um padrão intermediário entre aqueles induzidos pelos dois clones. Esta foi uma das primeiras evidências que o diferente potencial patogênico de uma cepa se deve a heterogeneidade genética da população de parasitas que compõe a cepa.

Camundongos C3H/HeSnJ infectados com o clone X10/4 tem sido utilizados como modelo de infecção crônica por diferentes grupos (POSTAN et al., 1986, ZHANG & TARLETON, 1996) uma vez que não apresenta parasitemia visível na fase aguda e apresentam uma intensa miocardite na fase crônica da infecção, similar àquela observada na doença de Chagas humana.

3.3.9 Fatores genéticos da infecção pelo *T. cruzi*

Na Doença de Chagas a infecção inicial pelo *T. cruzi* pode ser fatal, mas a maioria das pessoas sobrevive à fase aguda, podendo permanecer em um estado assintomático por toda a vida ou desenvolver a forma crônica da doença. Esta variação de resistência em humanos é também observada em modelos murinos. Diferentes linhagens isogênicas de camundongos podem variar de uma alta

resistência até uma alta suscetibilidade, sugerindo uma base genética para esta resistência natural (TRISCHMANN et al., 1978).

Neste sentido WRIGHTSMAN et al (1982) demonstraram que diferentes linhagens de camundongos poderiam ser divididas em dois grupos baseados nos níveis de parasitemia que desenvolviam quando infectados com 10^3 formas de *T. cruzi* da cepa Peru. Assim, C3H/HeJ, BALB/c e CBA/N desenvolviam altos níveis de parasitemia, enquanto camundongos C57BL/6J e DBA/2J eram resistentes à infecção. Linhagens congênicas com *backgrounds* C57BL/10J, C57BL/6J e DBA/2J que diferem na região do H-2, quando infectadas com a mesma cepa, não demonstraram diminuição nos níveis de parasitemia indicando que os genes do MHC não afetam o curso da parasitemia durante a fase aguda da infecção. De forma contrária, TRISCHMANN & BLOOM (1982) mostraram que camundongos C3H/An quando infectados com a cepa Brazil de *T. cruzi* apresentam altos níveis de parasitemia e mortalidade quando comparados aos camundongos C57BL/10. Neste estudo os autores sugeriram que o *locus* H-2 poderia influenciar a resistência à infecção. Animais C3H/An apresentam o haplótipo H-2^k enquanto que animais C57BL/10 são H-2^b. A análise de camundongos F₂ (C3H/An X C57BL/10) revelou uma alta correlação entre *locus* H-2^k e a suscetibilidade à infecção.

Entretanto, em um estudo realizado com um grupo de pacientes com as diferentes formas da doença (FAE et al., 2000) não se observou nenhuma correlação entre a gravidade da doença cardíaca e *locus* relacionados ao HLA classe II ou a cadeia pesada da miosina cardíaca. Um fato interessante constatado neste trabalho foi que o sexo masculino se comportou como fator de risco para progressão da doença.

Outros genes além daqueles relacionados ao MHC também foram relacionados com suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi*. BOYER et al. (1983) utilizando diferentes linhagens de camundongos carregando a mutação no gene *lpr* (lupus-prone mice) observaram um alto índice de mortalidade e 2 a 10 vezes mais parasitemia do que as respectivas linhagens controles. Esta foi uma das primeiras evidências de que um gene autossômico recessivo pode influenciar na

suscetibilidade de camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. MESSIAS-REASON et al. (2003) encontraram uma forte associação entre polimorfismo nos genes relacionados ao fator B e C3 do complemento e o desenvolvimento de lesões cardíacas em um grupo de 100 pacientes soropositivos, sendo que 57 pacientes eram cardiopatas e 43, portadores assintomáticos. O alelo C3F mostrou-se um marcador para a progressão da cardiopatia enquanto que o alelo BF-S teve um papel protetor na evolução da doença.

Até o momento, pouco se sabe sobre as bases genéticas da resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Diferentes estudos têm demonstrado que quaisquer que sejam os mecanismos envolvidos na progressão da doença, estes serão resultado da interação entre fatores genéticos inerentes ao hospedeiro e fatores diretamente relacionados ao parasita, sem descartarmos as possíveis interações com fatores ambientais.

3.3.10 Análise de loci de características quantitativas (QTLs) e mapeamento genético

O camundongo pode ser um importante modelo para estudos genéticos de suscetibilidade na doença de Chagas. Em um modelo murino podem-se controlar fatores ambientais, o tipo de parasita, a quantidade do inóculo e a via de infecção. Além do mais, podem-se compreender as bases genéticas da resistência à infecção por cruzamentos entre linhagens resistentes e suscetíveis e o uso de marcadores genéticos.

A maioria das características em populações naturais assume uma distribuição fenotípica contínua. Estes fenótipos são designados características quantitativas e a análise da correspondência entre o genótipo e o fenótipo é bastante complexa, uma vez que não existem classes fenotípicas discretas. Diz-se que estamos perante uma característica quantitativa quando a variação fenotípica observada entre os indivíduos em cada classe genotípica é muito maior que a variação nas médias dos fenótipos em genótipos diferentes.

As características quantitativas têm, na maioria dos casos, natureza multifatorial e dependem da interação de diversos fatores, tanto em nível genético como ambiental. Uma característica quantitativa pode ser o resultado de um único genótipo sobre o qual o ambiente atua diferencialmente (sob a forma de condições que podem ser favoráveis ou desfavoráveis ao desenvolvimento da característica) produzindo um gradiente fenotípico contínuo; ou ainda pode resultar de um conjunto de genes com efeito independente e acumulativo; ou pode resultar de uma ação combinada de ambos os fatores (caso mais freqüente). Assim, quando se pretende estudar uma característica quantitativa deve-se avaliar se esta é determinada por fatores genéticos, ambientais, ou ambos (e neste caso qual a proporção relativa de cada) e para tal recorre-se a técnicas estatísticas.

Numa população geneticamente heterogênea formam-se muitos genótipos pelos processos de segregação e recombinação. A variação no genótipo pode ser eliminada através do estudo de linhagens isogênicas, que são virtualmente homozigóticas em todos os *loci*, ou pelo estudo da progênie F_1 resultante de duas linhagens isogênicas, que é uniformemente heterozigótica para todos os genes em que as duas linhagens parentais diferem.

Quando se pretende estudar caracteres quantitativos recorre-se a cruzamentos entre linhagens puras de forma a analisar a segregação dos genes. Os genes que controlam estes fenótipos são designados *loci* de características quantitativas (QTL). A localização aproximada dos QTLs no genoma pode ser determinada experimentalmente, bem como a proporção da variação do fenótipo que se deve a uma variação do QTL na região genômica detectada. Geralmente, recorre-se à monitorização da segregação de marcadores genéticos conhecidos que, idealmente, devem ter uma distribuição generalizada em todo o genoma. Estes marcadores são escolhidos com base na existência de polimorfismo entre as linhagens parentais utilizadas no estudo.

Marcadores genéticos tipo microsatélites têm sido usados como ferramentas de estudo neste tipo de análise. Microsatélites são seqüências repetitivas de nucleotídeos que ocorrem ao longo de todo o DNA. Estima-se que no homem existam repetições deste tipo a cada 100 Kb. Estas seqüências

repetitivas com dois a seis nucleotídeos estão mais concentradas na região da eucromatina, sendo que as repetições de dinucleotídeos d(AC) são as mais freqüentes. Numa dada região cromossômica cada indivíduo apresenta um número diferente de repetições em cada cromátide (alelos) e a herança desses alelos é mendeliana. Essas repetições são polimórficas, ou seja, existem em uma população diferentes números de repetições identificadas como alelos específicos daquele marcador. A estabilidade dos microsatélites é de 10^{-2} a 10^{-5} mutações por geração, sendo considerados seqüências relativamente estáveis (LITT & LUTY, 1989, KORETH et al., 1996).

Em virtude de estarem dispersos ao longo de todo o genoma, os microsatélites apresentam-se muito próximos de genes e podem ser utilizados como marcadores de regiões gênicas. A proximidade física não é o suficiente para que um microsatélite marque uma determinada região. A segregação de um microsatélite com um gene ou uma região depende também de fatores como a presença de regiões com altas taxas de mutação e a porcentagem de recombinação na região. Por este motivo, a distância entre os marcadores é dada em cM (centiMorgans). Assim, 1 cM corresponde a uma porção do genoma onde há chance de ocorrer uma recombinação gênica a cada 100 meioses. Quanto maior a distancia em cM maior a chance de ocorrer recombinações naquela região, e portanto, menores as chances do marcador estar segregando junto com o gene ou região em estudo. Estes marcadores genéticos são bastante comuns e altamente polimórficos, assim, a escolha de um elevado número de marcadores polimórficos entre duas linhagens está atualmente bastante facilitada (BROMAN et al., 2003).

Para mapear QTLs cruzam-se duas linhagens isogênicas que apresentem uma diferença bem acentuada para a característica em estudo. Deste cruzamento resulta uma geração F_1 que é inter cruzada de forma a obter uma geração F_2 , onde se espera que a recombinação genética conduza à segregação do fenótipo. Os indivíduos F_2 (em número elevado) são depois analisados para o fenótipo e genotipados para cada um dos marcadores escolhidos, de modo a cobrir todo o genoma murino. Se o(s) QTL(s) estiver(em) em associação com algum dos

marcadores genotípicos, então é possível observar uma distorção das médias fenotípicas em função do genótipo apresentado no marcador.

Distribuições fenotípicas normais em função dos genótipos. A) Situação em que não existe associação entre o genótipo e o fenótipo B) Exemplo em que existe associação entre o genótipo e o fenótipo.

Se o marcador não está em associação com o QTL, então a média fenotípica é indiferente do genótipo no *locus* marcador (Figura A). Se existe associação entre o QTL e o marcador, observa-se uma alteração da média fenotípica quando se altera o genótipo do *locus* marcador (Figura B). A diferença observada nos valores médios do fenótipo depende da força do efeito do QTL e do grau de associação entre este e o marcador (quanto maior a proximidade entre estes dois *loci* maior a distorção nos valores médios fenotípicos).

A análise da localização do QTL no genoma e o grau de associação ao fenótipo é realizada posteriormente por intermédio de testes probabilísticos. O R/qtl consiste num pacote de *software* estatístico que inclui funções para determinar mapas genéticos, identificar erros de genotipagem e realizar varreduras no genoma por diferentes métodos. O R/qtl destina-se sobretudo ao mapeamento de QTLs em populações experimentais derivadas de linhagens puras (MOORE & NAGLE, 2000, BROMAN et al., 2003).

4. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL:

Identificação dos fatores envolvidos na suscetibilidade à patologia na doença de Chagas experimental.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

a) identificar as linhagens murinas que desenvolvem um maior e menor grau da patologia crônica quando infectadas por parasitas do clone X10/4 da cepa Sylvio de *T. cruzi*.

b) estudar a resposta imune a este parasita nas linhagens de camundongos que exibam uma maior polaridade em relação à patologia.

c) caracterizar os possíveis genes ou regiões gênicas envolvidas no estabelecimento da patologia na fase crônica da doença.

5. MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 Abordagem experimental

Com o objetivo de escolher um modelo experimental que permita a análise dos elementos (fenótipos e genes) envolvidos no desenvolvimento da patologia, camundongos das linhagens BALB/c, C57Bl/6, A/J, DBA e C3H/HePAS foram infectados por parasitas da cepa Silvio de *T. cruzi*. Meses após a infecção, os animais foram sacrificados para análise histopatológica dos diferentes órgãos.

Numa segunda etapa, animais das linhagens mais díspares em termos de patologia (maior e menor nível de patologia na fase crônica) foram analisados em relação aos seguintes parâmetros imunológicos e parasitológicos:

- a) análise da parasitemia, direta ou indireta de animais crônicos por meio de ensaio de transferência de sangue e homegenizados de tecido para o meio LIT.
- b) análise histopatológica do coração, fígado e músculo esquelético.
- c) análise do coração e fígado em relação a:
 - expressão das quimiocinas MIP1 α , MIP1 β , RANTES, C10, JE, cKINE, ITAC, MIG, IP-10 e Fractaline por ensaios de PCR em tempo real.
 - celularidade diferencial hepática e cardíaca, através do ensaio de citometria de fluxo para diferentes marcadores (CD4⁺, CD8⁺, CD69, CD45R⁺(B220), CD3⁺, Mac1, Ly-6G e TCR $\gamma\delta$).

Em uma terceira etapa será realizada a análise gênica, abordada através da amplificação por PCR de regiões de DNA microsatélites dos animais F₂ e posterior estudo das correlações existentes entre patologia, parâmetros imunológicos e determinados *loci* gênicos, na tentativa de definir os elementos imunológicos e não imunológicos que participam no desenvolvimento da patologia.

5.2 Animais

Camundongos fêmeas e machos das linhagens isogênicas A/J, C3H/HePAS, BALB/c, DBA/2, C57BL/6, F₁ (C3H/HePAS X A/J), F₁ (A/J X C3H/HePAS), F₂ (A/J X C3H/HePAS) e animais deficientes (knock out, KO) para

IL-12, IFN γ ou iNOS (todos eles no “background” de C57BL/6) com 6 a 8 semanas de idade, obtidos do Biotério de Camundongos Isogênicos, ICB/USP, São Paulo.

5.3 Manutenção da cepa de *T. cruzi*

A cepa Sylvio (clone X10/4) de *Trypanosoma cruzi* foi originalmente obtida na Escola Paulista de Medicina (UNIFESP) e os parasitas foram mantidos por meio de passagens semanais em monocamadas de células LLC-MK₂ (American Type Culture Collection - ATCC - CCL7.1).

5.4 Infecção

Camundongos foram infectados i.p. com 10⁶ parasitas, posteriormente foram sangrados e sacrificados durante a fase crônica da doença, do dia 120 ao 600 pós-infecção.

5.5 Avaliação das parasitemias na fase aguda

As parasitemias foram avaliadas na fase aguda da infecção através do exame a fresco de gota de sangue obtida pela secção da cauda. As determinações de parasitemia foram feitas pelo método descrito por (BRENER, 1962).

5.6 Avaliação das parasitemias na fase crônica

A presença de parasitas no sangue, fígado e coração foi detectada em alíquotas de sangue ou tecido homogeneizado cultivados em triplicatas, a 28^o C, por um mês, em meio LIT. Para evitar que as amostras de tecido cardíaco e hepático pudessem ser contaminadas com parasitas presentes no sangue, todos os animais foram perfundidos através da veia cava inferior. Esta foi seccionada sobre o diafragma e conectada através do ventrículo esquerdo a uma bomba de

infusão de duas seringas KDS 200 (KD Scientific, New Hope, PA), que infundia PBS estéril por 5 minutos, a um fluxo de 2 mL/minuto.

5.7 Obtenção de formas tripomastigotas de cultura e preparo de antígeno de *T.cruzi*

As formas tripomastigotas de *T.cruzi* foram obtidas do sobrenadante de monocamadas de células LLC-MK₂ infectadas (American Type Culture Collection - ATCC - CCL7.1). Os parasitas provenientes destas culturas foram lavados 3 vezes em PBS estéril, por centrifugação (1900 g, 20 min, 4⁰C) e ressuspensos na concentração de 10⁹ parasitas/mL. Em seguida, cada alíquota foi submetida a 10 ciclos de congelamento e descongelamento como descrito por (CUROTTO DE LAFAILLE et al., 1990). As amostras foram armazenadas a -80⁰C e a concentração protéica foi da ordem de 2,5 mg/mL para as suspensões de 10⁹ parasitas/mL.

5.8 Dosagem de anticorpos anti-*T. cruzi*

Para dosagem dos anticorpos específicos anti-*T. cruzi* no soro de camundongos cronicamente infectados utilizamos o ensaio de ELISA descrito por (AVRAMEAS et al., 1979), com algumas modificações. Para a sensibilização das placas, foram utilizados 50µL de antígeno de *T. cruzi* (20µg/mL) diluído em tampão de carbonato/bicarbonato 0.05M pH 9.6. As placas foram incubadas por 18 h a 4⁰C. Após 3 lavagens sucessivas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (Sigma Chemical Co, MO, EUA), de 5 minutos cada uma, as placas foram saturadas, por 60 minutos, com 200µL de PBS-Tween contendo 3% de BSA. Após novas lavagens, foram adicionados a cada orifício, 50µL das diluições de cada soro, feitas em PBS-Tween contendo 1% de BSA (diluições: 1:200, 1:400 e 1:800 para IgG1; 1:3200, 1:6400 e 1:25600 para IgG2a); seguido de incubação de 1 h a temperatura ambiente. Após novos ciclos de lavagem, a presença de anticorpos específicos contra o parasita foi revelada adicionando-se anticorpos de cabra anti-

IgG1 e anti-IgG2a de camundongo conjugados a biotina, seguido por adição de avidina conjugado a peroxidase (Gibco BRL, New York, USA), diluída 1/1000 em PBS-Tween com 1% de BSA. Por fim, as placas foram lavadas mais uma vez como já descrito, e 50 μ L de uma solução contendo o substrato H_2O_2 e o cromógeno OPD dissolvidos em tampão citrato 0,028M / fosfato de sódio 0.044M foram colocados. A reação foi bloqueada com ácido cítrico 0,2M e a leitura foi realizada a 450nm em leitor de ELISA MR 5000 (Dynatech). Todos os anticorpos foram adquiridos de Southern Biotechnologies Associates (Birmingham, USA).

5.9 Histopatologia

Os animais foram anestesiados, sangrados por punção cardíaca até a morte e seus órgãos foram imediatamente coletados e fixados por 24 h em solução de formaldeído tamponado a 10%, sendo posteriormente processados para inclusão em blocos de parafina. O coração foi cortado sagitalmente em duas partes, cada uma contendo as quatro cavidades. Seis cortes sagitais de 5 μ m, não consecutivos, foram obtidos do coração, fígado e do músculo esquelético (quadríceps), corados por hematoxilina-eosina e posteriormente analisados na sua totalidade por microscopia óptica. Para mensuração das lesões, utilizou-se um microscópio Olympus (Olympus Optical Co, Tokyo, Japan) acoplado a uma câmera de vídeo conectada a um sistema de análise de imagens computadorizado (Image Pro Plus Media Cybernetics, Silver Spring, MD). Após a calibração do sistema com uma régua Zeiss de 2 mm, cada lesão foi delimitada com uma caneta eletrônica e sua área imediatamente calculada. A soma das áreas dos infiltrados foi calculada para cada camundongo e os valores individuais foram expressos em μm^2 de infiltrado inflamatório por mm^2 de área examinada.

5.10 Meios de cultura

Para o isolamento e processamento de células foram utilizados os meios de cultura RPMI 1640 (Gibco BRL, New York, USA) contendo 25 mM de HEPES e 15% FCS (Cultilab).

Para o processamento de células nos ensaios de citometria de fluxo foi usado PBS suplementado com 1% de FCS e 0,05% de azida sódica (Sigma Chemical Co, MO, EUA).

5.11 Isolamento de leucócitos sanguíneos

Cada camundongo foi anestesiado com CO₂ e em seguida foi sangrado por punção cardíaca com uma seringa contendo 40µl de EDTA 0,2M. Um volume de 0,4 mL de sangue foi misturado com 1 mL de meio de cultura, homogeneizado lentamente e transferido para um tubo contendo 1,5 mL de Lympholyte M (Cederlaine, Ontário, Canadá). O tubo foi então centrifugado (20 minutos, a temperatura ambiente, 1500 x g) e em seguida as células que estavam presentes na interface formada entre o meio e o Lympholyte M foram retiradas com a ajuda de uma pipeta Pasteur. Adicionou-se às células, 5 mL de meio de cultura e logo em seguida, foram centrifugadas (10 minutos, 4°C, 800 x g). O sobrenadante foi descartado e o pellet, ressuspendido em 0,5 mL de meio de cultura, as células foram posteriormente contadas e plaqueadas.

5.12 Isolamento de leucócitos cardíacos

Cada camundongo foi anestesiado com CO₂ e em seguida o animal foi perfundido com 5 mL de PBS a 4°C. Foi feita uma incisão na veia cava inferior sobre o diafragma, conectando o ventrículo direito a uma bomba de infusão de duas seringas KDS 200 (KD Scientific, New Hope, PA), que infundia PBS estéril por 5 minutos, a um fluxo de 2 mL/minuto. O coração foi removido e cortado cuidadosamente em pequenos pedaços que foram transferidos para uma placa de Petri contendo 5 mL de meio RPMI com collagenase (Sigma Chemical Co, MO,

EUA) na concentração de 1mg/mL. A placa de Petri foi mantida sob agitação durante 60 minutos, a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂. Em seguida, os fragmentos foram homogeneizados em 5 mL de meio RPMI com a ajuda de uma peneira de aço e transferidos para um tubo contendo 5 mL de Lympholyte M (Cederlaine, Ontário, Canadá). O tubo foi então centrifugado (20 minutos, a temperatura ambiente, 1500 x g) e em seguida as células que estavam presentes na interface entre o meio e o Lympholyte M foram retiradas com a ajuda de uma pipeta Pasteur. As células foram colocadas em 5 mL de meio RPMI contendo 3% de FCS e centrifugadas (10 minutos, 4°C, 800 x g). O sobrenadante foi descartado e o pellet, ressuspensionado em 0,5 mL de meio RPMI contendo 3% de FCS; as células foram posteriormente contadas e plaqueadas.

5.13 Isolamento de leucócitos intra-hepáticos

O isolamento de leucócitos intra-hepáticos foi realizado segundo o método descrito por CRISPE (1996), com algumas modificações. Cada camundongo foi sacrificado por narcose com CO₂ e em seguida seu abdômen e a caixa torácica foram expostos. O animal foi perfundido com 5 mL de PBS estéril a 4°C injetado diretamente no ventrículo esquerdo, após incisão da veia cava inferior sobre o diafragma. Posteriormente, o fígado foi extraído, separadamente da vesícula biliar, e cortado cuidadosamente em pequenos pedaços e em seguida homogeneizado com a ajuda de um peneira de aço e um êmbolo de seringa.

O homogeneizado foi transferido para um tubo de 50 mL ao qual se adicionou 40 mL de meio de cultura com 5% FCS. Em seguida, o tubo foi centrifugado (10 minutos, 4°C, 300 x g) e o sobrenadante que continha essencialmente debris celulares descartado. O pellet foi então ressuspensionado em 10 mL de meio de cultura contendo 0,02% de colagenase (hepatocyte qualified, Gibco, USA) e 1% de FCS, permanecendo durante 40 minutos a 37°C sob agitação. Adicionou-se 30 mL de meio de cultura, novamente o tubo foi

centrifugado (3 minutos, 4°C, 30 x g), descartando-se em seguida o pellet que continha grandes fragmentos de tecido hepático não dissociado.

O sobrenadante contendo linfócitos, células de Kupffer e hepatócitos foi centrifugado (10 minutos, 4°C, 300 x g) e o pellet, ressuspensionado em 1,6 mL de meio de cultura mais 2,4 mL de uma solução de PBS com 40% de metrizamida. A solução foi homogeneizada gentilmente, e sobre a mistura adicionamos vagarosamente 1 mL de meio de cultura, de modo a se formar um gradiente descontínuo de densidade.

Este gradiente foi centrifugado (20 minutos, 4°C, 1500 x g). As células foram retiradas da interface formada entre a metrizamida e o meio e posteriormente centrifugadas (10 minutos, 4°C, 400 x g) com um volume de meio de cultura 10x superior ao retirado da interface de meio de cultura. O pellet contendo os linfócitos intra-hepáticos, poucos hepatócitos e hemácias, foi ressuspensionado em meio de cultura; o número de células obtidas foi determinado por contagem em hemocitômetro (câmara de Neubauer).

5.14 Anticorpos e conjugados fluorescentes

Foram utilizados nos experimentos os seguintes anticorpos dos respectivos clones conjugados a FITC (fluoresceína), PE (ficoeritrina), CyChrome ou biotina obtidos da companhia Pharmingen (San Diego, USA): anti-CD4 (H129.19), anti-CD8 α (53-6.7), anti-CD45R/B220 (clones RA3-6B2), anti-CD69 (H1.2F3), anti-CD3 (145-2C11), anti-CD11b Mac-1(M1/70), anti-TCR $\gamma\delta$ (GL3) e anti-Ly6G (RB6-8C5). Em alguns experimentos foram utilizados conjugados fluorescentes estreptoavidina-ficoeritrina (SA-PE) e/ou estreptoavidina-cyochrome (SA-Cy).

5.15 Citometria de fluxo (FACS)

Células do sangue, baço, fígado ou coração foram distribuídas em placas de cultura de 96 poços com fundo em U (Corning, New York, USA) na concentração de 5×10^5 células/100 μ L/ poço. Após a centrifugação (5 minutos,

4°C, 250 g), o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 0,5 µg de anticorpos anti-CD16/CD32 (Fc Block). As placas de cultura foram mantidas a 4°C por 20 minutos e posteriormente, foram adicionados os anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos FITC, PE, CyChrome ou APC em concentrações ótimas previamente estabelecidas. A seguir, as amostras foram reincubadas a 4°C por 30 minutos em local com pouca luminosidade, e então foram lavadas com uma solução de PBS suplementada com 1% de FCS e 0,05% de azida sódica por 3 vezes e ressuspensas em 0,5 mL de uma solução de PBS em tubos de poliestireno de fundo em U (Falcon - Becton Dickinson, Mountain View, USA). As suspensões de células marcadas foram analisadas em um citômetro de fluxo (FACScan - Becton Dickinson, Mountain View, USA), de acordo com a intensidade de fluorescência (FL1, FL2, FL3 e FL4), a dispersão frontal (FSC) e lateral (SSC) do feixe luminoso. A distribuição de FSC e SSC das células foi analisada a fim de se determinar a porcentagem de células blásticas nas diferentes subpopulações bem como sua granulosidade.

5.16 Extração de RNA mensageiro e conversão para cDNA

Amostras de tecido cardíaco e hepático de animais cronicamente infectados foram cuidadosamente seccionadas. Posteriormente, foi adicionado 0,5 mL de Trizol (Gibco BRL, New York, USA) mediante agitação em vórtex. A seguir foi adicionado 0,1 mL de clorofórmio com nova agitação por 10 segundos. Os tubos contendo as amostras foram incubados no gelo por 10 minutos, com posterior centrifugação a 12.000g por 10 minutos. Após a centrifugação, a fase aquosa foi retirada e transferida para um novo tubo, ao qual foi adicionado 0,25 mL de isopropanol, com agitação no vórtex por 10 segundos. A seguir as amostras foram incubadas por 45 minutos a -20°C, e posteriormente centrifugadas a 12.000 g por 15 minutos. Finalmente, o sobrenadante foi retirado e desprezado, e ao pellet foi adicionado 1 mL de etanol 75% com nova centrifugação a 12.000 g por 10 minutos. Novamente, o sobrenadante foi desprezado e o pellet final contendo o RNA foi ressuspensado em 30 µL de água livre de ribonucleases (ou DEPC).

Após o processo de extração, 20 μL do RNA diluído foram transferidos para tubos eppendorf de 0,5 mL com adição de 0,75 μg de oligo dT₁₂₋₁₈ por amostra, sob leve agitação. As amostras foram então aquecidas a 70°C por 10 minutos. Após este passo, adicionou-se a cada amostra, 10 μL do seguinte mix: 1,5 μL de água livre de ribonuclease, 3 μL de tampão de síntese, 1,5 μL de dNTP 10 mM, 3 μL de DTT 0,1 M e 1 μL de Superscript R/T (200U/ μL). Todos os reagentes descritos foram obtidos da companhia Life Technologies. Em seguida, as amostras foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente, por 50 minutos a 40°C, por mais 5 minutos a 90°C e mais 5 minutos a 4°C. Após este passo, foram adicionadas 2 U de RNase H em cada tubo com posterior incubação a 37°C por 20 minutos. O cDNA resultante desse processo foi então estocado a -20°C até a data de sua utilização nos experimentos de PCR em tempo real.

5.17 Quantificação de RNAm por PCR em tempo real (Real Time PCR)

As amostras de RNAm extraídas de tecido cardíaco e hepático de animais controle e cronicamente infectados foram analisadas no termociclador ABI PRISM 7000 Sequence Detection System (Applied Biosystems). O protocolo foi conduzido segundo as orientações técnicas do fabricante. Em suma, 15 ng de cDNA total (volume de 10 μL) oriundo da conversão de mRNA extraído de tecido cardíaco e hepático foi misturado a 15 μL do mix reagente SYBR Green (Applied Biosystems) juntamente com 5 μL de primers especialmente construídos para uma temperatura de anelamento de 60°C, específicos para quimiocinas, totalizando um volume final de 30 μL . Cada amostra foi preparada em placa de 96 poços de fundo cônico (Applied Biosystems) e todas foram transferidas para o termociclador ABI PRISM 7000 programado como segue: 1º ciclo) 50°C, 2 min. 2º ciclo) 95°C, 10 min. 3º ciclo) 95°C, 15 seg. (com 40 repetições), 60°C, 1 min. e 72 °C, 2 min.. Esta técnica é um método semiquantitativo de detecção de RNA mensageiro, portanto os valores obtidos são expressos em unidades arbitrárias e são calculados em relação à expressão de genes constitutivos como por exemplo HPRT, β -actina, ubiquitina entre outros. Essa análise é realizada na fase de amplificação da

reação de PCR, onde ocorre a duplicação das quantidades de cDNA a cada ciclo (nessa fase verifica-se uma progressão geométrica de quociente = 2). Os valores (normalizados) são obtidos através da função logarítmica da diferença entre o valor de um ponto da curva de amplificação do cDNA do gene constitutivo (em nosso caso a ubiquitina) e um ponto da curva de amplificação do cDNA do gene de uma quimiocina, segundo a seguinte fórmula:

$$\log_2^{a-b} = x$$

Onde:

a = ponto limiar da curva de amplificação do cDNA de ubiquitina (Ct - curve threshold).

b = ponto limiar da curva de amplificação do cDNA de cada quimiocina.

x = valor arbitrário relativo à expressão do gene de ubiquitina.

5.18 Extração de DNA genômico

O DNA genômico foi preparado a partir de uma porção da cauda dos camundongos (aproximadamente 1,5 cm). As caudas foram incubadas durante a noite com 1% de proteinase K (Sigma Chemical Co, MO, EUA) em tampão de digestão (100mM Tris HCl pH8; 5mM EDTA; 0,2% SDS; 200mM NaCl) a 55°C. Após digestão, as amostras foram centrifugadas durante 15 minutos a 14.000 rpm. O DNA foi precipitado em 0,7 v/v de isopropanol; em seguida as amostras foram secas a temperatura ambiente durante 40 minutos e posteriormente, diluídas em 500 µL de água.

5.19 Análise dos marcadores genômicos

Os animais da geração F₂ foram genotipados para 64 marcadores de DNA microssatélites polimórficos entre as linhagens parentais A/J e C3H/HePAS. Os

marcadores foram escolhidos de acordo com a sua posição cromossomal, obtida através do Witehead/MIT Center for Genome Research collection (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse/index) de modo a cobrir todo o genoma autossômico do camundongo.

Os genótipos foram determinados por amplificação dos marcadores por PCR utilizando um termociclador PTC-100™ (MJ Research, Inc.). Para cada reação de PCR foram utilizados 100ng do DNA genômico, 0,5μM de cada primer, 2,5 U de enzima Taq DNA polimerase (Gibco BRL, New York, USA) e 2,5μM de dNTP em tampão contendo 1,5mM de MgCl₂ (Gibco BRL, New York, USA). As amplificações desses marcadores foram realizadas sob as seguintes condições: 1 ciclo de 94°C por 2 minutos; 35 ciclos de 94°C por 30 segundos (desnaturação do DNA), 57°C por 35 segundos (anelamento do DNA), 72°C por 45 segundos (extensão do DNA) e 1 ciclo de 72°C por 2 minutos.

Os fragmentos amplificados foram separados em gel de agarose a 4% (2% Nusieve GTG agarose + 2% Seakem LE agarose (Sigma Chemical Co, MO, EUA) e corados com brometo de etídeo. Os produtos foram detectados por visualização sob iluminação ultravioleta. Os animais foram classificados como homozigóticos para o alelo A/J, homozigóticos para o alelo C3H/HePAS, ou heterozigóticos.

5.20 Análise estatística

Para análise comparativa entre os grupos experimentais, adotamos os testes *t* de Student para duas variáveis assumindo igual variância. Os níveis de significância foram definidos como sendo iguais ou inferiores a 0,05 ($p < 0,05$).

A associação genética dos differences fenótipos estudados foi analisada através do teste de X^2 sobre tabelas de contingência. Foi considerado como um sugestivo “linkage” valores de $P < 0,0016$.

6. RESULTADOS

6.1 ESCOLHA DO MODELO EXPERIMENTAL

Visando a caracterização dos genes do hospedeiro que favorecem o desenvolvimento da patologia cardíaca crônica, procuramos um modelo experimental murino no qual diferentes indivíduos exibissem diversos graus de lesão cardíaca. Com este objetivo avaliamos a infecção pelo clone X10/4 da cepa Sylvio de *T. cruzi* em várias linhagens de camundongos. A escolha deste parasita tinha como vantagens o fato de se tratar de um clone, e dessa forma evitaríamos as eventuais complicações decorrentes da heterogeneidade do parasita, e o fato da infecção passar diretamente para a fase crônica, o que permitiria minimizar os efeitos da fase aguda (heterogeneidade das linhagens em relação à resistência ao parasita que poderia resultar em cargas parasitárias muito diferentes).

Em uma primeira etapa, realizamos uma análise histopatológica para identificar as linhagens murinas que desenvolvem maior e menor grau de patologia na fase crônica da doença. Em seguida estudamos a resposta imune ao clone Sylvio-X10/4 de *T. cruzi* nas linhagens de camundongos que exibiram uma maior polaridade em relação à patologia. E por último, iniciamos os estudos de caracterização dos possíveis genes envolvidos, estudando camundongos F₂ obtidos do cruzamento das linhagens polares por meio de uma análise múltipla, procurando estabelecer correlações entre elementos imunológicos, genes (ou grupos de genes) e histopatologia.

6.2 ESTUDOS HISTOPATOLÓGICOS, PARASITOLÓGICOS E CURVA DE MORTALIDADE EM CAMUNDONGOS CRÔNICOS DE DIFERENTES LINHAGENS ISOGÊNICAS

6.2.1 Histopatologia do coração, fígado e músculo esquelético em camundongos cronicamente infectados com cepa Sylvio-X10/4

Diferentes linhagens de camundongos isogênicos foram infectadas com 10^6 tripomastigotas da cepa Sylvio (clone X10/4) de *T. cruzi*. No dia 200 de infecção os animais foram sacrificados e seus órgãos, coletados para análise histopatológica. O estudo morfométrico dos infiltrados inflamatórios do coração, fígado e músculo esquelético revelou três padrões distintos de patologia nas diferentes linhagens estudadas (**Fig. 1**). O primeiro padrão de lesões foi observado nas linhagens de camundongos A/J, C57BL/6 e BALB/c. Estes animais apresentavam vários graus de lesões inflamatórias no fígado e músculo esquelético e ausência de patologia no coração. Os animais C3H/HePAS apresentavam um padrão oposto, caracterizado por lesões inflamatórias intensas no coração, moderadas no músculo esquelético e praticamente ausentes no fígado. O terceiro padrão estava presente nos camundongos DBA/2, onde se observaram apenas lesões discretas nos três órgãos estudados.

A análise de secções do coração de animais C3H/HePAS revelou uma maior intensidade das lesões cardíacas quando comparado às outras linhagens que apresentaram lesões discretas ou ausência de lesões (**Fig. 1**). A patologia cardíaca nos camundongos C3H/HePAS foi caracterizada por intensa miocardite, pericardite e endocardite em ambos os ventrículos e átrios (**Fig. 2a-b**). Nos infiltrados inflamatórios predominavam células mononucleadas e pontos de degeneração vacuolar foram também observados nas fibras do miocárdio (**Fig. 2a-b**).

Dados provenientes de 23 camundongos C3H/HePAS e 24 camundongos A/J sacrificados entre os dias 120 e 600 de infecção revelaram que a média das áreas do coração ocupadas com infiltrados inflamatórios (expressa em μm^2 por mm^2 de tecido cardíaco) foi respectivamente 2981 ± 639 e $289 \pm 84 \mu\text{m}^2$ para o miocárdio, 7175 ± 3127 e $109 \pm 53 \mu\text{m}^2$ para o pericárdio e 619 ± 199 e $85 \pm 33 \mu\text{m}^2$

Figura 1. Intensidade de inflamação no coração, fígado e músculo esquelético (quadríceps) de camundongos de diferentes linhagens na fase crônica da doença de Chagas Experimental. Grupos de cinco animais foram infectados via intraperitonal com 10^6 tripomastigotas da cepa Sylvio de *T. cruzi* e no dia 200 de infecção os infiltrados foram quantificados como descrito nos materiais e métodos. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais de 5 animais.

Figura 2. Histopatologia do coração, fígado e músculo esquelético (quadríceps) de camundongos A/J e C3H/HePAS na fase crônica da doença de Chagas Experimental. Os animais foram infectados via intraperitoneal com 10^6 tripomastigotas da cepa Sylvio-X10/4 de *T. cruzi* e após o dia 200 de infecção foram sacrificados como descrito nos materiais e métodos. Camundongos infectados C3H/HePAS desenvolvem intensa patologia cardíaca, com infiltrados inflamatórios no pericárdio e miocárdio compostos predominantemente de células mononucleadas (**A**), enquanto que não se observam lesões inflamatórias no coração dos camundongos A/J (**B**). Ausência de lesões no fígado de animais C3H/HePAS (**C**), e intensa inflamação no tecido hepático de camundongos A/J (**D**). As figuras **E** e **F** mostram infiltrados de diferentes intensidades na musculatura estriada esquelética de animais C3H/HePAS e A/J, respectivamente. As barras correspondem a 50 μ m. H&E.

para o endocárdio (**Tabela I**). Áreas focais de fibrose foram também observadas próximas aos infiltrados (**Fig. 3**).

Pseudocistos de amastigotas foram observados em 13,04% das secções cardíacas dos animais C3H/HePAS (3 de 23 animais, **Tabela II**), mas não foram detectados em nenhuma secção cardíaca dos animais A/J (0 de 24 animais, **Tabela II**), ou C57BL/6, BALB/c ou DBA/2 (dados não mostrados). Todos os pseudocistos observados no coração dos camundongos C3H/HePAS eram aparentemente viáveis e não mostravam sinais de degeneração. Na grande maioria das vezes estavam localizados em áreas distantes dos infiltrados inflamatórios sendo aparentemente ignorados pelo sistema imunológico (**Fig. 4**).

O fígado dos animais A/J apresentou intensa hepatite (com menor gravidade nos animais C57BL/6 e BALB/c) (**Fig. 1**) caracterizada pela presença de infiltrados inflamatórios focais e em algumas vezes periportais, predominantemente compostos por células mononucleadas (**Fig. 2c-d**). Não foram observadas lesões hepáticas nos camundongos cronicamente infectados C3H/HePAS e DBA/2. De forma interessante, apesar da intensa hepatite, não observamos a presença de pseudocistos no fígado dos camundongos A/J cronicamente infectados (**Tabela II**) ou em nenhuma outra linhagem estudada (dados não mostrados).

A musculatura estriada esquelética dos animais A/J, C3H/HePAS e C57BL/6 cronicamente infectados mostrou moderado grau de miosite e degeneração de fibras (**Fig. 1, Fig. 2e-f**). Quando comparadas estas três linhagens, os animais A/J foram os que apresentaram a maior frequência e intensidade de infiltrados inflamatórios. No músculo esquelético, pseudocistos foram observados apenas em 1 dos 21 animais A/J cronicamente infectados (4,8%), enquanto que ninhos de amastigotas não foram observados em nenhum animal C3H/HePAS (**Tabela II**) ou em qualquer animal das outras linhagens estudadas (dados não mostrados).

O estudo histopatológico das cinco linhagens estudadas revelou uma predominância de lesões inflamatórias nas linhagens C3H/HePAS e A/J que exibiram um claro e distinto padrão de patologia como ilustrado na **Figura 5. A**

Tabela I. Intensidade de lesão no coração, músculo estriado e fígado em camundongos cronicamente infectados com *T. cruzi*

GRUPO CRÔNICO ^a	CORÇÃO ^b				MÚSCULO ^b	FÍGADO ^b
	pericardite	miocardite	endocardite	TOTAL	miosite	hepatite
C3H	7175±3127	2981±639	616±199	10770 ± 3967 ^c	461 ± 169	331 ± 57
A/J	109±53	298±84	85±33	483 ± 99	1656 ± 476 ^c	9185 ± 4356 ^c

^a Os camundongos foram infectados com 10^6 formas tripomastigotas de *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4 e sacrificados entre os dias 120 e 600 de infecção.

^b Valores de miocardite, pericardite, endocardite, infiltrado inflamatório total, miosite e hepatite foram expressos como média ± desvio padrão dos dados individuais dos camundongos em μm^2 de infiltrado inflamatório / mm^2 de tecido.

^c $p < 0,05$ comparado com o outro grupo (As médias de cada grupo foram comparadas através do teste *t* de Student; n:23-24 camundongos por grupo).

Figura 3. Fibrose intersticial no pericárdio e miocárdio de um camundongo C3H/HePAS infectado por 200 dias com 10^6 formas tripomastigotas da cepa Sylvio-X10/4 de *T. cruzi*. Tricrômico de Masson. Aumento 20X.

TABELA II: Parasitismo tissular na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*

	Coração	Fígado	Músculo estriado	Sangue
Presença de pseudocistos ^a				
A/J	0%(0/24)	0%(0/24)	4,8%(1/21)	-
C3H	13,0%(3/23)	0%(0/23)	0%(0/20)	-
Culturas positivas ^b				
A/J	0%(0/14)	0%(0/14)	ND	28,6%(4/14)
C3H	38,5%(5/13)	0%(0/13)	ND	38,5%(5/13)

^a pseudocistos foram observados por microscopia óptica de cortes corados com Hematoxilina-eosina.

^b a presença de *T. cruzi* nos tecidos foi evidenciada por culturas de homogenatos de tecido em meio LIT, como descrito nos materiais e métodos.

ND: não detectado.

Figura 4. Pseudocisto presente no miocárdio de um camundongo C3H/HePAS infectado por 200 dias com 10^6 formas tripomastigotas da cepa Sylvio-X10/4 de *T. cruzi*. No canto superior direito detalhe do pseudocisto ampliado. A barra corresponde a 50 μ m. H&E. Aumento, 20X.

Figura 5. Intensidade de inflamação no coração, fígado e músculo esquelético de camundongos A/J e C3H/HePAS na fase crônica da doença de Chagas experimental. Os animais foram infectados via intraperitoneal com 10^6 tripomastigotas da cepa Sylvio de *T. cruzi* e entre os dia 120 e 600 de infecção os infiltrados foram quantificados como descrito nos materiais e métodos. Cada barra representa a média dos valores individuais de 23-24 animais.

patologia nos animais C3H/HePAS atingiu o tecido cardíaco enquanto que nos animais A/J o fígado foi o órgão preferencialmente afetado. Não foram observadas diferenças de intensidade de patologia entre machos e fêmeas de camundongos cronicamente infectados A/J ou C3H/HePAS.

6.2.2 Taxa de mortalidade nos camundongos C3H/HePAS e A/J cronicamente infectados

A polaridade observada na distribuição das lesões cardíacas e hepáticas observada nos camundongos C3H/HePAS e A/J fez com que concentrássemos nossos estudos nestas duas linhagens. Para verificar se o tempo de sobrevivência dos camundongos poderia ser alterado em função da diferente patologia, os camundongos C3H/HePAS e A/J cronicamente infectados foram acompanhados durante vinte meses. Como mostrado na **Figura 6**, os animais C3H/HePAS cronicamente infectados exibiram uma alta frequência de mortalidade com 63% dos camundongos mortos após 600 dias de infecção, enquanto que os animais A/J exibiram apenas 20% de mortalidade, valor similar aos obtidos dos camundongos controle não infectados de ambas as linhagens (dados não mostrados). A maior parte das mortes de ambas as linhagens ocorreu após o dia 350 de infecção. A alta frequência de mortalidade nos camundongos C3H/HePAS se deve provavelmente ao intenso comprometimento cardíaco observado nesta linhagem.

6.2.3 Avaliação da carga parasitária na fase aguda e crônica da infecção

A infecção pelo clone Sylvio-X10/4 de *T. cruzi* ocorre sem uma fase aguda evidente. A parasitemia dos animais infectados foi avaliada durante várias semanas através da análise a fresco do sangue. Nas duas linhagens as parasitemias foram sistematicamente negativas, exceto em um ou outro animal onde se observou a rara presença de um único parasita (dados não mostrados).

Figura 6. Curva de mortalidade de camundongos C3H/HePAS e A/J infectados via intraperitoneal com 10^6 tripomastigotas da cepa Sylvio de *T. cruzi*. Vinte animais por grupo. A frequência de mortalidade dos animais controle não infectados de ambas as linhagens foi de 20%.

Na tentativa de verificar se a patologia diferente observada nos animais C3H/HePAS e A/J estava associada aos níveis de parasitismo tecidual, fizemos a recuperação dos parasitas a partir de tecidos no meio LIT. Este é um método capaz de detectar nos tecidos, pequenas quantidades de parasitas viáveis. Amostras de sangue ou de macerado de tecidos (previamente perfundidos com PBS) de coração e fígado dos animais cronicamente infectados foram mantidos em cultura durante mais de um mês. Os resultados mostraram que 38,5% das amostras de tecido cardíaco dos camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados apresentavam parasitas viáveis, enquanto que nenhuma amostra proveniente de camundongos A/J mostrou-se positiva (**Tabela II**). Curiosamente, as amostras de sangue dos animais C3H/HePAS e A/J cronicamente infectados apresentaram culturas positivas com frequências similares (28,6% e 38,5%, respectivamente), um indicativo de que os níveis de parasitas sistêmicos nas duas linhagens não são muito diferentes. Por outro lado, concordando com a ausência de pseudocistos no tecido hepático dos animais cronicamente infectados, não houve recuperação de parasitas a partir de amostras de fígado de C3H/HePAS ou A/J no meio LIT. Para descartar a possibilidade deste resultado ser um artefato decorrente da ação inibitória das enzimas proteolíticas do tecido hepático sobre a multiplicação dos parasitas, todas as amostras foram paralelamente testadas acrescidas com 50 tripomastigotas de cultura, o que não resultou em inibição da proliferação dos parasitas (controle positivo).

6.3 ESTUDOS IMUNOLÓGICOS

6.3.1 Caracterização das diferentes populações linfocitárias no coração de camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados

As células inflamatórias e moléculas envolvidas no processo inflamatório local levam ao controle do parasitismo cardíaco, mas também contribuem no desenvolvimento da miocardite crônica induzida pelo *T. cruzi*.

A fim de identificar os elementos envolvidos no desenvolvimento da patologia no coração dos camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados fizemos a caracterização por citometria de fluxo das diferentes populações linfocitárias neste órgão. Este ensaio foi realizado em animais que no dia 500 de infecção apresentavam severa miocardite, com infiltrados inflamatórios constituídos predominantemente por células mononucleadas (**Fig. 7B**).

A distribuição das populações linfocitárias cardíacas foi a seguinte: 5% de linfócitos B (células B220⁺), 22% de linfócitos T CD8⁺, 32% de linfócitos TCD4⁺ e 41% de células CD4⁺CD8⁻B220⁻ (**Fig. 7A e C**). Resultado semelhante foi obtido no dia 350 de infecção. Diferentes grupos têm mostrado resultados controversos com relação à composição celular do infiltrado inflamatório crônico no coração. Assim, em alguns modelos predominam células mononucleadas, em outros, células TCD8⁺ ou células TCD4⁺. Em nosso modelo, as células TCD4⁺ foram a população linfocitária predominante no tecido cardíaco de forma semelhante à mostrada por RIBEIRO DOS SANTOS et al. (1991).

6.3.2 Expressão de RNAm para quimiocinas no coração de animais C3H/HePAS cronicamente infectados

Os animais C3H/HePAS desenvolvem na fase crônica da infecção, uma intensa miocardite, processo inflamatório local que tem sido considerado essencial para a destruição dos parasitas tissulares. Quimiocinas têm sido apontadas como importantes mediadores no recrutamento e ativação de diferentes populações leucocitárias. Assim, para verificar a participação destes mediadores pró-inflamatórios analisamos a expressão de RNAm para diferentes quimiocinas no coração dos animais C3H/HePAS cronicamente infectados. Para efeito de análise, considera-se significativa uma diferença na expressão de RNAm quando os valores arbitrários obtidos nos animais cronicamente infectados são pelo menos 3 vezes maiores ou menores que os valores de referência obtidos no coração dos animais controle.

Figura 7. Composição linfocitária do infiltrado inflamatório no coração de um camundongo C3H/HePAS no dia 500 de infecção. O painel **A** mostra as janelas utilizadas para quantificar as diferentes populações linfocitárias. No painel **B** pode-se observar o aspecto do infiltrado inflamatório cardíaco no dia 500 de infecção (aumento 10X, H&E). O painel **C** mostra a frequência das populações de células TCD4⁺, TCD8⁺, B220⁺ e CD4⁺CD8⁻B220⁻.

Podemos observar que os RNAs mensageiros mais expressos no coração dos animais cronicamente infectados foram os de ITAC, MIG e RANTES (**Fig. 8A-C, Fig. 9**). Os níveis de ITAC e MIG foram aproximadamente 400 vezes superiores àqueles observados nos animais controle, enquanto que a expressão de RANTES estava aumentada em aproximadamente 100 vezes. Também foi observado um aumento de mensagem para IP10, MIP1 β e MIP1 α nos animais cronicamente infectados (**Fig. 8D-F, Fig. 9**). Não foram observadas variações significativas nos níveis de expressão de RNAm para C10, JE e Fractalkine (**Fig. 9**).

6.3.3 Expressão de RNAm para quimiocinas no fígado de animais A/J cronicamente infectados

A expressão de quimiocinas também foi estudada no fígado de camundongos A/J cronicamente infectados. MIG e RANTES foram os RNAs de quimiocinas encontradas em maior quantidade no tecido hepático, tendo seus níveis alterados em relação aos controle 15,5 e 7,3 vezes, respectivamente (**Fig. 10A-B, Fig. 11**). Observamos também um aumento de mensagem para IP-10, ITAC e MIP1 α nos animais cronicamente infectados (**Fig. 10A-B, Fig. 11**). Um fato interessante foi a diminuição da expressão de C10 nos animais crônicos. Esta foi a única quimiocina estudada que teve a expressão de RNAm significativamente diminuída em relação aos controle (**Fig. 10D**). Não foram observadas diferenças entre animais controles e infectados na expressão de RNAm para MIP1 α , JE, 6cKine e Fractalkine (**Fig. 11**).

Figura 8. Variação (aumento ou diminuição) da expressão de RNAm de quimiocinas no coração de camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados em relação aos animais controle. Os animais foram infectados por 200 dias com 10^6 formas tripomastigotas da cepa SylvioX10/4 de *T. cruzi*.

	Controle	Infectado
MIP1 α /CCL3	0,1	1,4
MIP1 β /CCL4	4,3	48,8
RANTES/CCL5	3,0	294,6
C10/CCL6	43,4	72,6
JE/MCP1/CCL2	35,0	84,3
6cKINE/CCL21	20,3	4,4
ITAC/CXCL11	0,1	29,3
MIG/CXCL9	1,8	726,4
IP-10/CXCL10	2,4	89,2
Fract/CX3CL1	8,2	16,9

Figura 9. Valores arbitrários da expressão de RNAm de quimiocinas no coração de camundongos C3H/HePAS controle e cronicamente infectados. Os valores foram calculados e normalizados pela expressão de ubiquitina de cada grupo. Os animais foram infectados por 200 dias com 10^6 formas tripomastigotas da cepa Sylvio-X10/4 de *T. cruzi*. H&E. Aumento, 10X.

Figura 10. Variação (aumento ou diminuição) da expressão de RNAm de quimiocinas do fígado de camundongos A/J cronicamente infectados em relação aos animais controle. Os animais foram infectados por 200 dias com 10^6 formas tripomastigotas da cepa SylvioX10/4 de *T. cruzi*.

	Controle	Infectado
MIP1α/CCL3	0,2	0,1
MIP1β/CCL4	1,2	4,0
RANTES/CCL5	2,9	21,2
C10/CCL6	9,0	1,9
JE/MCP1/CCL2	1,1	2,2
6cKINE/CCL21	0,7	1,1
ITAC/CXCL11	4,4	16,3
MIG/CXCL9	18,0	279,8
IP-10/CXCL10	6,3	27,0
Fract/CX3CL1	0,5	0,5

Figura 11. Valores arbitrários da expressão de RNAm de quimiocinas no fígado de camundongos A/J controle e cronicamente infectados. Os valores foram calculados e normalizados pela expressão de ubiquitina de cada grupo. Os animais foram infectados por 200 dias com 10^6 formas tripomastigotas da cepa Sylvio-X10/4 de *T. cruzi*. H&E. Aumento, 10X.

6.3.4 Análise das populações de leucócitos intra-hepáticos de camundongos cronicamente infectados e o comportamento do fígado do animal crônico após o desafio com o *T. cruzi*

A análise histopatológica do fígado dos animais A/J e C3H/HePAS infectados mostrou que os infiltrados inflamatórios eram mais intensos nos animais A/J. Dando seqüência a estes estudos decidimos realizar a análise da celularidade diferencial dos leucócitos intra-hepáticos nos animais crônicos nestas duas linhagens.

Por outro lado, os nossos resultados relativos à carga parasitária e patologia na fase crônica (**Tabela II**) apóiam a hipótese da persistência local do *T. cruzi* ser o elemento determinante do processo inflamatório crônico no coração e músculo esquelético. Entretanto, ao analisarmos o fígado não pudemos constatar a existência de uma correlação entre a carga parasitária e a patologia. Em nenhum momento parasitas foram detectados no tecido hepático de camundongos cronicamente infectados, nem por exame histológico direto, nem por cultura de tecido do fígado em meio LIT. Mais importante ainda, camundongos A/J cronicamente infectados exibiram uma intensa resposta inflamatória no fígado que não parecia estar associada com a presença de parasitas vivos. Uma possível explicação para estes resultados é que a maior inflamação hepática observada nos camundongos A/J crônicos, ao invés de ser consequência de um parasitismo local mais elevado, seria determinada por uma resposta imune exacerbada aos antígenos de tripomastigotas do sangue que foram removidos e destruídos pelos fagócitos do fígado. Para verificar se esta possibilidade é a correta decidimos incluir no estudo de celularidade diferencial dos animais A/J e C3H/HePAS crônicos, animais crônicos desafiados com *T. cruzi* vivo. Desta maneira, os resultados que seguem correspondem à análise por citometria de fluxo da celularidade diferencial hepática em animais crônicos e animais crônicos que

foram inoculados por 48 horas com 5×10^6 *T. cruzi* via intravenosa. No entanto previamente aos resultados de celularidade diferencial mostraremos a análise histopatológica do fígado nos animais crônicos e animais crônicos desafiados.

Confirmando os achados anteriores, o exame histopatológico dos animais crônicos C3H/HePAS mostrou uma ausência quase que completa de infiltrados leucocitários, sendo que raramente podia ser observado algum infiltrado focal. Já após o desafio, o fígado dos animais C3H/HePAS apresentou alguns acúmulos focais de leucócitos (**Fig. 12 e Tabela III**), mas em número ainda moderado. Por outro lado, em relação aos camundongos da linhagem A/J, o fígado do animal crônico mostrava acúmulos focais de leucócitos, assim como ocasionalmente, algumas áreas de necrose. Este quadro se alterou dramaticamente às 48 horas do desafio, quando o fígado do animal A/J passou a mostrar um aumento no número de infiltrados focais, aparecimento de infiltrados difusos e um aumento das áreas de necrose que apareciam como focos por todo o parênquima hepático (**Fig. 12 e Tabela III**).

Nos animais em que foi realizada a análise histopatológica foi também analisada a celularidade diferencial intra-hepática. Um ano depois de infectados, os animais crônicos A/J e C3H/HePAS mostraram um número total de leucócitos intra-hepáticos aumentado em relação aos animais do grupo controle. Por sua vez, os animais desafiados por 48 horas mostravam mais leucócitos do que os correspondentes grupos crônicos (**Fig 13**). Entretanto, ao compararmos o número total de leucócitos isolados das duas linhagens, não foram observadas as diferenças marcantes que tinham sido evidenciadas no exame histopatológico. Desde modo, as diferenças na celularidade total hepática entre os animais C3H/HePAS e A/J crônicos foram discretas ($8,68 \times 10^6$ e $10,4 \times 10^6$ células/fígado, respectivamente), assim como também foram discretas as diferenças na celularidade dos animais C3H/HePAS e A/J crônicos desafiados por 48 horas ($19,8 \times 10^6$ e $26,05 \times 10^6$ células/fígado, respectivamente).

O fígado dos animais A/J crônicos apresentou um número total de linfócitos TCD4⁺, TCD8⁺ mais elevado do que aquele dos animais C3H/HePAS crônicos (**Fig 14A-B**).

Figura 12. Lesões no fígado de camundongos cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi*. Camundongos A/J e C3H/HePAS foram infectados com 10^6 parasitas. Após um ano de infecção, animais cronicamente infectados foram desafiados por 48h com 5×10^6 tripomastigostas. Posteriormente animais dos grupos crônicos e desafiados foram sacrificados como descrito nos materiais e métodos. Nos camundongos crônicos C3H/HePAS não se observa sinais de inflamação (**A**) enquanto que nos animais do grupo desafiado nota-se a presença de poucos infiltrados inflamatórios do tipo focal (**B**). Animais A/J crônicos apresentam moderada/intensa hepatite, com infiltrados focais predominantemente formados por células mononucleadas e algumas áreas de necrose (**C**), já os animais desafiados desenvolvem uma severa inflamação, com infiltrados difusos e extensas áreas de necrose(**D**). H&E. Aumento, 10X.

Tabela III. Patologia no fígado de animais cronicamente infectados e desafiados

Grupos Crônicos ^a	Infiltrados ^b		Necrose ^b
	Focal	Difuso	
C3H controle	-	-	-
C3H infectado	+	-	-
C3H desafiado	++	-	-
A/J controle	-	-	-
A/J infectado	++	-	+
A/J desafiado	+++	+++	++++

^a Os camundongos foram infectados com 10^6 formas tripomastigotas de *T.cruzi* da cepa Sylvio X10/4. No dia 370 de infecção foram desafiados via intravenosa com 5×10^6 formas vivas de *T.cruzi* e após 48 horas foram sacrificados.

^b As lesões foram classificadas da seguinte forma: (-) ausência de lesão, (+) lesão discreta, (++) lesão moderada, (+++) lesão intensa e (+++++) lesão severa.

Figura 13. Número total de células do fígado de camundongos A/J e C3H/HePAS cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi*. Os camundongos foram infectados com 10^6 parasitas. Após um ano de infecção, células hepáticas dos animais controle, dos cronicamente infectados e dos desafiados por 48h com 5×10^6 tripomastigostas, foram quantificadas. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais de 2 animais.

Figura 14. Leucócitos intra-hepáticos de camundongos cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi*. Camundongos A/J e C3H/HePAS foram infectados com 10^6 parasitas. Após um ano de infecção, células hepáticas dos animais controles, dos cronicamente infectados e dos desafiados por 48h com 5×10^6 tripomastigotas, foram analisadas por citometria de fluxo (FACS) para determinar a número total de células TCD4⁺ (A), TCD8⁺ (B) e B(B220⁺) (C) por fígado. Cada barra representa a média $\pm$ DP de dois animais por grupo. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais de 2 animais.

Estas diferenças inter-linhagens também foram observadas nos animais A/J e C3H/HePAS não infectados (controles). Já após o desafio, o número de células TCD4⁺ aumentou sensivelmente em ambas as linhagens, com aumento proporcional ao número de células antes do desafio, de forma que os valores absolutos foram notavelmente superiores nos animais A/J ($1,66 \times 10^6$ versus $4,79 \times 10^3$ células TCD4⁺/fígado nos animais C3H/HePAS e A/J crônicos desafiados, respectivamente) (**Fig. 14A**). Já em relação às células TCD8⁺ (**Fig. 14B**), na linhagem A/J, o desafio determinou um aumento de aproximadamente 2 vezes no número total de linfócitos TCD8⁺ intra-hepáticos, enquanto que na linhagem C3H/HePAS o aumento das células TCD8⁺ foi muito maior (cerca de 7 vezes). Desta forma, o número total de células CD8⁺ nos animais desafiados mostrou-se equivalente nas duas linhagens de camundongos.

Em relação aos linfócitos B (B220⁺) intra-hepáticos, na linhagem C3H/HePAS, não observamos diferenças significativas entre os três grupos (controle, crônicos e desafiados) (**Fig. 14C**). Nos animais A/J, entretanto, o número de células B220⁺ no fígado mostrou-se discretamente aumentado no animal crônico comparado ao animal controle, sendo que o número total destas células dobrou após o desafio do animal A/J crônico (**Fig. 14C**).

As células NK (PanNK⁺CD3⁻) estavam presentes em maior número nos três grupos de camundongos da linhagem C3H/HePAS (**Fig. 15A**). Assim, é interessante notar que os animais C3H/HePAS crônicos, depois de um ano de infecção, tem cerca de 3,7 vezes mais células NK no fígado que o grupo de animais crônicos A/J. Em ambas as linhagens, o desafio com o parasita determinou um aumento no número total de células NK intra-hepáticas (**Fig. 15A**).

Quanto às células PanNK⁺CD3⁺ (população que deve incluir as células NKT), não foram observadas diferenças acentuadas nos grupos controle e crônicos das duas linhagens. Entretanto, o desafio fez com que número destas células aumentasse em cinco vezes nos animais C3H/HePAS e em cerca de duas vezes nos animais A/J (**Fig. 15B**).

Figura 15. Subpopulações de leucócitos intra-hepáticos de camundongos cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi*. Camundongos A/J e C3H/HePAS foram infectados com 10^6 parasitas. Após um ano de infecção, células hepáticas dos animais controles, dos cronicamente infectados e dos desafiados por 48h com 5×10^6 tripomastigotas, foram analisadas por citometria de fluxo (FACS) para determinar o número total de células NK (Pan NK⁺CD3⁻) **(A)** NKT (CD3⁺Pan NK⁺) e T γδ (TCRγδ⁺CD3⁺) **(C)** por fígado. Cada barra representa a média $\pm$ DP de dois animais por grupo. Cada barra representa a média $\pm$ desvio padrão dos valores individuais de 2 animais.

Nas duas linhagens, o número de linfócitos $T\gamma\delta$ ($TCR\gamma\delta^+CD3^+$) no fígado dos animais crônicos mostrou-se similar ou inferior àquele dos controles não infectados. Por outro lado, o desafio parece não ter alterado de maneira significativa o número destas células (**Fig. 15C**).

Nas nossas experiências foi também observado um aumento no número total de macrófagos intra-hepáticos ($Mac1^+Ly-6G^{Low}$) nos animais crônicos de ambas as linhagens e, em forma mais intensa, nos animais desafiados. Os camundongos C3H/HePAS e A/J crônicos tinham respectivamente $2,04 \times 10^6$ e $1,42 \times 10^6$ células $Mac1^+Ly6G^{Low}$ /fígado. Após o desafio, a predominância de células $Mac1^+Ly6G^{Low}$ na linhagem A/J inverteu-se: nos camundongos C3H/HePAS, o número de macrófagos subiu para $5,46 \times 10^6$ (incremento de 2,7 vezes), enquanto que nos A/J foi para $7,14 \times 10^6$ (incremento de 5 vezes) (**Fig. 16A**).

A presença no fígado dos animais infectados de células $Mac1^+Ly-6G^{High}$ também foi analisada, sendo que as células com este fenótipo parecem ser células mielóides, ora granulócitos maduros ora células mieloides imaturas que resultam de mielopoiese extramedular (GONI et al., 2002). Nas nossas experiências, verificamos um aumento desta população nas duas linhagens, tanto nos grupos crônicos, como principalmente nos grupos desafiados (**Fig. 16B**).

Para finalizar os estudos de celularidade diferencial no fígado dos animais crônicos e crônicos desafiados, analisamos a expressão da molécula CD69, uma molécula que é expressa precoce e transitoriamente pelos linfócitos T, logo após sua ativação através do TCR. Uma vez que a expressão de CD69 numa determinada população celular é indicativo do estado de ativação em que as células se encontram, consideramos interessante a análise desta molécula nos linfócitos intra-hepáticos $TCD4^+$ e $TCD8^+$ dos animais crônicos desafiados A/J e C3H/HePAS para verificar se haveria diferenças no potencial de ativação destas células frente a um aumento repentino na carga parasitária.

Ao analisarmos a população de linfócitos $TCD4^+$ (**Fig. 17, parte superior**), podemos observar que mesmo nos animais controle já há uma frequência elevada de células $CD69^+$, tanto na linhagem A/J (51%), quanto na

Figura 16. Subpopulações de leucócitos intra-hepáticos de camundongos cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi*. Camundongos A/J e C3H/HePAS foram infectados com 10^6 parasitas. Após um ano de infecção, células hepáticas dos animais controle, dos cronicamente infectados e dos desafiados por 48h com 5×10^6 tripomastigotas, foram analisadas por citometria de fluxo (FACS) para determinar o número total de macrófagos (Mac1⁺Ly-6G^{Low}) **(A)** e de células mielóides (Mac1⁺Ly-6G^{High}) **(B)** por fígado. Cada barra representa a média $\pm$ DP de dois animais por grupo.

Figura 17. Expressão de CD69 pelas populações hepáticas de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ de camundongos A/J e C3H/HePAS cronicamente infectados e desafiados com *T. cruzi*. Os camundongos foram infectados com 10^6 parasitas. Após um ano de infecção, células hepáticas dos animais controle, dos cronicamente infectados e dos desafiados por 48h com 5×10^6 tripomastigotas, foram analisadas por citometria de fluxo (FACS).

C3H/HePAS (26%). Nos animais crônicos, a frequência de células TCD4⁺ CD69⁺ é similar à encontrada no fígado controle correspondente (33% e 42%, para C3H/HePAS e A/J, respectivamente). Por outro lado, como era o previsível, a expressão de CD69 se torna maior após o desafio. Ao comparamos a resposta ao desafio nas células TCD4⁺ das duas linhagens, verificou-se que nos camundongos A/J havia uma maior expressão de CD69 (69,02%) do que nos camundongos C3H/HePAS (45,49%).

Com relação às células TCD8⁺ intra-hepáticas (**Fig 17, parte inferior**), podemos observar que, analogamente às células TCD4⁺, a expressão de CD69 é de magnitude similar nos animais controle (12,2% e 26,2% para C3H/HePAS e A/J) e animais crônicos (17,5% e 26,7%), sendo que em ambos os casos parece ser inferior àquela das células TCD4⁺. Por outro lado, e diferentemente do observado nas células TCD4⁺, as células TCD8⁺ do animal C3H/HePAS desafiado apresentam um ganho maior na expressão de CD69 (4,28 vezes mais CD69 que os animais C3H/HePAS crônicos, passando de 17,49 para 74,94%) do que os animais A/J desafiados (2,19 vezes mais CD69 do que os animais A/J crônicos, passando de 26,77% para 58,61%).

6.3.5 Estudo das citocinas na infecção pela cepa SYLVIO-X10/4 de *T. cruzi*

A infecção pelo clone X10/4 da cepa Sylvio de *T. cruzi* caracteriza-se pela ausência de parasitas visíveis no sangue tanto na fase aguda, quanto na fase crônica, nas diferentes linhagens estudadas (A/J, C3H/HePAS, BALB/c, DBA/2, C57BL/6). A presença do *T. cruzi* só foi evidenciada por métodos de detecção indireta (culturas em meio LIT) no sangue dos animais A/J e C3H/HePAS e no coração dos animais C3H/HePAS (**Tabela II**). Por outro lado, o parasita é capaz de induzir lesões hepáticas ou cardíacas na fase crônica conforme a linhagem que é infectada, A/J ou C3H/HePAS, respectivamente. O fato da resposta imune estar implicada tanto no controle do parasita como no desenvolvimento das lesões,

dificulta a análise sobre a importância relativa das diferentes citocinas ou populações celulares envolvidas na indução da patologia.

Para avaliar a importância do óxido nítrico (NO) e das citocinas IL-12 e IFN γ no desenvolvimento da patologia e no controle do parasita durante a infecção pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4, estudamos camundongos C57BL/6 (wild type, WT) e animais deficientes para IL-12, IFN γ ou iNOS (todos eles no “background” de C57BL/6).

A análise histopatológica no dia 60 de infecção revelou que em camundongos IFN γ KO, a patologia cardíaca caracteriza-se pela presença de infiltrados moderados com inúmeros ninhos de amastigotas (**Fig. 18D**). Já nos camundongos IL-12p40KO infectados, a presença de infiltrados inflamatórios e ninhos de parasitas no coração foi discreta (**Fig. 18B**), enquanto que os animais C57BL/6 WT e iNOSKO e não apresentaram ninhos ou lesões no coração (**Fig. 18A e C**).

Com relação à musculatura esquelética, os resultados foram semelhantes àqueles encontrados no coração, mas em maior intensidade. Nos camundongos IFN γ KO, os infiltrados foram muito intensos e com uma quantidade elevada de ninhos (**Fig. 19D**). Infiltrados focais muito discretos e sem ninhos foram observados nos animais C57BL/6 WT e iNOSKO (**Fig. 19C e A**), enquanto que nos animais IL-12p40KO observou-se poucos ninhos e os infiltrados eram moderados e com tendência a apresentar um caráter difuso (**Fig. 19B**).

Já no sistema nervoso central (SNC), as lesões eram intensas ou muito intensas nos camundongos IL-12p40KO e IFN γ -KO, respectivamente (**Fig. 20B e D**). Em relação à presença de ninhos, estes eram escassos nos camundongos IL-12p40KO e numerosos nos camundongos IFN γ KO (**Fig. 20B e D**). Por outro lado, e como observado no coração, os infiltrados inflamatórios e os ninhos estavam ausentes no SNC dos animais C57BL/6 WT e iNOSKO (**Fig. 20A e C**).

Figura 18. Coração de camundongos C57BL/6 **(A)**, IL-12p40KO **(B)**, iNOSKO **(C)** e IFN γ KO **(D)** infectados por 60 dias com *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4. As setas indicam a presença de pseudocistos de amastigotas. H&E. Aumento, 10X.

Figura 19. Músculo esquelético de camundongos C57BL/6 **(A)**, IL-12p40KO **(B)**, iNOSKO **(C)** e IFN γ KO **(D)** infectados por 60 dias com *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4. As setas indicam a presença de pseudocistos de amastigotas H&E. Aumento, 10X.

Figura 20. Medula espinhal de camundongos C57BL/6 **(A)**, IL-12p40KO **(B)**, iNOSKO **(C)** e IFN γ KO **(D)** infectados por 60 dias com *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4. As setas indicam a presença de pseudocistos de amastigotas. O aumento das fotografias superiores é de 10X e o das fotografias inferiores, de 50X.

6.4 ESTUDO GENÉTICO

6.4.1 Análise histopatológica dos camundongos F₁ (A/J X C3H/HePAS) e F₂ (A/J X C3H/HePAS)

Para investigar o tipo de herança genética envolvida nas lesões inflamatórias observadas no coração dos animais C3H/HePAS e no fígado dos animais A/J, foram analisados 12 camundongos F₁ (A/J X C3H/HePAS) e 71 camundongos F₂ (A/J X C3H/HePAS).

A análise da geração F₁ revelou que tanto a patologia cardíaca, quanto a hepática têm caráter recessivo com reduzida penetrância nos camundongos heterozigóticos (**Fig. 21**). Apesar da ausência de patologia em grande parte dos camundongos F₁ cronicamente infectados, estes animais foram infectados, apresentando títulos de anticorpos IgG2a anti-*T.cruzi* semelhantes aos observados nos parentais A/J e C3H/HePAS cronicamente infectados (dados não mostrados).

Na geração F₂ (A/J X C3H/HePAS) foi possível identificar animais que desenvolveram patologia cardíaca e hepática, animais com patologia limitada ao fígado e animais sem patologia (**Fig. 22**). Estes resultados sugerem que os fatores genéticos relacionados à predisposição para o desenvolvimento de lesões cardíacas e hepáticas são segregados de maneira independente na geração F₂.

Por outro lado, o fenótipo patologia cardíaca mostrou uma distribuição normal nos camundongos da geração F₂ que apresentaram valores médios intermediários entre as duas linhagens parentais, indicando que os alelos que controlam este fenótipo foram segregados neste cruzamento (**Fig. 23A-C**). Desta forma, em relação ao parâmetro patologia cardíaca, os camundongos F₂ foram qualitativamente classificados em “semelhantes a A/J” se as áreas de inflamação após normalização logarítmica, fossem menores do que 6,22, e “semelhantes a C3H/HePAS” se desenvolvessem áreas de inflamação maiores do que 6,22.

Figura 21. Distribuição das lesões no coração e no fígado de camundongos A/J, C3H/HePAS, geração F₁ e geração F₂ na fase crônica da Doença de Chagas Experimental. Os animais foram infectados via intraperitonial com 10⁶ tripomastigotas da cepa Sylvio de *T. cruzi* e após o dia 120 de infecção, os infiltrados foram quantificados como descrito nos materiais e métodos. Cada barra representa a mediana.

Figura 22. Heterogeneidade genética na intensidade de patologia no coração e fígado de animais F_2 (A/J X C3H/HePAS) cronicamente infectados. A figura representa a correlação da patologia hepática e cardíaca de 71 camundongos. A inflamação tecidual está representada em cada eixo na forma do Log_{10} da área infiltrada.

Figura 23. Variação da patologia cardíaca em camundongos cronicamente infectados com a cepa Sylvio de *T.cruzi*. **(A)** Intensidade da patologia cardíaca em 8 animais de cada uma das linhagens parentais A/J e C3H/HePAS. **(B)** Curva de probabilidade esperada ilustrando a distribuição *t* baseada nos dados mostrados em A e na análise histopatológica de 71 camundongos F₂ (A/JXC3HePAS). **(C)** As barras representam a distribuição de frequências de área inflamada observada nos 71 camundongos F₂ (A/JXC3HePAS) genotipados neste estudo e a linha sobreposta indica a distribuição de frequências esperada. A intensidade de patologia cardíaca nos camundongos cronicamente infectados foi representada na forma de logaritmo neperiano (Ln). Na figura A cada barra representa a mediana.

A severidade das lesões cardíacas na linhagem C3H/HePAS apresentou uma ampla variância fenotípica sugerindo interações do genótipo com fatores ambientais (**Fig. 5 e Fig. 23**).

6.4.2 Análise multiparamétrica dos fatores dependentes do hospedeiro

A patologia cardíaca diferencial exibida pelos camundongos C3H/HePAS e A/J poderia ser resultante de uma diferente colonização pelo parasita dos cardiomiócitos destas duas linhagens, ou de uma maior eficiência da resposta imune local apresentada pelos camundongos A/J, os quais conseguiriam livrar-se totalmente dos parasitas presentes no tecido cardíaco. O mesmo raciocínio poderia ser aplicado em relação ao desenvolvimento da patologia no fígado dos camundongos A/J e à resistência nos camundongos C3H/HePAS.

Com o objetivo de avaliar a existência de uma correlação entre a resposta imune sistêmica dos animais crônicos e o grau de patologia cardíaca ou hepática exibida, além dos estudos histopatológicos acima relatados, os camundongos A/J, C3H/HePAS e F_2 (A/J X C3H/HePAS) cronicamente infectados foram também analisados em relação à distribuição populacional leucocitária no sangue e à concentração de anticorpos específicos anti-*T. cruzi* dos isótipos IgG1 e IgG2a.

Os camundongos crônicos das linhagens parentais A/J e C3H/HePAS, além de diferirem em relação à patologia, mostraram diferenças significativas na distribuição de algumas populações leucocitárias no sangue, sendo que para cada uma das populações celulares analisadas os animais F_2 crônicos exibiram uma distribuição fenotípica particular. Assim, nos camundongos C3H/HePAS crônicos observamos uma frequência elevada de células NK ($\text{PanNK}^+\text{CD11b}^{\text{Low}}\text{CD3}^-$), enquanto que nos camundongos A/J crônicos obtivemos frequências elevadas de células T totais ($\text{CD3}^+\text{PanNK}^-$), células T CD8^+ e células $\text{PanNK}^+\text{CD3}^+$ (que deve incluir as células NK-T) (**Fig. 24**). Não houve diferenças marcantes entre as linhagens parentais em relação às células B ($\text{B220}^{\text{HIGH}}$) (**Fig. 25**), nem quanto aos

Figura 24. Frequência de linfócitos T CD8⁺ (A), T CD8⁺ Low (B), T CD3⁺ (C), T CD4⁺ (D), NK (PanNK⁺CD11b^{Low}CD3⁻) (E), e NKT (CD3⁺PanNK⁺) (F) no sangue de camundongos A/J, C3H/HePAS e F₂, fêmeas e machos, na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4. Cada barra representa a mediana dos valores individuais de 8 camundongos A/J, 8 C3H/HePAS e 71 da geração F₂.

Figura 25. Frequência de linfócitos B (B220⁺) **(A)**, títulos de anticorpos parasita específicos IgG2a **(B)** e IgG1 **(C)**, no sangue de camundongos A/J, C3H/HePAS e F₂, fêmeas e machos, na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4. Cada barra representa a mediana dos valores individuais de 8 camundongos A/J, 8 C3H/HePAS e 71 da geração F₂.

níveis plasmáticos de anticorpos específicos para o parasita das classes IgG1 e IgG2a (**Fig. 25**). Para algumas populações celulares, o fator sexo teve uma contribuição importante na diferenciação das linhagens parentais. Isto foi evidente na população de células TCD4⁺, onde os machos A/J apresentaram freqüências mais elevadas do que os machos C3H/HePAS e na população de linfócitos TCD8^{low} que predominava nas fêmeas A/J (**Fig. 24**).

Os animais F₂ crônicos apresentaram uma distribuição de células TCD8⁺ e células T bastante dispersa, adotando os fenótipos de um ou do outro parental (**Fig. 24A e C**). Já em relação à população de células PanNK⁺ CD3⁺ (supostamente NKT), a maior parte dos F₂ mostrava freqüências baixas, como os animais C3H/HePAS (**Fig. 24F**). Em relação às células NK, os animais F₂ mostraram também freqüências baixas, como os animais A/J (**Fig. 24E**). Estes dois últimos resultados sugerem que os fenótipos de alta freqüência de células NK e NKT só acontecem quando coexistem no animal vários genes favorecedores, fenômeno exemplificado na linhagem C3H/HePAS para a população NK e na linhagem A/J para a população NKT.

6.4.3 Detecção e localização de *loci* de características quantitativas (QTLs) envolvidos na patologia cardíaca de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* Sylvio X10/4

Para estudar os fatores genéticos envolvidos na patologia cardíaca induzida por parasitas pelo clone X10/4 da cepa Sylvio de *T. cruzi*, realizamos uma ampla análise do genoma murino para detectar *loci* relacionados à suscetibilidade no desenvolvimento de lesões inflamatórias crônicas. Assim, os 71 camundongos F₂ (A/JXC3HePAS) que haviam sido analisados em relação à patologia e parâmetros imunológicos, foram também genotipados em relação a diversos marcadores genéticos escolhidos pela sua posição no genoma.

A genotipagem dos 71 camundongos F₂ foi determinada por meio de 64 microsatélites separados entre si por uma distância de 20cM. A associação do fenótipo patologia cardíaca com o genótipo em cada *locus* foi analisado através do

teste de χ^2 e tabelas de contingência. Foi considerado como evidência sugestiva de uma associação (“Linkage”) a existência de um valor $P < 1,6 \times 10^{-3}$. Foram encontradas associações estatísticas da existência de patologia cardíaca com marcadores no cromossomo 7, e mais especificamente para o marcador D7MIT185P que teve $P = 0,76 \times 10^{-3}$ (**Tabela IV**). A análise da geração F_2 deixa claro que o alelo C3H/HePAS neste marcador está fortemente associado ao aumento de patologia no coração, enquanto que o alelo A/J está relacionado à diminuição da severidade das lesões cardíacas. Não foram encontradas evidências de associação de outros marcadores analisados com a patologia cardíaca.

Cromossomo 7

Marcador	Posição (cM)	χ^2	valor de P
d7mit155	12,0	3,064	0,2161
d7mit185	37,2	14,652	0,0007
d7mit68	45,9	7,749	0,0208
d7mit135	64,0	8,464	0,0145

Tabela IV. Análise da associação entre a extensão das lesões inflamatórias no coração e marcadores no cromossomo 7. Os marcadores acima foram usados para genotipar 71 camundongos F_2 . Teste de associação de χ^2 (com um grau de liberdade) foi utilizado para indicar os marcadores e os valores de χ^2 e P são mostrados acima. A ordem dos marcadores e sua posição absoluta ao longo do cromossomo foi baseada no “Mouse Genome Database” (www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/mouse/index) e são indicados em cM.

7. DISCUSSÃO

A infecção por *T. cruzi* em humanos resulta em uma interação parasita-hospedeiro que se alastra por toda a vida do indivíduo e que se expressa de formas muito diferentes que vão desde a ausência de sintomas até um comprometimento seletivo do coração ou tubo digestivo nos pacientes que sofrem das formas cardíaca ou digestiva da doença. Acredita-se que estes padrões distintos de patologia na infecção pelo *T. cruzi* devem-se à heterogeneidade de ambos, parasita e hospedeiro. Um papel principal da heterogeneidade do *T. cruzi* no desenvolvimento de patologia foi confirmado por diversos grupos de pesquisa que analisaram a doença em camundongos infectados com diferentes parasitas isolados (MELO & BRENER, 1978, ANDRADE et al., 1999, ANDERSSON et al., 2003, VERA-CRUZ et al., 2003). Entretanto, a contribuição da heterogeneidade do hospedeiro na patologia induzida por *T. cruzi* ainda é um campo aberto para investigação científica, particularmente a respeito de sua base genética. A utilização de clones de *T. cruzi* com características biológicas estáveis garante que as eventuais diferenças de patologia encontradas na infecção de diferentes linhagens de camundongos sejam exclusivamente devidas à heterogeneidade do hospedeiro e não à do parasita (VAGO et al., 2000).

Desta forma, o estudo da fase crônica da doença em camundongos de diferentes linhagens, infectados com um clone de *T. cruzi* pode nos ajudar a entender o papel do *background* genético do hospedeiro no desenvolvimento dos diferentes padrões de patologia que são característicos da doença de Chagas.

Neste trabalho, avaliou-se a habilidade de diferentes indivíduos (representados por diferentes linhagens de camundongos) em desenvolver patologias no coração, fígado e músculo esquelético, durante a fase crônica da infecção pelo clone Sylvio-X10/4 de *T. cruzi*. Uma observação notável foi a de que diferentes linhagens de camundongos cronicamente infectados exibiram lesões inflamatórias em órgãos distintos: o coração e o fígado, sendo seletivamente afetados em camundongos C3H/HePAS e A/J cronicamente infectados.

Assim, enquanto a maioria dos camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados mostraram patologia intensa no coração, níveis muito baixos ou nenhuma lesão inflamatória foi encontrada no fígado. Em contrapartida, todos os

camundongos A/J infectados cronicamente apresentaram infiltrados no fígado, mas sem patologia cardíaca. Camundongos A/J também mostraram níveis mais elevados de inflamação no músculo esquelético, comparados aos camundongos C3H/HePAS cronicamente infectados, mas estas diferenças não foram tão evidentes quanto às encontradas para o fígado. Camundongos BALB/c e C57BL/6 cronicamente infectados mostraram um padrão de patologia similar ao do camundongo A/J, e o camundongo DBA/2 cronicamente infectado não mostrou sinais de patologia. Esta é a primeira descrição mostrando que o “background” genético do camundongo pode ser determinante para o desenvolvimento da patologia crônica induzida pelo *T. cruzi* em um determinado órgão. O fato de que em camundongos C3H/HePAS a infecção por Sylvio-X10/4 recapitula as lesões cardíacas observadas na doença humana, enquanto que nas outras linhagens de camundongos a infecção não determina lesões ou determina fenótipos distintos de patologia, reforça a conveniência deste modelo para se determinar os genes envolvidos na patologia de Chagas.

A análise histopatológica de camundongos cronicamente infectados também revelou a presença de ninhos de amastigotas no coração dos camundongos C3H/HePAS, mas não no dos camundongos A/J. Diferenças no parasitismo nestas linhagens foram confirmadas cultivando-se amostras de homogeneizados de tecido cardíaco cultivados em meio LIT, um procedimento que detectou parasitas no coração em 38,5% e 0% dos camundongos C3H/HePAS e A/J, respectivamente (**Tabela II**). A correlação entre o parasitismo cardíaco e o desenvolvimento de lesões cardíacas sustenta a corrente hipótese para a patogenia da doença de Chagas, de acordo com a qual patologia seria o resultado da resposta imune efetora frente aos parasitas que persistem nos tecidos (VAGO et al., 1996, ANEZ et al., 1999, PALOMINO et al., 2000, TARLETON, 2001). É interessante notar que esta hipótese foi baseada em estudos onde o parasitismo tissular foi avaliado por imuno-histoquímica ou PCR (HIGUCHI MDE et al., 1993, VAGO et al., 1996), duas técnicas que podem ser criticadas pelo fato de que os antígenos do parasita ou DNA podem se manter nas lesões por longos períodos de tempo. Tal argumento não pode ser aplicado ao

nosso estudo já que as culturas em meio LIT revelam unicamente a presença de parasitas vivos, além disso todos os ninhos de amastigotas detectados no exame histopatológico claramente não mostravam sinais de degeneração. Assim, nossos resultados revelam que as lesões cardíacas se correlacionam com a presença de *T. cruzi* vivos no coração, corroborando com a idéia de que a persistência local de parasitas é a causa primária da doença de Chagas (TARLETON, 2003).

A intensidade de parasitismo do coração poderia refletir o nível de parasitemia sistêmica ou a existência de fatores locais que controlam a replicação do parasita no tecido cardíaco. Em nosso estudo, o parasitismo sistêmico foi aparentemente similar nos camundongos C3H/HePAS e A/J cronicamente infectados, já que ambas as linhagens apresentaram nas culturas de LIT do sangue resultados positivos semelhantes. Assim, se a quantidade de parasitas circulantes parecer ser a mesma nas duas linhagens, quais seriam os fatores responsáveis pela patologia diferencial? Nós sugerimos que as linhagens de camundongos poderiam diferir na expressão de fatores teciduais que operam ou promovendo a colonização do coração (HALL & PEREIRA, 2000, PETKOVA et al., 2000, SCHARFSTEIN et al., 2000), ou participando dos mecanismos efetores locais inatos ou adaptativos que resultam na destruição *in situ* dos parasitas. Entre os possíveis candidatos deste hipotético mecanismo efector distintamente expresso nas diferentes linhagens podemos considerar a magnitude da produção de óxido nítrico por cardiomiócitos (HUANG et al., 1999), o nível de expressão de moléculas do MHC classe I ou de apresentação de determinados peptídeos do parasita pelas células endoteliais, fibroblastos e cardiomiócitos (ZHANG & TARLETON, 1996), ou ainda a intensidade na produção local de quimiocinas (TEIXEIRA et al., 2002), entre outras possibilidades.

A idéia de que a persistência local dos parasitas propicia a longo prazo uma incidência mais alta de infiltrados inflamatórios corrobora as observações encontradas no coração (e provavelmente no músculo esquelético), mas não se correlaciona com os resultados observados no fígado (**Tabela II**). O parasita não foi detectado em nenhum momento no tecido hepático de camundongos cronicamente infectados, nem por exame histológico direto, nem por cultura de

tecido do fígado em meio LIT. Mais importante ainda, camundongos A/J cronicamente infectados exibiram uma intensa resposta inflamatória no fígado que não estava associada à presença de parasitas vivos. Uma possível explicação para esta discrepância é que a inflamação hepática observada nestes camundongos, ao invés de ser consequência de um parasitismo local mais alto, é determinada pela resposta imune mais intensa aos antígenos de tripomastigotas sanguíneas que foram removidos e destruídos pelos fagócitos do fígado.

Para indagar a veracidade desta interpretação, decidimos analisar se, em relação aos animais C3H/HePAS crônicos, os camundongos A/J crônicos teriam uma resposta hepática exacerbada frente ao *T. cruzi*. Com este objetivo, foi analisado o impacto que a inoculação de *T. cruzi* pela via endovenosa teria sobre a patologia hepática crônica nas duas linhagens. O estudo histopatológico confirmou nossa previsão, uma vez que nos animais A/J crônicos o desafio resultou em um aumento marcante das lesões hepáticas, com recrudescimento dos infiltrados focais e difusos, assim como das áreas de necrose, enquanto que nos animais C3H/HePAS crônicos as mudanças foram muito mais discretas.

Para verificar se alguma população celular estaria especialmente envolvida na maior reatividade hepática do camundongo A/J crônico, também avaliamos nas duas linhagens de camundongos, o impacto do desafio sobre a celularidade diferencial de leucócitos intra-hepáticos. Neste ponto, vale a pena destacar que, diferentemente do observado na análise histopatológica, o número total de leucócitos isolados do fígado dos animais A/J crônicos e A/J crônicos desafiados apenas foi discretamente superior ao encontrado nos animais C3H/HePAS dos grupos experimentais correspondentes. Várias interpretações poderiam explicar este desencontro, tais como a perda durante o processo de isolamento de leucócitos intra-hepáticos de alguma população celular que estaria sensivelmente aumentada nos camundongos A/J crônico e A/J desafiado. Uma outra possibilidade seria que de fato a celularidade total não seria muito diferente no fígado dos animais das duas linhagens, mas que em função da distribuição focal dos leucócitos nos animais A/J crônicos, estes se destacariam facilmente no exame histopatológico. Finalmente, é também possível que a ausência de um

aumento marcante do número de leucócitos no fígado do animal A/J desafiado resulte da acentuada diminuição do parênquima viável (extensas áreas de necrose) nestes animais.

Voltando à celularidade diferencial hepática após o desafio, foi constatado um aumento marcante de linfócitos TCD4⁺, que apesar de ser mais intenso na linhagem A/J, guardou a proporcionalidade encontrada antes do desafio. Aumentos proporcionais foram também constatados para as células NK (PanNK⁺CD3⁻), porém, neste caso, os valores maiores foram atingidos nos animais C3H/HePAS. Não houve maiores diferenças entre as linhagens desafiadas no que se refere ao aumento no número de células Mac1⁺ Ly6G^{LOW} (provavelmente macrófagos) e Mac1⁺ Ly6G^{HIGH} (provavelmente células mieloides). Em relação às células B220⁺ hepáticas, curiosamente estas só aumentaram nos camundongos A/J desafiados. Por outro lado, é destacável o fato do aumento de células TCD8⁺ nos animais C3H/HePAS desafiados ter sido muito intenso, de tal forma que os números totais destas células após o desafio se equipararam em ambas as linhagens. Assim, as mudanças que acontecem na celularidade intra-hepática com o desafio são muito complexas, havendo elementos comuns que acontecem em ambas as linhagens e outros, que acontecem unicamente em uma delas. Estudos cinéticos detalhados, assim como estudos funcionais (ex. produção de citocinas), serão necessários para definir mais claramente a extensão e a importância das mudanças ocorridas.

A seguir, algumas considerações relativas à composição do infiltrado inflamatório no coração e fígado dos animais crônicos devem ser feitas. Dados divergentes têm sido obtidos quanto à composição dos infiltrados inflamatórios na doença de Chagas (RIBEIRO-DOS-SANTOS et al., 1991, HIGUCHI MDE et al., 1993, DOS SANTOS et al., 2001). Assim, em alguns modelos experimentais predominam as células TCD8⁺ e em outros, as células TCD4⁺, enquanto que em humanos a população predominante no coração chagásico parece ser a dos linfócitos TCD8⁺ (HIGUCHI et al., 1993). Nossos resultados na infecção crônica pelo clone X10/4 Sylvio mostram que as células TCD4⁺ constituem a população

linfocitária predominante no tecido cardíaco dos camundongos C3H/HePAS, resultado semelhante ao mostrado por RIBEIRO DOS SANTOS et al. (1991). Em nosso caso, a celularidade diferencial não foi analisada no coração dos animais A/J crônicos, em função da ausência de patologia nestes animais. Linfócitos TCD4⁺ parecem desempenhar um importante papel na infecção pelo *T. cruzi*, sendo que de acordo com alguns autores trata-se da principal população linfocitária envolvida no controle do parasita no coração. ROTTEMBERG et al. (1993) mostraram que a ausência destas células em animais deficientes foi determinante para a proliferação de parasitas no coração. Por outro lado alguns autores têm demonstrado que apesar da importância destas células no controle da disseminação dos parasitas, elas também contribuem para a patogênese na infecção. Assim, a eliminação destas células por anticorpos monoclonais, embora favoreça a multiplicação dos parasitas em diversos órgãos, também acarreta uma significativa redução do infiltrado inflamatório cardíaco (RUSSO et al., 1996).

De maneira contrária ao observado no coração, a população linfocitária predominante no fígado dos animais A/J e C3H/HePAS crônicos, foi de células TCD8⁺. A importância das células TCD8⁺ no controle de infecções por parasitas intracelulares já foi extensivamente documentada. Mais ainda, de acordo com RUSSO (1996), esta população estaria envolvida no controle do *T. cruzi* no nível hepático (mas não em nível cardíaco), uma vez que o tratamento com anticorpos anti-CD8 durante a infecção pelo *T. cruzi* da cepa CL promoveu um aumento marcante de ninhos no fígado, mas não no coração. Assim, o fato de não ter-se encontrado parasitas vivos nas culturas LIT de tecido hepático de animal crônico talvez seja decorrente da uma eficiente ação das células TCD8⁺ sobre as células hepáticas parasitadas.

Diversas hipóteses têm sido sugeridas para explicar a origem das lesões na doença de Chagas humana, incluindo a persistência do parasita ou de antígenos parasitários nos sítios de lesão, ou mesmo uma resposta dirigida contra autoantígenos (BRENER & GAZZINELLI, 1997, LEON & ENGMAN, 2001, TARLETON, 2001). Quaisquer que sejam os fatores envolvidos na patogênese,

quimiocinas juntamente com algumas citocinas devem desempenhar um papel importante tanto no recrutamento de leucócitos, quanto na manutenção dos mesmos nos sítios de lesão. A expressão de RNAm foi avaliada para diversas quimiocinas no coração de camundongos C3H/HePAS na fase crônica da doença. ITAC, MIG e RANTES foram os RNAs de quimiocinas que estavam presentes em maior quantidade no infiltrado inflamatório, com variação de expressão em relação aos controles da ordem de 100 a 400 vezes. Algumas destas quimiocinas são induzidas por $\text{IFN}\gamma$, uma citocina importante na resistência ao *T. cruzi*. Nossos resultados corroboram com aqueles observados em outros modelos de infecção onde se verificou o mesmo padrão de expressão, mostrando desta maneira a importância do $\text{IFN}\gamma$ na migração leucocitária e na manutenção da miocardite. ALIBERTI et al. (2001) estudando animais C3H/HeJ infectados com a cepa Colombiana observou no tecido cardíaco uma intensa infiltração de linfócitos T CD8^+ concomitantemente a expressão de RANTES, MIG, IP-10, MCP-1 e MIP-1 α . No fígado, o padrão de quimiocinas observado nos animais A/J crônicos foi muito semelhante. Entretanto, o fato do fígado controle (fígado do animal A/J não infectado) conter também um nível basal considerável de leucócitos produtores de quimiocinas, faz com que o aumento relativo na quantidade de RNAm observado tenha sido menor que aquele observado no coração dos animais C3H/HePAS.

Conforme comentado acima, a resposta imune tem uma função ambígua, uma vez que, se por um lado ela está implicada na remoção e destruição dos parasitas, do outro ela contribui para a lesão tecidual. Diferentes componentes do sistema imunológico como por exemplo as citocinas, podem estar envolvidos de maneira direta ou indireta nos mecanismos de patogênese, dificultando a análise da importância relativa de cada um destes fatores. Neste sentido, os resultados de CORRÊA-OLIVEIRA et al. (1999) que indicou a existência de altos níveis de $\text{IFN}\gamma$ em pacientes chagásicos cardiopatas podem gerar diferentes interpretações. Assim, se o aumento dos níveis $\text{IFN}\gamma$ pode induzir uma maior lesão tecidual, ele também pode ser apenas um reflexo de uma resposta imune frente a uma maior

carga parasitária presente no indivíduo cardiopata. De qualquer forma a real contribuição destes fatores na indução de patologia ainda continua em aberto.

A partir dos experimentos de infecção com parasitas da cepa Sylvio-X10/4, de camundongos deficientes para NO, IFN γ e IL-12, três importantes moléculas relacionadas ao controle do parasita e também direta ou indiretamente na patogênese, alguns pontos podem ser ressaltados. Em primeiro lugar, não observamos patologia ou ninhos no coração, ou na medula espinhal dos camundongos iNOSKO. Diversos trabalhos têm mostrado a importância do NO na resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Camundongos iNOSKO quando infectados com a cepa Y ou Tulahuen têm maior parasitemia e mortalidade na fase aguda (HOLSCHER et al., 1998, MARTINS et al., 2001). Por outro lado, a importância do NO foi questionada na infecção pela cepa Colombiana, uma vez que neste modelo de infecção o aumento na patologia dos camundongos iNOS-deficientes é discreto. Possivelmente o NO seja mais importante na fase aguda, estágio onde existe uma intensa replicação do parasita e ausência de uma resposta adaptativa formada (SAEFTEL et al., 2001); Por outro lado, este mediador parece influenciar a função cardíaca e a intensidade do processo inflamatório. Assim, CHANDRA et al.(2002) utilizando a cepa Tulahuen observaram que o comprometimento da função cardíaca e a intensidade de inflamação eram menos evidentes nos animais deficientes em iNOS do que nos animais selvagens. Mais ainda, altos níveis de NO são capazes de levar os cardiomiócitos a morte por apoptose, provavelmente por um mecanismo mediado pela p53 (PINSKY et al., 1999).

Por outro lado, a análise histopatológica dos camundongos infectados IFN γ KO confirmou resultados obtidos por outros grupos, mostrando que esta citocina tem um impacto maior sobre a infecção do que a IL-12, principalmente no controle do parasitismo tissular. Assim, embora a intensidade de inflamação tenha sido semelhante tanto nos IFN γ KO quanto nos IL-12KO, a quantidade de ninhos foi significativamente superior nos IFN γ KO. Isto pode ser explicado considerando que o IFN γ é o mediador fundamental no controle do *T. cruzi* (TORRICO et al., 1991) e que na ausência de IL-12, a produção de IFN γ não é totalmente suprimida (MULLER et al., 2001).

Com relação ao sistema nervoso central (SNC), podemos constatar que a ausência de IFN γ ou IL-12 propicia um aumento drástico do parasitismo nestes tecidos, demonstrando que o SNC não é inacessível à colonização pelo *T. cruzi*. Isto significa que o SNC dos animais imunocompetentes está protegido por uma resposta natural e/ou adaptativa, altamente efetiva, uma vez que os animais selvagens não apresentavam quaisquer sinais de inflamação nesta região. Esta conclusão é também apoiada pelo desenvolvimento de encefalopatia em pacientes chagásicos portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida (AIDS) (LAGES-SILVA et al., 2002, SARTORI et al., 2002). Assim, o fato de não ter sido observada inflamação no sistema nervoso dos animais selvagens, no dia 60 de infecção, sugere que existam mecanismos dependentes de IL-12 e IFN γ capazes de destruir os parasitas que colonizem estes tecidos. Desta forma, se em algum momento houve inflamação no SNC, esta deve ter regredido totalmente após a eliminação local do parasita, o que equivaleria dizer que a resposta imune *T. cruzi* específica não tem nenhum papel na perpetuação da patologia local.

A IL-12 é composta por duas cadeias polipeptídicas denominadas de p40 e p35. A cadeia p40 quando combinada com a p19 origina a citocina pró-inflamatória IL-23 (OPPMANN et al., 2000). A participação da p40 na formação concomitantemente da IL-12 e IL-23 implica que nos nossos estudos com camundongos IL-12p40KO estamos avaliando simultaneamente a resposta à infecção na ausência de ambas citocinas. Por outro lado, CUA et al. (2003) demonstraram recentemente no modelo de encefalomielite alérgica experimental (EAE), que a IL-23, mas não a IL-12, tem importância fundamental na indução e manutenção da inflamação no SNC. Estes autores observaram que na ausência de p40 ou de p19, a imunização com mielina não provoca lesão medular, enquanto que no camundongo IL-12p35KO, que carece de IL-12, mas possui IL-23, um intenso quadro patológico de EAE é observado. Na infecção pelos parasitas da cepa Sylvio-X10/4, entretanto, os nossos dados indicam que o processo inflamatório no SNC acontece na ausência de ambas as citocinas.

Em nosso modelo experimental, os camundongos A/J desenvolveram na fase crônica da infecção intensa hepatite, enquanto que os camundongos C3H/HePAS apresentaram uma acentuada cardiopatia, quando infectados com o mesmo clone de *T. cruzi*. Como discutido acima, a patologia diferencial exibida pelos animais das duas linhagens poderia ser explicada com base a uma efetividade anti-*T. cruzi* diferente na resposta imune local das duas linhagens. No entanto, a existência de patologia em um determinado órgão poderia ser também a consequência de diferenças no tropismo dos parasitas do clone Sylvio-X10/4 resultantes do *background* genético da linhagem de camundongo utilizada. Assim, nesta eventualidade, uma das questões fundamentais seria identificar os fatores relacionados ao hospedeiro envolvidos no tropismo por diferentes tecidos.

O *T. cruzi* é capaz de invadir diferentes tipos de células nos mamíferos, mas, até o momento, muito pouco se sabe sobre os mecanismos envolvidos no tropismo do parasita por um determinado tecido. Embora a cepa do parasita possa contribuir para esta variação, fatores inerentes ao hospedeiro como diferenças no metabolismo celular e na expressão de receptores podem ser decisivos na determinação do tropismo.

Alguns fatores celulares como aumento da expressão de receptores para TGF- β (MING et al., 1995), aumento transitório de Ca^{2+} intracelular (RODRIGUEZ et al., 1995), e fosforilação de tirosinas (VILLALTA et al., 1998) têm sido relacionados com a suscetibilidade à infecção de uma determinada população celular. HALL et al. mostraram a importância do fator de transcrição nuclear NF- κ B no controle da infecção de células não imunes. Assim, utilizando diferentes linhagens celulares, estes autores observaram que a inibição da sinalização intracelular via NF- κ B induz um significativo aumento de penetração de parasitas nas células (HALL et al., 2000). De maneira interessante, os miócitos foram as únicas células que falharam em ativar NF- κ B quando infectados com o *T. cruzi*, fato que poderia explicar o motivo pelo qual na maioria dos modelos de infecção as células musculares são preferencialmente infectadas. Esta foi uma das primeiras evidências que indicam que células não imunes podem controlar a entrada de parasitas no seu interior, independente de mediadores imunológicos.

Uma das características da infecção de camundongos A/J pelo clone Sylvio-X10/4 é ausência de parasitismo e lesão tissular no coração na fase crônica. Diversos fatores poderiam estar envolvidos nesta resistência. Resultados prévios de nosso grupo indicam que esplenócitos de camundongos A/J cronicamente infectados quando estimulados com antígeno de *T. cruzi* por 24h produzem uma maior quantidade de NO que os esplenócitos de camundongos C3H/HePAS (Dados não mostrados). Assim, os cardiomiócitos ou outras células presentes no coração dos camundongos A/J poderiam produzir uma maior quantidade de NO, capaz de favorecer a destruição dos parasitas instalados no tecido cardíaco. No entanto, como relatado nesta tese, o estudo da infecção pelo clone X10/4 em animais iNOSKO não nos permite apoiar qualquer diferença na produção de NO como mecanismo diferencial de lesão.

Até o momento, pouco se sabe sobre as bases genéticas da resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Diferentes estudos têm mostrado que quaisquer que sejam os mecanismos envolvidos na progressão da doença, estes serão resultado da interação entre fatores genéticos inerentes ao hospedeiro e fatores diretamente relacionados ao parasita, sem descartarmos as possíveis interações com fatores ambientais. Em relação às observações de outros grupos de pesquisa relativas aos genes envolvidos na patologia, foi recentemente descrito que os alelos TNF α 2 (da região microsatélite TNF α) e TNF2 (do promotor do gene de TNF α) são segregados juntos em pacientes com cardiopatia chagásica crônica, mas não nos indivíduos com forma indeterminada da doença (DRIGO, 2002). Mais ainda, de acordo com este autor, estes alelos conferem suscetibilidade à progressão da cardiopatia de formas mais leves para formas mais graves, e ainda à evolução para a morte dos pacientes cardiopatas. No entanto, em outros trabalhos, não foi observada nenhuma associação entre a presença de cardiopatia e o polimorfismo na região promotora do TNF (BERAUN et al., 1998) ou do iNOS (CALZADA et al., 2002).

Na tentativa de se compreender os mecanismos genéticos envolvidos na patologia da doença de Chagas, estudamos os padrões de herança a partir de

uma geração de camundongos F_1 e F_2 construídos pelo cruzamento das linhagens A/J e C3H/HePAS. A partir da análise da patologia nos camundongos da geração F_1 podemos concluir que tanto no fígado quanto no coração, o fenótipo “patologia” tem reduzida penetrância e que ambos os fenótipos são segregados na geração F_2 . Assim, nossos resultados mostram claramente que o desenvolvimento de lesões após a infecção com parasitas do clone Sylvio-X10/4 é dependente do *background* do hospedeiro.

Frente a estes resultados, nós utilizamos este modelo para avaliar nos animais F_2 crônicos, possíveis correlações entre o fenótipo (presença de patologia, ou nível de resposta imune) e o genótipo (presença de marcador genético do tipo A/J ou C3H/HePAS em uma determinada região microssatélite). Este tipo de análise vem sendo utilizada com sucesso para identificar fatores genéticos de suscetibilidade e/ou resistência em diferentes modelos murinos de outras doenças infecciosas, como malária, tuberculose e salmonelose (BAGOT et al., 2002, ROY & MALO, 2002, SANCHEZ et al., 2003). Os estudos que visam definir os fatores genéticos de suscetibilidade e/ou resistência na doença de Chagas ainda são escassos. Recentemente GRAEFE et al.(2003) identificaram uma região no cromossomo 17 murino relacionada à suscetibilidade na fase aguda da infecção. Entretanto, neste estudo nada foi analisado com relação ao desenvolvimento de lesões na fase crônica, que sem dúvida é o ponto principal para a compreensão da doença humana.

Nossos resultados sugerem que existe um *locus* no cromossomo 7, nas proximidades do marcador D7Mit185, que poderia estar relacionado com o controle, nos animais da geração F_2 , da severidade das lesões cardíacas. É importante ressaltar que o baixo nível de significância estatística observado se deve muito provavelmente ao pequeno número de animais da geração F_2 analisados neste estudo. Novos experimentos serão realizados com o objetivo de aumentar o nível de significância a tal ponto ($P < 5,2 \times 10^{-5}$) que possamos afirmar que realmente existe uma forte ligação (“linkage”) entre o locus no cromossomo 7 e a severidade das lesões cardíacas.

O modelo murino utilizado neste estudo abre a possibilidade para que no futuro, possam ser identificados os fatores genéticos responsáveis pela suscetibilidade e/ou resistência no desenvolvimento da patologia na fase crônica da infecção murina pelo *T. cruzi*. Esses dados poderão trazer importantes contribuições ao entendimento da patogênese das lesões na doença de Chagas humana.

8. CONCLUSÕES

- a) Diferentes indivíduos podem exibir patologias quantitativa e qualitativamente diferentes, mesmo quando infectados por um único clone de *T. cruzi*.
- b) Em relação à patogenia da lesão chagásica, concluímos que o desenvolvimento da patologia cardíaca na infecção pelo *T. cruzi* da cepa Sylvio-X10/4 correlaciona-se com a carga parasitária local, mas não com a carga parasitária sistêmica.
- c) Em relação à patologia hepática, mostramos que os camundongos A/J crônicos respondem com maior intensidade ao desafio com o *T. cruzi*. Desta forma, acreditamos que, em relação ao fígado, a diferente patologia exibida pelos animais A/J cronicamente infectados pelos parasitas da cepa Sylvio-X10/4 não está diretamente relacionada à presença aumentada de parasitas vivos neste local.
- d) Na infecção pelo clone Sylvio-X10/4 de *T. cruzi* a produção de óxido nítrico não tem um papel fundamental, enquanto que, o IFN γ desempenha um importante papel no controle do parasitismo tissular.
- e) Na infecção murina pelo clone Sylvio-X10/4 de *T. cruzi*, existe um *locus* no cromossomo 7 candidato a uma correlação com a severidade das lesões cardíacas na fase crônica da infecção.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

De acordo com:

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. Referências Bibliográficas:

NBR 6023. Rio de Janeiro: ABNT, 1989.

NATIONAL LIBRARY OF MEDICINE. List of Journals Indexed in Index Medicus. Bethesda: NLM, 1997.

ABBAS, A.K.; LITCHMAN, A.H.; POBER, J.S. (1994). Cellular and molecular immunology. 2 ed., New York, Saunders. 239-260.

ABRAHAMSOHN, I.A. & SILVA, W.D. (1977). Antibody dependent cell-mediated cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology*, 75: 317-323.

ABRAHAMSOHN, I.A. & COFFMAN, R.L. (1996). *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gamma, and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Exp Parasitol*, 84: 231-244.

ABRAHAMSOHN, I.A.; DA SILVA, A.P.; COFFMAN, R.L. (2000). Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 68: 1975-1979.

ADORINI, L. (2003). Cytokine-based immunointervention in the treatment of autoimmune diseases. *Clin. Exp. Immunol.*, 132: 185-192.

ALCANTARA, A. & BRENER, Z. (1978). The in vitro interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Trop*, 35: 209-219.

ALIBERTI, J.C.; CARDOSO, M.A.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA, J.S. (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infect Immun*, 64: 1961-1967.

- ALIBERTI, J.C.; MACHADO, F.S.; SOUTO, J.T.; CAMPANELLI, A.P.; TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. (1999). beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 67: 4819-4826.
- ALIBERTI, J.C.; SOUTO, J.T.; MARINO, A.P.; LANNES-VIEIRA, J.; TEIXEIRA, M.M.; FARBER, J.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. (2001). Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*, 158: 1433-1440.
- ANDERSSON, J.; ORN, A.; SUNNEMARK, D. (2003). Chronic murine Chagas' disease: the impact of host and parasite genotypes. *Immunol Lett*, 86: 207-212.
- ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.; CHIARI, E.; PENA, S.D.; MACEDO, A.M. (1999). Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Mol Biochem Parasitol*, 100: 163-172.
- ANEZ, N.; CARRASCO, H.; PARADA, H.; CRISANTE, G.; ROJAS, A.; FUENMAYOR, C.; GONZALEZ, N.; PERCOCO, G.; BORGES, R.; GUEVARA, P.; RAMIREZ, J.L. (1999). Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. *Am J Trop Med Hyg*, 60: 726-732.
- ANSELM, A. & MOLEIRO, F. (1972). [Chagas' disease and chagasic myocardiopathies]. *Arch Inst Cardiol Mex*, 42: 622-628.
- ARAUJO, F.G. (1989). Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect Immun*, 57: 2246-2248.
- AVRAMEAS, S.; HOSLI, P.; STANISLAWSKI, M.; RODRIGOT, M.; VOGT, E. (1979). A quantitative study at the single cell level of immunoglobulin antigenic determinants present on the surface of murine B and T lymphocytes. *J Immunol*, 122: 648-659.
- BAGOT, S.; CAMPINO, S.; PENHA-GONCALVES, C.; PIED, S.; CAZENAVE, P.A.; HOLMBERG, D. (2002). Identification of two cerebral malaria resistance

- loci using an inbred wild-derived mouse strain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9919-9923.
- BANCHEREAU, J.; DE PAOLI, P.; VALLE, A.; GARCIA, E.; ROUSSET, F. (1991). Long-term human B cell lines dependent on interleukin-4 and antibody to CD40. *Science*, 251: 70-72.
- BAUER, H.; JUNG, T.; TSIKAS, D.; STICHTENOTH, D.O.; FROLICH, J.C.; NEUMANN, C. (1997). Nitric oxide inhibits the secretion of T-helper 1- and T-helper 2-associated cytokines in activated human T cells. *Immunology*, 90: 205-211.
- BERAH, M.; HORS, J.; DAUSSET, J. (1970). A study of HL-A antigens in human organs. *Transplantation*, 9: 185-192.
- BERAUN, Y.; NIETO, A.; COLLADO, M.D.; GONZALEZ, A.; MARTIN, J. (1998). Polymorphisms at tumor necrosis factor (TNF) loci are not associated with Chagas' disease. *Tissue Antigens*, 52: 81-83.
- BOYER, M.H.; HOFF, R.; KIPNIS, T.L.; MURPHY, E.D.; ROTH, J.B. (1983). *Trypanosoma cruzi*: susceptibility in mice carrying mutant gene *lpr* (lymphoproliferation). *Parasite Immunol*, 5: 135-142.
- BRENER, Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 4: 389-396.
- BRENER, Z. (1980). Immunity to *Trypanosoma cruzi*. *Adv. Parasitol.*, 18: 247-292.
- BRENER, Z. & ANDRADE, Z.A. (1987). *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987. p. 6-10.
- BRENER, Z. & GAZZINELLI, R.T. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int. Arch. Allergy Immunol.*, 114: 103-110.
- BROMAN, K.W.; WU, H.; SEN, S.; CHURCHILL, G.A. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. *Bioinformatics*, 19: 889-890.
- BUCKNER, F.S.; WILSON, A.J.; VAN VOORHIS, W.C. (1999). Detection of live *Trypanosoma cruzi* in tissues of infected mice by using histochemical stain for beta-galactosidase. *Infect Immun*, 67: 403-409.

- BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M.C.; KIERSZENBAUM, F. (1975). Effects of complement depletion in experimental chagas disease: immune lysis of virulent blood forms of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 11: 86-91.
- BURLEIGH, B.A. & ANDREWS, N.W. (1995). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*, 49: 175-200.
- CALZADA, J.E.; NIETO, A.; BERAUN, Y.; MARTIN, J. (2001). Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*, 58: 154-158.
- CALZADA, J.E.; LOPEZ-NEVOT, M.A.; BERAUN, Y.; MARTIN, J. (2002). No evidence for association of the inducible nitric oxide synthase promoter polymorphism with *Trypanosoma cruzi* infection. *Tissue Antigens*, 59: 316-319.
- CAMPOS, J.V. & TAFURI, W.L. (1973). Chagas enteropathy. *Gut*, 14: 910-919.
- CANÇADO, J.R. & CHUSTER, M. (1985). Tratamento específico. *Cardiopatia Chagásica*. Minas Gerais: Fundação Carlos Chagas, p.325-55.
- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*, 64: 128-134.
- CASTANOS-VELEZ, E.; MAERLAN, S.; OSORIO, L.M.; ABERG, F.; BIBERFELD, P.; ORN, A.; ROTTENBERG, M.E. (1998). *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. *Infect Immun*, 66: 2960-2968.
- CERECETTO, H. & GONZALEZ, M. (2002). Chemotherapy of Chagas' disease: status and new developments. *Curr Top Med Chem*, 2: 1187-1213.
- CHAGAS, C. (1909). Nova tripanosomíase humana. Estudo sobre a morfologia e ciclo evolutivo do *Schizotripanum cruzi*, N. Gen, N. sp., o agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1: 159-218.
- CHAMOND, N.; COATNOAN, N.; MINOPRIO, P. (2002). Immunotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. *Curr Drug Targets Immune Endocr Metabol Disord*, 2: 247-254.
- CHAN, S.H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J.W.; KOBAYASHI, M.; POSPISIL, M.; YOUNG, H.A.; WOLF, S.F.; YOUNG, D.; CLARK, S.C.; TRINCHIERI, G.

- (1991). Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J Exp Med*, 173: 869-879.
- CHANDRA, M.; TANOWITZ, H.B.; PETKOVA, S.B.; HUANG, H.; WEISS, L.M.; WITTNER, M.; FACTOR, S.M.; SHTUTIN, V.; JELICKS, L.A.; CHAN, J.; SHIRANI, J. (2002). Significance of inducible nitric oxide synthase in acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen strain). *Int J Parasitol*, 32: 897-905.
- CHIMELLI, L. & SCARAVILLI, F. (1997). Trypanosomiasis. *Brain Pathol.*, 7: 599-611.
- CHIU, B.C.; SHANG, X.Z.; STOLBERG, V.R.; KOMUNIECKI, E.; CHENSUE, S.W. (2002). Population analysis of CD4+ T cell chemokine receptor transcript expression during in vivo type-1 (mycobacterial) and type-2 (schistosomal) immune responses. *J Leukoc Biol*, 72: 363-372.
- CHRIST, M.; MCCARTNEY-FRANCIS, N.L.; KULKARNI, A.B.; WARD, J.M.; MIZEL, D.E.; MACKALL, C.L.; GRESS, R.E.; HINES, K.L.; TIAN, H.; KARLSSON, S.; ET AL. (1994). Immune dysregulation in TGF-beta 1-deficient mice. *J Immunol*, 153: 1936-1946.
- COHN, Z.A. (1978). Activation of mononuclear phagocytes: fact, fancy, and future. *J Immunol*, 121: 813-816.
- COLEMAN, D.L.; CHODAKEWITZ, J.A.; BARTISS, A.H.; MELLORS, J.W. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor enhances selective effector functions of tissue-derived macrophages. *Blood*, 72: 573-578.
- COLLI, W. (1993). Trans-sialidase: a unique enzyme activity discovered in the protozoan *Trypanosoma cruzi*. *Faseb J*, 7: 1257-1264.
- 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. (1999). The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94: 253-255.

- CRISPE, I.N. (1996). Isolation of mouse intrahepatic lymphocytes. *Current Protocols in Immunology*, 3: 22-28.
- CUA, D.J.; SHERLOCK, J.; CHEN, Y.; MURPHY, C.A.; JOYCE, B.; SEYMOUR, B.; LUCIAN, L.; TO, W.; KWAN, S.; CHURAKOVA, T.; ZURAWSKI, S.; WIEKOWSKI, M.; LIRA, S.A.; GORMAN, D.; KASTELEIN, R.A.; SEDGWICK, J.D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*, 421: 744-748.
- CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. (1995). Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 92: 3541-3545.
- CUNHA-NETO, E. & KALIL, J. (2001). Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. *Autoimmunity*, 34: 187-192.
- CUNNINGHAM, D.S. & KUHN, R.E. (1980). *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of the primary immune response in murine cell cultures to T-cell-dependent and -independent antigens. *J Parasitol*, 66: 16-27.
- CUROTTO DE LAFAILLE, M.A.; BARBOSA DE OLIVEIRA, L.C.; LIMA, G.C.; ABRAHAMSOHN, I.A. (1990). *Trypanosoma cruzi*: maintenance of parasite-specific T cell responses in lymph nodes during the acute phase of the infection. *Exp Parasitol*, 70: 164-174.
- DALMASSO, A.P. & JARVINEN, J.A. (1980). Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. *Infect Immun*, 28: 434-440.
- D'ANDREA, A.; ASTE-AMEZAGA, M.; VALIANTE, N.M.; MA, X.; KUBIN, M.; TRINCHIERI, G. (1993). Interleukin 10 (IL-10) inhibits human lymphocyte interferon gamma-production by suppressing natural killer cell stimulatory factor/IL-12 synthesis in accessory cells. *J Exp Med*, 178: 1041-1048.
- DE DIEGO, J.A.; PALAU, M.T.; GAMALLO, C.; PENIN, P. (1998). Are genotypes of *Trypanosoma cruzi* involved in the challenge of chagasic cardiomyopathy? *Parasitol Res*, 84: 147-152.

- DE DIEGO, J.A.; PALAU, M.T.; GAMALLO, C.; PENIN, P. (1998). Relationships between histopathological findings and phylogenetic divergence in *Trypanosoma cruzi*. *Trop. Med. Int. Health*, 3: 222-233.
- DE WAAL MALEFYT, R.; ABRAMS, J.; BENNETT, B.; FIGDOR, C.G.; DE VRIES, J.E. (1991). Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. *J Exp Med*, 174: 1209-1220.
- DE WAAL MALEFYT, R.; YSSEL, H.; DE VRIES, J.E. (1993). Direct effects of IL-10 on subsets of human CD4⁺ T cell clones and resting T cells. Specific inhibition of IL-2 production and proliferation. *J Immunol*, 150: 4754-4765.
- DENIS, M. (1991). Tumor necrosis factor and granulocyte macrophage-colony stimulating factor stimulate human macrophages to restrict growth of virulent *Mycobacterium avium* and to kill avirulent *M. avium*: killing effector mechanism depends on the generation of reactive nitrogen intermediates. *J Leukoc Biol*, 49: 380-387.
- D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A.; KIPNIS, T.; EISEN, H. (1985). Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol*, 15: 201-203.
- D'IMPERIO LIMA, M.R.; EISEN, H.; MINOPRIO, P.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. (1986). Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol*, 137: 353-356.
- DOS SANTOS, P.V.; ROFFE, E.; SANTIAGO, H.C.; TORRES, R.A.; MARINO, A.P.; PAIVA, C.N.; SILVA, A.A.; GAZZINELLI, R.T.; LANNES-VIEIRA, J. (2001). Prevalence of CD8(+)alpha beta T cells in *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis is associated with acquisition of CD62L(Low)LFA-1(High)VLA-4(High) activation phenotype and expression of IFN-gamma-inducible adhesion and chemoattractant molecules. *Microbes Infect*, 3: 971-984.
- DOS SANTOS, R.R.; ROSSI, M.A.; LAUS, J.L.; SILVA, J.S.; SAVINO, W.; MENGEL, J. (1992). Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term

- tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Exp Med*, 175: 29-39.
- DRIGO, S.A. (2002). Controle da expressão de citocinas inflamatórias na cardiopatia chagásica crônica. Tese de Doutorado, Universidade de São Paulo.
- EARLAM, R.J. (1972). Gastrointestinal aspects of Chagas' disease. *Am J Dig Dis*, 17: 559-571.
- FAE, K.C.; DRIGO, S.A.; CUNHA-NETO, E.; IANNI, B.; MADY, C.; KALIL, J.; GOLDBERG, A.C. (2000). HLA and beta-myosin heavy chain do not influence susceptibility to Chagas disease cardiomyopathy. *Microbes Infect*, 2: 745-751.
- FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; O'GARRA, A. (1991). IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol*, 147: 3815-3822.
- FISCHER, H.G.; FROSCH, S.; RESKE, K.; RESKE-KUNZ, A.B. (1988). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor activates macrophages derived from bone marrow cultures to synthesis of MHC class II molecules and to augmented antigen presentation function. *J Immunol*, 141: 3882-3888.
- FRANCHIN, G.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. (1997). Passive transfer of a monoclonal antibody specific for a sialic acid-dependent epitope on the surface of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes reduces infection in mice. *Infect Immun*, 65: 2548-2554.
- GALVAO DA SILVA, A.P. & DE ALMEIDA ABRAHAMSOHN, I. (2001). Interleukin-12 stimulation of lymphoproliferative responses in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 104: 349-354.
- GAO, P.; ZHOU, X.Y.; YASHIRO-OHTANI, Y.; YANG, Y.F.; SUGIMOTO, N.; ONO, S.; NAKANISHI, T.; OBIKA, S.; IMANISHI, T.; EGAWA, T.; NAGASAWA, T.; FUJIWARA, H.; HAMAOKA, T. (2003). The unique target specificity of a nonpeptide chemokine receptor antagonist: selective blockade of two Th1 chemokine receptors CCR5 and CXCR3. *J Leukoc Biol*, 73: 273-280.
- GASSON, J.C. (1991). Molecular physiology of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Blood*, 77: 1131-1145.

- GAZZINELLI, R.T.; GALVAO, L.M.; CARDOSO, J.E.; CANCADO, J.R.; KRETTLI, A.U.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G. (1988). Anti-Trypanosoma cruzi and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *J Clin Microbiol*, 26: 1795-1800.
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L.; SHER, A. (1992). The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against Trypanosoma cruzi involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*, 22: 2501-2506.
- GEA, S.; GRUPPI, A.; BASSO, B.; MENSIO, E.; VOTTERO-CIMA, E. (1990). Antibodies to T. cruzi cytosol acidic antigens (FIV) in Chagas' disease recognize parasite cell surface and human heart epitopes. *J Clin Lab Immunol*, 31: 183-187.
- GEA, S.; ORDONEZ, P.; CERBAN, F.; IOSA, D.; CHIZZOLINI, C.; VOTTERO-CIMA, E. (1993). Chagas' disease cardioneuropathy: association of anti-Trypanosoma cruzi and anti-sciatic nerve antibodies. *Am J Trop Med Hyg*, 49: 581-588.
- GIRONES, N. & FRESNO, M. (2003). Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends Parasitol*, 19: 19-22.
- GOLDEN, J.M. & TARLETON, R.L. (1991). Trypanosoma cruzi: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Exp Parasitol*, 72: 391-402.
- GONI, O.; ALCAIDE, P.; FRESNO, M. (2002). Immunosuppression during acute Trypanosoma cruzi infection: involvement of Ly6G (Gr1(+))CD11b(+) immature myeloid suppressor cells. *Int Immunol*, 14: 1125-1134.
- GRABSTEIN, K.H.; URDAL, D.L.; TUSHINSKI, R.J.; MOCHIZUKI, D.Y.; PRICE, V.L.; CANTRELL, M.A.; GILLIS, S.; CONLON, P.J. (1986). Induction of macrophage tumoricidal activity by granulocyte-macrophage colony-stimulating factor. *Science*, 232: 506-508.
- GRAEFE, S.E.; MEYER, B.S.; MULLER-MYHSOK, B.; RUSCHENDORF, F.; DROSTEN, C.; LAUE, T.; STEEG, C.; NURNBERG, P.; FLEISCHER, B.

- (2003). Murine susceptibility to Chagas' disease maps to chromosomes 5 and 17. *Genes Immun*, 4: 321-325.
- GREEN, S.J.; CRAWFORD, R.M.; HOCKMEYER, J.T.; MELTZER, M.S.; NACY, C.A. (1990). Leishmania major amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 145: 4290-4297.
- GUHL, F.; JARAMILLO, C.; CARRANZA, J.C.; VALLEJO, G.A. (2002). Molecular characterization and diagnosis of trypanosoma cruzi and T. rangeli. *Arch Med Res*, 33: 362-370.
- HALL, B.S. & PEREIRA, M.A. (2000). Dual role for transforming growth factor beta-dependent signaling in Trypanosoma cruzi infection of mammalian cells. *Infect Immun*, 68: 2077-2081.
- HALL, B.S.; TAM, W.; SEN, R.; PEREIRA, M.E. (2000). Cell-specific activation of nuclear factor-kappaB by the parasite Trypanosoma cruzi promotes resistance to intracellular infection. *Mol Biol Cell*, 11: 153-160.
- HAMILTON, J.A. (1993). Colony stimulating factors, cytokines and monocyte-macrophages--some controversies. *Immunol Today*, 14: 18-24.
- HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D.; EISEN, H. (1983). Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with Trypanosoma cruzi. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 80: 3466-3469.
- HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D.; EISEN, H. (1985). T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. *Eur J Immunol*, 15: 438-442.
- HATCHER, F.M. & KUHN, R.E. (1982). Destruction of Trypanosoma cruzi by Natural killer cells. *Science*, 218: 295-296.
- HENRIQUES-PONS, A.; OLIVEIRA, G.M.; PAIVA, M.M.; CORREA, A.F.; BATISTA, M.M.; BISAGGIO, R.C.; LIU, C.C.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; COUTINHO, C.M.; PERSECHINI, P.M.; ARAUJO-JORGE, T.C. (2002). Evidence for a perforin-mediated mechanism controlling cardiac inflammation in Trypanosoma cruzi infection. *Int. J. Exp. Pathol.*, 83: 67-79.

- HIGUCHI, M.; DE BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. (1993). Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc. Pathol.*, 2: 101-106.
- HIGUCHI MDE, L.; GUTIERREZ, P.S.; AIELLO, V.D.; PALOMINO, S.; BOCCHI, E.; KALIL, J.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. (1993). Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.*, 423: 157-160.
- HOFT, D.F.; LYNCH, R.G.; KIRCHHOFF, L.V. (1993). Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 151: 7038-7047.
- HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; BROMBACHER, F. (1998). Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun*, 66: 1208-1215.
- HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F.; O'GARRA, A.; MURPHY, K.M. (1993). Development of TH1 CD4⁺ T cells through IL-12 produced by *Listeria*-induced macrophages. *Science*, 260: 547-549.
- HSU, D.H.; DE WAAL MALEFYT, R.; FIORENTINO, D.F.; DANG, M.N.; VIEIRA, P.; DE VRIES, J.; SPITS, H.; MOSMANN, T.R.; MOORE, K.W. (1990). Expression of interleukin-10 activity by Epstein-Barr virus protein BCRF1. *Science*, 250: 830-832.
- HUANG, H.; CHAN, J.; WITTNER, M.; JELICKS, L.A.; MORRIS, S.A.; FACTOR, S.M.; WEISS, L.M.; BRAUNSTEIN, V.L.; BACCHI, C.J.; YARLETT, N.; CHANDRA, M.; SHIRANI, J.; TANOWITZ, H.B. (1999). Expression of cardiac cytokines and inducible form of nitric oxide synthase (NOS2) in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Mol Cell Cardiol*, 31: 75-88.

- HUNTER, C.A.; ELLIS-NEYES, L.A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F.G. (1997). IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 158: 3311-3316.
- JAMES, S.L.; KIPNIS, T.L.; SHER, A.; HOFF, R. (1982). Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. *Infect Immun*, 35: 588-593.
- JANKOVIC, D.; LIU, Z.; GAUSE, W.C. (2001). Th1- and Th2-cell commitment during infectious disease: asymmetry in divergent pathways. *Trends Immunol*, 22: 450-457.
- JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; MCCURLEY, T.L. (1992). A *Trypanosoma cruzi* DNA sequence amplified from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Trans. Assoc. Am. Physicians*, 105: 182-189.
- KEHRL, J.H.; TAYLOR, A.; KIM, S.J.; FAUCI, A.S. (1991). Transforming growth factor-beta is a potent negative regulator of human lymphocytes. *Ann N Y Acad Sci*, 628: 345-353.
- KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D.B.; PIZZIMENTI, M.C. (1974). Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 112: 1839-1844.
- KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J.G. (1976). Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J Immunol*, 116: 1208-1211.
- KIERSZENBAUM, F. & HAYES, M.M. (1980). Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection. Requirements for cellular destruction of circulating forms of *T. cruzi* in human and murine in vitro systems. *Immunology*, 40: 61-66.
- KIERSZENBAUM, F. & LIMA, M.F. (1983). Susceptibility of insect-borne, metacyclic forms of *Trypanosoma cruzi* to antibody-mediated mechanisms of destruction. *Am J Trop Med Hyg*, 32: 1236-1241.

- KIERSZENBAUM, F. (2003). Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.*, 37: 1-11.
- KIPNIS, T.L.; DAVID, J.R.; ALPER, C.A.; SHER, A.; DA SILVA, W.D. (1981). Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 78: 602-605.
- KIPNIS, T.L.; JAMES, S.L.; SHER, A.; DAVID, J.R. (1981). Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *Am J Trop Med Hyg*, 30: 47-53.
- KIPNIS, T.L.; KRETTLI, A.U.; DIAS DA SILVA, W. (1985). Transformation of trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* into activators of alternative complement pathway by immune IgG fragments. *Scand J Immunol*, 22: 217-226.
- KLAUS, G.G.; PEPYS, M.B.; KITAJIMA, K.; ASKONAS, B.A. (1979). Activation of mouse complement by different classes of mouse antibody. *Immunology*, 38: 687-695.
- KOBAYASHI, M.; FITZ, L.; RYAN, M.; HEWICK, R.M.; CLARK, S.C.; CHAN, S.; LOUDON, R.; SHERMAN, F.; PERUSSIA, B.; TRINCHIERI, G. (1989). Identification and purification of natural killer cell stimulatory factor (NKSF), a cytokine with multiple biologic effects on human lymphocytes. *J Exp Med*, 170: 827-845.
- KORETH, J.; O'LEARY, J.J.; J, O.D.M. (1996). Microsatellites and PCR genomic analysis. *J. Pathol.*, 178: 239-248.
- KOS, F.J. & ENGLEMAN, E.G. (1996). Immune regulation: a critical link between NK cells and CTLs. *Immunol Today*, 17: 174-176.
- KRETTLI, A.U. & PONTES DE CARVALHO, L.C. (1979). Membrane bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement mediated lyses. *Clin. Exp. Immunol.*, 37: 416-423.
- KROEMER, G. & WICK, G. (1989). The role of interleukin 2 in autoimmunity. *Immunol Today*, 10: 246-251.

- KUBIN, M.; CHOW, J.M.; TRINCHIERI, G. (1994). Differential regulation of interleukin-12 (IL-12), tumor necrosis factor alpha, and IL-1 beta production in human myeloid leukemia cell lines and peripheral blood mononuclear cells. *Blood*, 83: 1847-1855.
- LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; SILVA-VERGARA, M.L.; CHIARI, E. (2002). Chagasic meningoencephalitis in a patient with acquired immunodeficiency syndrome: diagnosis, follow-up, and genetic characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Infect. Dis.*, 34: 118-123.
- LAGUENS, R.P.; CABEZA MECKERT, P.; CHAMBO, J. (1991). Origin and significance of anti-heart and anti-skeletal muscle autoantibodies in Chagas' disease. *Res Immunol*, 142: 160-163.
- LANGERMANS, J.A.; VAN DER HULST, M.E.; NIBBERING, P.H.; HIEMSTRA, P.S.; FRANSEN, L.; VAN FURTH, R. (1992). IFN-gamma-induced L-arginine-dependent toxoplasmastatic activity in murine peritoneal macrophages is mediated by endogenous tumor necrosis factor-alpha. *J Immunol*, 148: 568-574.
- LEAVEY, J.K. & TARLETON, R.L. (2003). Cutting edge: dysfunctional CD8⁺ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 170: 2264-2268.
- LEON, J.S. & ENGMAN, D.M. (2001). Autoimmunity in Chagas heart disease. *Int J Parasitol*, 31: 555-561.
- LIMA, A.P.; ALMEIDA, P.C.; TERSARIOL, I.L.; SCHMITZ, V.; SCHMAIER, A.H.; JULIANO, L.; HIRATA, I.Y.; MULLER-ESTERL, W.; CHAGAS, J.R.; SCHARFSTEIN, J. (2002). Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. *J Biol Chem*, 277: 5875-5881.
- LIMA, M.F.; ZHANG, Y.; VILLALTA, F. (1997). Beta-chemokines that inhibit HIV-1 infection of human macrophages stimulate uptake and promote destruction of *Trypanosoma cruzi* by human macrophages. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)*, 43: 1067-1076.

- LITT, M. & LUTY, J.A. (1989). A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet*, 44: 397-401.
- LUSTER, A.D. (2002). The role of chemokines in linking innate and adaptive immunity. *Curr Opin Immunol*, 14: 129-135.
- MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.; MESTRINER, F.L.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. (2000). Trypanosoma cruzi-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity. *Circulation*, 102: 3003-3008.
- MANETTI, R.; PARRONCHI, P.; GIUDIZI, M.G.; PICCINNI, M.P.; MAGGI, E.; TRINCHIERI, G.; ROMAGNANI, S. (1993). Natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12 [IL-12]) induces T helper type 1 (Th1)-specific immune responses and inhibits the development of IL-4-producing Th cells. *J Exp Med*, 177: 1199-1204.
- MANETTI, R.; GEROSA, F.; GIUDIZI, M.G.; BIAGIOTTI, R.; PARRONCHI, P.; PICCINNI, M.P.; SAMPOGNARO, S.; MAGGI, E.; ROMAGNANI, S.; TRINCHIERI, G.; ET AL. (1994). Interleukin 12 induces stable priming for interferon gamma (IFN-gamma) production during differentiation of human T helper (Th) cells and transient IFN-gamma production in established Th2 cell clones. *J Exp Med*, 179: 1273-1283.
- MARINHO, C.R.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; GRISOTTO, M.G.; ALVAREZ, J.M. (1999). Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infect Immun*, 67: 308-318.
- MARTINS, G.A.; PETKOVA, S.B.; MACHADO, F.S.; KITSIS, R.N.; WEISS, L.M.; WITTNER, M.; TANOWITZ, H.B.; SILVA, J.S. (2001). Fas-FasL interaction modulates nitric oxide production in Trypanosoma cruzi-infected mice. *Immunology*, 103: 122-129.
- MELO, R.C. & BRENER, Z. (1978). Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. *J Parasitol*, 64: 475-482.

- MESSIAS-REASON, I.J.; URBANETZ, L.; PEREIRA DA CUNHA, C. (2003). Complement C3 F and BF S allotypes are risk factors for Chagas disease cardiomyopathy. *Tissue Antigens*, 62: 308-312.
- METCALF, D.; ELLIOTT, M.J.; NICOLA, N.A. (1992). The excess numbers of peritoneal macrophages in granulocyte-macrophage colony-stimulating factor transgenic mice are generated by local proliferation. *J Exp Med*, 175: 877-884.
- MILEI, J.; SANCHEZ, J.; STORINO, R.; YU, Z.X.; DENDUCHIS, B.; FERRANS, V.J. (1993). Antibodies to laminin and immunohistochemical localization of laminin in chronic chagasic cardiomyopathy: a review. *Mol Cell Biochem*, 129: 161-170.
- MILES, M.A. (1974). Letter: Cloning *Trypanosoma cruzi*. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 68: 256.
- MING, M.; EWEN, M.E.; PEREIRA, M.E. (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*, 82: 287-296.
- MINOPRIO, P.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERT, B.; ANDRADE, L.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. (1988). Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. *Scand J Immunol*, 28: 553-561.
- MINOPRIO, P.; ANDRADE, L.; LEMBEZAT, M.P.; OZAKI, L.S.; COUTINHO, A. (1989). Indiscriminate representation of VH-gene families in the murine B lymphocyte responses to *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 142: 4017-4021.
- MINOPRIO, P.; BANDEIRA, A.; PEREIRA, P.; MOTA SANTOS, T.; COUTINHO, A. (1989). Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *Int Immunol*, 1: 176-184.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A. (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev*, 112: 183-207.

- MINOPRIO, P.; EL CHEIKH, M.C.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A.; O'GARRA, A. (1993). Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol*, 151: 4200-4208.
- MINOPRIO, P. (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol*, 31: 588-591.
- MINOPRIO, P.M.; COUTINHO, A.; JOSKOWICZ, M.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; EISEN, H. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol*, 24: 669-679.
- MINOPRIO, P.M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A. (1986). Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol*, 24: 661-668.
- MOORE, K.J. & NAGLE, D.L. (2000). Complex trait analysis in the mouse: The strengths, the limitations and the promise yet to come. *Annu. Rev. Genet.*, 34: 653-686.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A.; COFFMAN, R.L. (1986). Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*, 136: 2348-2357.
- MOSMANN, T.R. & MOORE, K.W. (1991). The role of IL-10 in crossregulation of TH1 and TH2 responses. *Immunol Today*, 12: A49-53.
- MOSMANN, T.R. & SAD, S. (1996). The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunol Today*, 17: 138-146.
- MULLER, U.; KOHLER, G.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A.; ALBER, G.; DI SANTO, J.P.; BROMBACHER, F.; HOLSCHEER, C. (2001). IL-12-independent IFN-gamma production by T cells in experimental Chagas' disease is mediated by IL-18. *J Immunol*, 167: 3346-3353.
- MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. (1992). Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on

- macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur J Immunol*, 22: 301-307.
- NABORS, G.S. & TARLETON, R.L. (1991). Differential control of IFN-gamma and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 146: 3591-3598.
- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S.; REESINK, M.; TYDINGS, J.; COHN, Z.A. (1982). *Trypanosoma cruzi*: induction of microbicidal activity in human mononuclear phagocytes. *J Immunol*, 128: 2142-2146.
- O'GARRA, A.; CHANG, R.; GO, N.; HASTINGS, R.; HAUGHTON, G.; HOWARD, M. (1992). Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur J Immunol*, 22: 711-717.
- OLIVARES FONTT, E.; HEIRMAN, C.; THIELEMANS, K.; VRAY, B. (1996). Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor: involvement in control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun*, 64: 3429-3434.
- OPPMANN, B.; LESLEY, R.; BLOM, B.; TIMANS, J.C.; XU, Y.; HUNTE, B.; VEGA, F.; YU, N.; WANG, J.; SINGH, K.; ZONIN, F.; VAISBERG, E.; CHURAKOVA, T.; LIU, M.; GORMAN, D.; WAGNER, J.; ZURAWSKI, S.; LIU, Y.; ABRAMS, J.S.; MOORE, K.W.; RENNICK, D.; DE WAAL-MALEFYT, R.; HANNUM, C.; BAZAN, J.F.; KASTELEIN, R.A. (2000). Novel p19 protein engages IL-12p40 to form a cytokine, IL-23, with biological activities similar as well as distinct from IL-12. *Immunity*, 13: 715-725.
- ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D.E.; RODRIGUEZ, M.; WEIGLE, W.O. (1980). Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 124: 121-126.
- PALOMINO, S.A.; AIELLO, V.D.; HIGUCHI, M.L. (2000). Systematic mapping of hearts from chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions and *Trypanosoma cruzi* antigens. *Ann Trop Med Parasitol*, 94: 571-579.
- PAUL, W.E. & SEDER, R.A. (1994). Lymphocyte responses and cytokines. *Cell*, 76: 241-251.

- PETKOVA, S.B.; TANOWITZ, H.B.; MAGAZINE, H.I.; FACTOR, S.M.; CHAN, J.; PESTELL, R.G.; BOUZAHAZAH, B.; DOUGLAS, S.A.; SHTUTIN, V.; MORRIS, S.A.; TSANG, E.; WEISS, L.M.; CHRIST, G.J.; WITTNER, M.; HUANG, H. (2000). Myocardial expression of endothelin-1 in murine *Trypanosoma cruzi* infection. *Cardiovasc Pathol*, 9: 257-265.
- PETRAY, P.; CORRAL, R.; MECKERT, P.; LAGUENS, R. (2002). Role of macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha) in macrophage homing in the spleen and heart pathology during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*, 83: 205-211.
- PINGE-FILHO, P.; TADOKORO, C.E.; ABRAHAMSOHN, I.A. (1999). Prostaglandins mediate suppression of lymphocyte proliferation and cytokine synthesis in acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Cell. Immunol.*, 193: 90-98.
- PINSKY, D.J.; AJI, W.; SZABOLCS, M.; ATHAN, E.S.; LIU, Y.; YANG, Y.M.; KLINE, R.P.; OLSON, K.E.; CANNON, P.J. (1999). Nitric oxide triggers programmed cell death (apoptosis) of adult rat ventricular myocytes in culture. *Am. J. Physiol.*, 277: H1189-1199.
- PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; PONS, F.G.; FALCOFF, E.; EISEN, H. (1984). Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* in vitro. *Eur J Immunol*, 14: 930-935.
- PLATA, F.; GARCIA-PONS, F.; WIETZERBIN, J. (1987). Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. *Ann Inst Pasteur Immunol*, 138: 397-415.
- PONTES-DE-CARVALHO, L.; SANTANA, C.C.; SOARES, M.B.; OLIVEIRA, G.G.; CUNHA-NETO, E.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. (2002). Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. *J Autoimmun*, 18: 131-138.
- POSTAN, M.; DVORAK, J.A.; MCDANIEL, J.P. (1983). Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN- mice with two clones isolated from a common source. *Am J Trop Med Hyg*, 32: 497-506.

- POSTAN, M.; CHEEVER, A.W.; DVORAK, J.A.; MCDANIEL, J.P. (1986). A histopathological analysis of the course of myocarditis in C3H/He mice infected with *Trypanosoma cruzi* clone Sylvio-X10/4. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 80: 50-55.
- POSTAN, M.; MCDANIEL, J.P.; DVORAK, J.A. (1987). Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 81: 415-419.
- PROUDFOOT, A.E. (2002). Chemokine receptors: multifaceted therapeutic targets. *Nat Rev Immunol*, 2: 106-115.
- REED, S.G.; ROTERS, S.B.; GOIDL, E.A. (1983). Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol*, 131: 1978-1982.
- REED, S.G.; NATHAN, C.F.; PIHL, D.L.; RODRICKS, P.; SHANEBECK, K.; CONLON, P.J.; GRABSTEIN, K.H. (1987). Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. Comparison with interferon gamma. *J Exp Med*, 166: 1734-1746.
- REED, S.G. (1988). In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*, 140: 4342-4347.
- REED, S.G.; BROWNELL, C.E.; RUSSO, D.M.; SILVA, J.S.; GRABSTEIN, K.H.; MORRISSEY, P.J. (1994). IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol*, 153: 3135-3140.
- REINA-SAN-MARTIN, B.; COSSON, A.; MINOPRIO, P. (2000). Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. *Parasitol Today*, 16: 62-67.
- REINA-SAN-MARTIN, B.; DEGRAVE, W.; ROUGEOT, C.; COSSON, A.; CHAMOND, N.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; ARALA-CHAVES, M.; COUTINHO, A.; MINOPRIO, P. (2000). A B-cell mitogen from a pathogenic trypanosome is a eukaryotic proline racemase. *Nat Med*, 6: 890-897.

- REY, L. (1991). Parasitologia - 2a edição. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan , p. 104-12, 138-52.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; PIRMEZ, C.; SAVINO, W. (1991). Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. *Res Immunol*, 142: 134-137.
- RODRIGUEZ, A.; RIOULT, M.G.; ORA, A.; ANDREWS, N.W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.*, 129: 1263-1273.
- RODRIGUEZ, A.M.; SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; BAZIN, H.; CAPRON, A. (1981). *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. *Infect Immun*, 31: 524-529.
- ROMANHA, A.J.; ALVES, R.O.; MURTA, S.M.; SILVA, J.S.; ROPERT, C.; GAZZINELLI, R.T. (2002). Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. *J Infect Dis*, 186: 823-828.
- ROTTENBERG, M.E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. (1993). Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun*, 61: 5129-5133.
- ROTTENBERG, M.E.; RIARTE, A.; SPORRONG, L.; ALTCHER, J.; PETRAY, P.; RUIZ, A.M.; WIGZELL, H.; ORN, A. (1995). Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett*, 45: 53-60.
- ROWLAND, E.C. & KUHN, R.E. (1978). Suppression of anamnestic cellular responses during experimental American trypanosomiasis. *J Parasitol*, 64: 741-742.
- ROY, M.F. & MALO, D. (2002). Genetic regulation of host responses to *Salmonella* infection in mice. *Genes Immun*, 3: 381-393.
- RUPPERT, E.E. & BARNES, R.D. (1994). *Invertebrate Zoology* - 6th ed. New York: Saunders College Publishing, p. 10-67.

- RUSCETTI, F.; VARESIO, L.; OCHOA, A.; ORTALDO, J. (1993). Pleiotropic effects of transforming growth factor-beta on cells of the immune system. *Ann N Y Acad Sci*, 685: 488-500.
- RUSO, M.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. (1988). Depletion of L3T4+ T lymphocytes during acute *Trypanosoma cruzi* infection abolish macrophage and B lymphocyte activation but not tissue inflammatory reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 83: 527-538.
- RUSO, M.; STAROBINAS, N.; MARCONDES, M.C.; MINOPRIO, P.; HONTEYBERIE-JOSKOWICZ, M. (1996). The influence of T cell subsets on *Trypanosoma cruzi* multiplication in different organs. *Immunol Lett*, 49: 163-168.
- SADIGURSKY, M.; ACOSTA, A.M.; SANTOS-BUCH, C.A. (1982). Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. *Am J Trop Med Hyg*, 31: 934-941.
- SAEFTEL, M.; FLEISCHER, B.; HOERAUF, A. (2001). Stage-dependent role of nitric oxide in control of *Trypanosoma cruzi* infection. *Infect Immun*, 69: 2252-2259.
- SALGAME, P.; ABRAMS, J.S.; CLAYBERGER, C.; GOLDSTEIN, H.; CONVIT, J.; MODLIN, R.L.; BLOOM, B.R. (1991). Differing lymphokine profiles of functional subsets of human CD4 and CD8 T cell clones. *Science*, 254: 279-282.
- SANCHEZ, F.; RADAIEVA, T.V.; NIKONENKO, B.V.; PERSSON, A.S.; SENGUL, S.; SCHALLING, M.; SCHURR, E.; APT, A.S.; LAVEBRATT, C. (2003). Multigenic control of disease severity after virulent *Mycobacterium tuberculosis* infection in mice. *Infect Immun*, 71: 126-131.
- SARTORI, A.M.; NETO, J.E.; NUNES, E.V.; BRAZ, L.M.; CAIAFFA-FILHO, H.H.; OLIVEIRA ODA, C., JR.; NETO, V.A.; SHIKANAI-YASUDA, M.A. (2002). *Trypanosoma cruzi* parasitemia in chronic Chagas disease: comparison between human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative patients. *J Infect Dis*, 186: 872-875.
- SCHARFSTEIN, J.; SCHMITZ, V.; MORANDI, V.; CAPELLA, M.M.; LIMA, A.P.; MORROT, A.; JULIANO, L.; MULLER-ESTERL, W. (2000). Host cell invasion

- by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med*, 192: 1289-1300.
- SCOTT, M.T. & GOSS-SAMPSON, M. (1984). Restricted IgG isotype profiles in *T. cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clin. Exp. Immunol.*, 58: 372-379.
- SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R.; REED, S.G. (1991). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *J Exp Med*, 174: 539-545.
- SILVA, J.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. (1992). Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exp Med*, 175: 169-174.
- SILVA, J.S.; MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A. (2003). The role of nitric oxide in the pathogenesis of Chagas disease. *Front. Biosci.*, 8: s314-325.
- SILVEIRA, F.; VIANA DIAS, M.; PEREIRA PARDAL, P.; OLIVEIRA LOBAO, A.; BRITTO MELO, G. (1979). Nono caso autóctone de doença de Chagas registrado no estado do Pará, Brasil (Nota prévia). *Hileia Medica*, Belém, 1: 61-62.
- SKEIKY, Y.A.; BENSON, D.R.; GUDERIAN, J.A.; SLEATH, P.R.; PARSONS, M.; REED, S.G. (1993). *Trypanosoma cruzi* acidic ribosomal P protein gene family. Novel P proteins encoding unusual cross-reactive epitopes. *J Immunol*, 151: 5504-5515.
- SNAPPER, C.M. & PAUL, W.E. (1987). B cell stimulatory factor-1 (interleukin 4) prepares resting murine B cells to secrete IgG1 upon subsequent stimulation with bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol*, 139: 10-17.
- SNAPPER, C.M.; MCINTYRE, T.M.; MANDLER, R.; PECANHA, L.M.; FINKELMAN, F.D.; LEES, A.; MOND, J.J. (1992). Induction of IgG3 secretion by interferon gamma: a model for T cell-independent class switching in response to T cell-independent type 2 antigens. *J Exp Med*, 175: 1367-1371.
- SOONG, L. & TARLETON, R.L. (1994). *Trypanosoma cruzi* infection suppresses nuclear factors that bind to specific sites on the interleukin-2 enhancer. *Eur J Immunol*, 24: 16-23.

- SPINELLA, S.; LIEGEARD, P.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. (1992). Trypanosoma cruzi: predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. *Exp Parasitol*, 74: 46-56.
- STEFANI, M.M.; TAKEHARA, H.A.; MOTA, I. (1983). Isotype of antibodies responsible for immune lysis in Trypanosoma cruzi infected mice. *Immunol Lett*, 7: 91-97.
- STERIN-BORDA, L.; PEREZ LEIROS, C.; WALD, M.; CREMASCHI, G.; BORDA, E. (1988). Antibodies to beta 1 and beta 2 adrenoreceptors in Chagas' disease. *Clin. Exp. Immunol.*, 74: 349-354.
- SZABO, S.J.; SULLIVAN, B.M.; PENG, S.L.; GLIMCHER, L.H. (2003). Molecular mechanisms regulating Th1 immune responses. *Annu. Rev. Immunol.*, 21: 713-758.
- TAFURI, W.L. (1987). [Pathogenesis of Chagas' disease]. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*, 29: 194-199.
- TAGA, K. & TOSATO, G. (1992). IL-10 inhibits human T cell proliferation and IL-2 production. *J Immunol*, 148: 1143-1148.
- TAKEHARA, H.A.; PERINI, A.; DA SILVA, M.H.; MOTA, I. (1981). Trypanosoma cruzi: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exp Parasitol*, 52: 137-146.
- TAMBOURGI, D.V.; KIPNIS, T.L.; DIAS DA SILVA, W. (1989). Trypanosoma cruzi: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cells and by mastocytoma cells. *Exp Parasitol*, 68: 192-201.
- TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M.; WITTNER, M. (1992). Chagas' disease. *Clin Microbiol Rev*, 5: 400-419.
- TARLETON, R. 1993. Pathology of American trypanosomiasis. In: Warren, K.S. (Ed) *Immunology and molecular biology of parasitic infections*. Blackwell, Boston. p 64-71 pp.
- TARLETON, R.L. (1988). Trypanosoma cruzi-induced suppression of IL-2 production. II. Evidence for a role for suppressor cells. *J Immunol*, 140: 2769-2773.

- TARLETON, R.L. (1990). Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 144: 717-724.
- TARLETON, R.L. (1991). Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Exp Parasitol*, 73: 106-109.
- TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. (1992). Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*, 356: 338-340.
- TARLETON, R.L.; ZHANG, L.; DOWNS, M.O. (1997). "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94: 3932-3937.
- TARLETON, R.L. & ZHANG, L. (1999). Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*, 15: 94-99.
- TARLETON, R.L. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*, 31: 550-554.
- TARLETON, R.L. (2003). Chagas disease: a role for autoimmunity? *Trends Parasitol*, 19: 447-451.
- TEIXEIRA, A.R.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A. (1978). Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. *J Clin Invest*, 62: 1132-1141.
- TEIXEIRA, A.R. (1987). *T.cruzi* e Doenças de Chagas. IC - Modos de transmissão; ID - Incidência e importância econômica. In: Doenças de Chagas e outras doenças por tripanossomas. Ed. Univ. de Brasília, 19-22. Ed. Univ. de Brasília, 19-22.
- TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. (2002). Chemokines, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. *Trends Parasitol*, 18: 262-265.
- TERNYNCK, T.; BLEUX, C.; GREGOIRE, J.; AVRAMEAS, S.; KANELLOPOULOS-LANGEVIN, C. (1990). Comparison between autoantibodies arising during *Trypanosoma cruzi* infection in mice and natural autoantibodies. *J Immunol*, 144: 1504-1511.

- TIBBETTS, R.S.; MCCORMICK, T.S.; ROWLAND, E.C.; MILLER, S.D.; ENGMAN, D.M. (1994). Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol*, 152: 1493-1499.
- TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M.T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A.; CARLIER, Y. (1991). Endogenous IFN-gamma is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Immunol*, 146: 3626-3632.
- TOWBIN, H.; ROSENFELDER, G.; WIESLANDER, J.; AVILA, J.L.; ROJAS, M.; SZARFMAN, A.; ESSER, K.; NOWACK, H.; TIMPL, R. (1987). Circulating antibodies to mouse laminin in Chagas disease, American cutaneous leishmaniasis, and normal individuals recognize terminal galactosyl(alpha 1-3)-galactose epitopes. *J Exp Med*, 166: 419-432.
- TRINCHIERI, G. & SCOTT, P. (1995). Interleukin-12: a proinflammatory cytokine with immunoregulatory functions. *Res Immunol*, 146: 423-431.
- TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M.; BLOOM, B. (1978). *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp Parasitol*, 45: 160-168.
- TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B.R. (1982). Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 35: 546-551.
- UMEKITA, L.F. & MOTA, I. (1989). In-vitro lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: role of C3b receptors. *Parasite Immunol*, 11: 561-566.
- UMEKITA, L.F. & MOTA, I. (2000). How are antibodies involved in the protective mechanism of susceptible mice infected with *T. cruzi*? *Braz J Med Biol Res*, 33: 253-258.
- UNE, C.; ANDERSSON, J.; ELORANTA, M.L.; SUNNEMARK, D.; HARRIS, R.A.; ORN, A. (2000). Enhancement of natural killer (NK) cell cytotoxicity and induction of NK cell-derived interferon-gamma (IFN-gamma) display different kinetics during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Clin. Exp. Immunol.*, 121: 499-505.

- VAGO, A.R.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; REIS, D.D.; CORREA-OLIVEIRA, R. (1996). PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 348: 891-892.
- VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES, S., JR.; MOREIRA, M.C.; FILHO, G.B.; PENA, S.D. (2000). 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*, 156: 1805-1809.
- VAN VOORHIS, W.C. & EISEN, H. (1989). FI-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *J Exp Med*, 169: 641-652.
- VERA-CRUZ, J.M.; MAGALLON-GASTELUM, E.; GRIJALVA, G.; RINCON, A.R.; RAMOS-GARCIA, C.; ARMENDARIZ-BORUNDA, J. (2003). Molecular diagnosis of Chagas' disease and use of an animal model to study parasite tropism. *Parasitol Res*, 89: 480-486.
- VESPA, G.N.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*, 62: 5177-5182.
- VIA, C.S. & SHEARER, G.M. (1988). T-cell interactions in autoimmunity: insights from a murine model of graft-versus-host disease. *Immunol Today*, 9: 207-213.
- VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K.E.; BURNS, J.M., JR.; LIMA, M.F. (1998). Signal transduction in human macrophages by gp83 ligand of *Trypanosoma cruzi*: trypomastigote gp83 ligand up-regulates trypanosome entry through the MAP kinase pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 249: 247-252.
- VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K.E.; KAPPES, J.C.; LIMA, M.F. (1998). The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1 α , and MIP-1 β induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infect Immun*, 66: 4690-4695.
- WHO. 2002. Technical Report Series 905. 1-109 pp.
- WILSON, K.C. & FINBLOOM, D.S. (1992). Interferon gamma rapidly induces in human monocytes a DNA-binding factor that recognizes the gamma response

- region within the promoter of the gene for the high-affinity Fc gamma receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 89: 11964-11968.
- WIRTH, J.J.; KIERSZENBAUM, F.; SONNENFELD, G.; ZLOTNIK, A. (1985). Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun*, 49: 61-66.
- WIRTH, J.J.; KIERSZENBAUM, F.; ZLOTNIK, A. (1989). Effects of IL-4 on macrophage functions: increased uptake and killing of a protozoan parasite (*Trypanosoma cruzi*). *Immunology*, 66: 296-301.
- WOOD, J.N.; HUDSON, L.; JESSELL, T.M.; YAMAMOTO, M. (1982). A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites. *Nature*, 296: 34-38.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S.; WATSON, J. (1982). Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infect Immun*, 36: 637-644.
- WU, C.Y.; DEMEURE, C.; KINIWA, M.; GATELY, M.; DELESPESE, G. (1993). IL-12 induces the production of IFN-gamma by neonatal human CD4 T cells. *J Immunol*, 151: 1938-1949.
- ZHANG, L. & TARLETON, R.L. (1996). Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. *Eur J Immunol*, 26: 102-109.
- ZHANG, L. & TARLETON, R.L. (1996). Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Exp Parasitol*, 84: 203-213.
- ZHANG, L. & TARLETON, R.L. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*, 180: 480-486.
- ZLOTNIK, A. & YOSHIE, O. (2000). Chemokines: a new classification system and their role in immunity. *Immunity*, 12: 121-127.

ZURAWSKI, G. & DE VRIES, J.E. (1994). Interleukin 13, an interleukin 4-like cytokine that acts on monocytes and B cells, but not on T cells. *Immunol Today*, 15: 19-26.

10. ABSTRACT

This work describes a novel murine model of the chronic infection by *T. cruzi* using the clone Sylvio-X10/4. The infection in the C3H/HePAS mouse strain is characterized by intense inflammatory lesions in the heart, which can be comparable to the observed in the human Chagas' disease. Moderate striated muscle lesions are also present in C3H/HePAS mice. In the heart of the chronic animals viable parasites were detected, confirming the hypothesis that the development of the heart pathology in the Chagas' disease is related to parasite persistence in the inflamed tissue. By contrast, in infected A/J mice, develop lesions in the liver and skeletal muscle, while in the heart, lesions nor parasites were not observed. The phenotypic analysis of the generations F₁ and F₂ (A/J X C3H/HePAS) mice suggests that the genetic predisposition to develop the inflammatory lesions caused by *T. cruzi* is heterogeneous because the heart and liver pathology segregate in the F₂ generation. These findings raise the hypothesis that the pathology heterogeneity observed in humans with Chagas' disease (absence and presence of cardiac or digestive chronic lesions) can be attributed to host genetic factors.

11. ANEXOS

11.1 ANEXO 1: PATHOLOGY AFFECTS DIFFERENT ORGANS IN TWO MOUSE STRAINS CHRONICALLY INFECTED BY A *Trypanosoma cruzi* CLONE: A MODEL FOR GENETIC STUDIES IN CHAGAS' DISEASE. CLAUDIO R.F. MARINHO, DANIELLA Z. BUCCI, MARIA LÚCIA Z. DAGLI, KARINA R.B. BASTOS, MARCOS G. GRISOTTO, LUIZ R. SARDINHA, CRISTIANE R.G.M. BAPTISTA, CARLOS PENHA GONÇALVES, MARIA REGINA D'IMPÉRIO LIMA AND JOSÉ M. ÁLVAREZ.

11.2 ANEXO 2: CHALLENGE OF *T. cruzi* CHRONICALLY-INFECTED MICE WITH TRYPOMASTIGOTES ACTIVATES THE IMMUNE SYSTEM AND REDUCES SUB-PATENT PARASITEMIA LEVELS. CLAUDIO R.F. MARINHO, KARINA R.B. BASTOS, LUIZ R. SARDINHA, MARCOS G. GRISOTTO, MARIA REGINA D'IMPÉRIO LIMA AND JOSÉ M. ÁLVAREZ.