

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO - UFOP
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS - NUPEB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

**ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO CRÔNICA POR
FORMAS TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS OU METACÍCLICAS DO**
Trypanosoma cruzi **EM CAMUNDONGOS**

FLÁVIA CARVALHO BITENCOURT DE OLIVEIRA

OURO PRETO - 2013

FLÁVIA CARVALHO BITENCOURT DE OLIVEIRA

**ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA INFECÇÃO CRÔNICA POR FORMAS
TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEAS OU METACÍCLICAS DO *Trypanosoma cruzi*
EM CAMUNDONGOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Cláudia Martins Carneiro
Co-orientadora: Paula Melo de Abreu Vieira

OURO PRETO

O482a Oliveira, Flávia Carvalho Bitencourt de.
Aspectos imunopatológicos da infecção crônica por formas tripomastigotas
sanguíneas ou metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* em camundongos
[manuscrito] / Flávia Carvalho Bitencourt de Oliveira. - 2013.

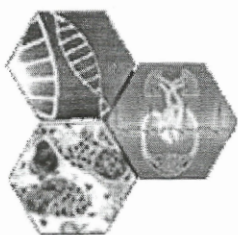
83f.: il., color; graf.; tabs.; mapas

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.
Coorientadora: Profa. Dra. Paula Melo de Abreu Vieira.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de
Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas.
Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Tripanossomose - Teses. 2. *Trypanosoma cruzi* - Teses. 3.
Imunopatologia - Teses. 4. Infecção - Teses. I. Carneiro, Cláudia Martins. II.
Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV.
Título.

CDU: 577.27:616.993.161



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

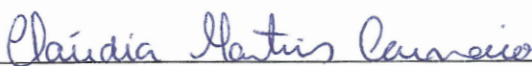


Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

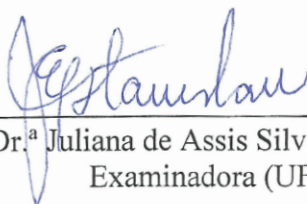
“Aspectos imunopatológicos da infecção crônica por formas tripomastigotas sanguíneas ou metacíclicas do *Trypanosoma cruzi* em camundongos”

Aos sete dias do mês de Maio de 2013, às 09:00, na Sala Multimídia do ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Flávia Carvalho Bitencourt de Oliveira**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, argüição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por aprova a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

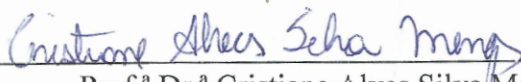
Membros da Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Cláudia Martins Carneiro
Presidente



Prof.^a Dr.^a Juliana de Assis Silva Gomes Estanislau
Examinadora (UFMG)



Prof.^a Dr.^a Cristiane Alves Silva Menezes
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 07/05/2013

*“Se eu fui capaz de ver mais longe é porque estava
de pé sobre os ombros de gigantes.”*

(Isaac Newton)

A todos vocês, gigantes, que fizeram parte desse momento.

EU sou o Caminho, a Verdade e a Vida (João 14:6)

A Deus, minha base. Fonte de luz e força, por me conceder a vida, por colocar pessoas especiais no meu caminho, pelas oportunidades únicas.

Aos meus pais, que nunca mediram esforços. Por abdicarem de seus sonhos para realizarem os meus. Pelo amor incondicional. Por sempre estarem ao meu lado e me apoiarem.

À minha irmã Fernanda, meu amor, pelo carinho, amizade, apoio e cumplicidade!

À professora Cláudia, exemplo de mestre, pesquisadora, garra, sabedoria, determinação e força. Muito obrigada pela oportunidade, confiança, paciência e orientação.

À Paulinha, meu anjo da guarda, por guiar meus passos desde a iniciação científica. Obrigada pela co-orientação, pela paciência, por dividir comigo seus conhecimentos e por acreditar em mim! Obrigada pelo apoio, pela disponibilidade, pelo carinho, conselhos e amizade.

À Maria, pelos ensinamentos e pelo carinho.

À Kátia pela amizade, risadas, carinho, preocupação, disponibilidade (SEMPRE) e ensinamentos.

À Amandinha, Ana, Day, Jú, Lú e Nádia pelo apoio, torcida, ajuda, carinho, conversas, risadas, conselhos e momentos únicos.

Ao Bruno pela ajuda, conselhos e verdades ditas. Obrigada! E não desligue o telefone (rs)!!!

Às pequenas Larissa, Lara e, em especial, à Flávia pela ajuda e dedicação sem limites.

Carol, Edith, Gleise e Tânia pelo carinho e por sempre estarem dispostas a me ajudar.

Bruna, Dani, Fernando, Glau e Levi pelo imenso apoio e ótimos momentos juntos.

Ao professor Alexandre pelo incentivo e pelas sugestões.

A todos dos Laboratórios de Imunopatologia e Pesquisas Clínicas pelo apoio, aprendizado e ótima convivência. EU VOU SENTIR SAUDADES!!!

À Helen, Jam e Vivi. Ainda e sempre! Minhas irmãs, metades de mim. De qualquer forma, sempre presentes! Obrigada pelo amor sem limites, apoio, amizade, cumplicidade, preocupação, ligações infinitas, choros, risos, conselhos...

*“... É tão forte quanto o vento quando sopra, tronco forte que não quebra, não entorta!
Podes crer, puedes crer, eu tô falando de amizade...”*

À Lari, meu apoio, companhia e sorrisos de TODOS os dias! Obrigada pela paciência, pela amizade, pelo carinho e cuidado. Obrigada por SEMPRE estar ao meu lado.

Bru, Fê, Flor, Jú, Kati, Mi, Pri, Rê, Rafa, Tchão, Repúblicas Coincidência, Tira Mágoa e Toca:

“Há pessoas que transformam o sol numa simples mancha amarela, mas há aquelas que fazem de uma simples mancha amarela o próprio sol.”

(Pablo Picasso)

A todos que torceram por mim... Obrigada!

Mesmo apresentando um repertório de moléculas de superfície distinto, ambas as formas infectantes do *Trypanosoma cruzi*, tripomastigotas metacíclicas - TM - (transmissão vetorial) e sanguíneas - TS - (transmissão não vetorial), são funcionais na interação parasito-hospedeiro e/ou invasão de células-alvo. Entretanto, a interação inicial com o hospedeiro vertebrado pode desencadear uma resposta imune diferenciada possivelmente relacionada à evolução clínica distinta da doença de Chagas (DC) ao longo da fase crônica. Estudos do nosso grupo de pesquisa demonstraram que na fase aguda da DC a interação inicial entre formas TS e o hospedeiro vertebrado induz um perfil de resposta imunológica diferente daquele observado na infecção por formas TM. A infecção por TS é mais exuberante e, mesmo com o controle da parasitemia, não há o estabelecimento de uma resposta imunoreguladora eficaz, levando assim a uma inflamação persistente. A infecção por TM é mais silenciosa, promovendo uma resposta imune capaz não só de controlar o número de parasitos durante a fase inicial da infecção como também de estabelecer uma resposta imunoreguladora ao final da fase aguda. Dessa maneira, o estudo da infecção por diferentes formas infectantes do *T. cruzi* na fase crônica da infecção possibilitará uma melhor compreensão do efeito da fonte do inóculo sobre a interação *T. cruzi* x células do hospedeiro. Além disso, como as transmissões por via transfusional e congênita em países não endêmicos têm sido reconhecidas como um sério problema será importante saber o impacto da infecção por TS no curso da DC. Baseado nisso, o objetivo desse trabalho foi avaliar as alterações relacionadas aos parâmetros imunológicos celulares na fase crônica da infecção experimental de camundongos por formas TS ou TM da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. Os resultados mostraram no sangue periférico redução de leucócitos totais e linfócitos em ambos os grupos infectados e de monócitos apenas no grupo TS. Os animais infectados por formas TM apresentaram aumento de células NK e TCD4⁺ circulantes. A avaliação da produção de citocinas intracitoplasmáticas por esplenócitos demonstrou aumento do percentual de células TCD4⁺ produtoras de TNF- α no grupo TS e de IL-10⁺ no grupo TM. Por outro lado houve redução do percentual de células TCD8⁺ IFN- γ ⁺ no grupo TM. Também foi verificado aumento significativo no percentual das citocinas TNF- α , IFN- γ e IL-10 produzidas por linfócitos B no grupo TM. A avaliação da expressão de citocinas no coração mostrou redução da expressão do mRNA da citocina TNF- α no grupo TM e aumento das citocinas IL-10 e TGF- β no grupo TS. Qualitativamente foram observadas células inflamatórias no coração dos animais dos dois grupos, TS e TM. Porém, quantitativamente não houve diferença significativa entre eles, mesmo que no grupo TS seja observado um maior número de células inflamatórias. Por outro lado, observou-se aumento significativo da área de fibrose nos grupos TS e TM em relação ao controle e maior área de fibrose no TM quando comparado ao TS. Diante destes resultados, sugere-se que a infecção por TM já se resolveu aos 180 dias, com um perfil de citocinas anti-inflamatório e evolução para um quadro de resolução por fibrose mais expressivo. No grupo TS há um perfil de citocinas ainda pró-inflamatório, com um quadro de fibrose cardíaca em ascensão, como indicado pela presença de TGF- β , sugerindo que provavelmente a infecção por TS evolui para um quadro resolutivo mais tardio e grave.

Despite presenting a distinct repertoire of surface molecules, both infective forms of *Trypanosoma cruzi*, metacyclic trypomastigotes - MT - (vectorial transmission) and blood trypomastigotes - BT - (no vectorial transmission), are functional in the host-parasite interaction and / or invasion of target cells. However, the initial interaction with the vertebrate host can trigger an immune response that is differentiated and possibly related to distinct clinical evolution of Chagas disease (CD) during the chronic phase. Studies of our research group showed that in the acute phase of CD the initial interaction between BT forms and vertebrate host induces an immune response profile different from that observed in infections with MT forms. The infection with BT forms is more striking and even with the control of parasitemia, there is no establishment of an effective immunoregulatory response, thus leading to persistent inflammation. MT infection is more silent, promoting an immune response capable of controlling not only the number of parasites during the initial phase of infection as well as to establish an immunoregulatory response in the end of acute phase. Therefore, the study of infection by different infective forms of *T. cruzi* in the chronic phase of infection will enable a better understanding of how the source of inoculum may interfere with the *T. cruzi*/host cells interaction. Moreover, due to the fact that the transfusion and congenital transmissions in non-endemic countries are recognized as a serious problem would be important to know what is the impact of infection with BT forms in the disease course. Based on this, the aim of this study was to evaluate changes related to cellular immunological parameters in chronic experimental infection of mice by BT and MT forms of Berenice-78 *T. cruzi* strain. The results showed that in peripheral blood, the infection caused a reduction in total leukocytes and lymphocytes in both infected groups and a decrease in the number of monocytes in the BT group. The animals infected with MT forms showed increased of NK and CD4⁺ circulating cells. The evaluation of intracytoplasmatic cytokine production by splenocytes showed a significant increase in the percentage of TNF- α , IFN- γ and IL-10 produced by B lymphocytes in MT group. It was observed an increase in the percentage of CD4⁺ cells producing TNF-a in the BT group and of CD4⁺IL-10⁺ cells in the MT group. On the other hand, there was a decrease in the percentage of CD8⁺IFN- γ ⁺ cells in the MT group. The expression of cytokines in heart showed a reduction in mRNA expression of TNF-a in the MT group and an increase of IL-10 and TGF- β in the BT group. The qualitatively analysis demonstrated the presence of inflammatory cells in the hearts of animals in both groups, BT and MT. However, quantitatively there was no significant difference between them, but in the BT group is observed a greater number of inflammatory cells. On the other hand, there was significant increase in the area of fibrosis in BT and MT groups compared to NI and increased fibrosis area in MT compared to BT. Given these results, it is suggested that the infection has resolved in MT at 180 days, with a profile of anti-inflammatory cytokines and evolution to a resolution profile followed by a fibrosis more expressive. In the BT group there is still a profile of proinflammatory cytokines, with a rising cardiac fibrosis, as indicated by the presence of TGF- β , suggesting that probably infection by BT forms progresses to a later resolute and severe process.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações celulares..... 21

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em subpopulações leucocitárias 22

Tabela 3: Sequências dos iniciadores..... 24

Figura 1: Camundongos *Swiss*, machos, divididos em três grupos experimentais: NI (não infectados), TS (infectados com formas tripomastigotas sanguíneas) e TM (infectados com formas tripomastigotas metacíclicas)..... 19

Figura 2: Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por células NK, B, TCD4⁺, e TCD8⁺..... 23

Figura 3: Desenho, síntese e padronização dos iniciadores utilizados..... 24

Figura 4: Valores absolutos do leucograma de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção.. 31

Figura 5: Número absoluto de células NK, B, TCD4 e TCD8 no sangue periférico de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção.. 32

Figura 6: Percentual médio de células NK, B, TCD4⁺ e TCD8⁺ no baço de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção.. 33

Figura 7: Percentual de células NK TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ no baço de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção.. 34

Figura 8: Percentual de células B TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção.. 35

Figura 9: Percentual médio de células TCD4 TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção..... 36

Figura 10: Percentual médio de células TCD8 TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção..... 37

Figura 11: Expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) no coração de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção.. 38

Figura 12: Expressão do mRNA de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) no coração de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção.. 39

Figura 13: Quantificação de núcleos celulares no músculo cardíaco de camundongos não infectados (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção..... 40

Figura 14: Quantificação da área de fibrose no músculo cardíaco de camundongos não infectado (NI) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. 41

Figura 15: Fotomicrografias de cortes histológicos cardíacos de camundongos *Swiss* machos não infectados (NI) e infectados com formas tripomastigostas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* eutanasiados aos 180 dias após a infecção..... 42

DC	Doença de Chagas
BFA	Brefeldina A
DAI	Dia após a infecção
EDTA	Ácido etilendiminotetraácetico sal dissódico
GAPDH	Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase
GIPLs	Glicoinositolfosfolipídeos
Gp 85	Glicoproteína 85
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL-4	Interleucina - 4
IL-12	Interleucina - 12
IL-10	Interleucina – 10
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
NK	Células Natural Killer
NO	Óxido Nítrico
PIP3	Fosfatidilinositol 1,4,5 – Fosfato
PLC	Fosfolipase C
PTK	Proteína tirosina kinase
TM	Tripomastigota metacíclica
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TS	Tripomastigota sanguínea

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	2
1.2 - As formas da doença de Chagas	4
1.3 - Interação Parasito x Hospedeiro	7
1.3 - Resposta Imune	9
2 - JUSTIFICATIVA	13
3 - OBJETIVOS	15
3.1 - Objetivo geral	16
3.2 - Objetivos específicos	16
4 - MATERIAIS E MÉTODOS	17
4.1 - Animais e Infecção pelo <i>T. cruzi</i>	18
4.2 - Necropsia	18
4.3 - Leucograma	20
4.4 - Imunofenotipagem do sangue periférico	20
4.5 - Avaliação fenotípica de esplenócitos	21
4.6 - Avaliação dos níveis teciduais de citocinas	21
4.7 - Processamento do material para microscopia óptica	26
4.8 - Análise estatística	21
5 - RESULTADOS	30
5.1 - Leucograma	31
5.2 - Imunofenotipagem das Células do Sangue Periférico	32
5.3 - Análise do perfil leucocitário do baço	33
5.4 - Citocinas produzidas por células esplênicas	34
5.4.1.1 - Células NK	34
5.4.2.1 - Células B	35
5.4.2.2 - Células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺	36
5.5 - Avaliação dos Níveis Cardíacos de Citocinas	37

5.6 - Alterações histopatológicas	40
5.6.1 - Quantificação do processo inflamatório cardíaco	40
5.6.2 - Análise morfométrica da fibrose cardíaca	41
6 - DISCUSSÃO	43
7 - CONCLUSÕES	52
8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	54

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - O *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas

A Tripanosomíase Americana ou doença de Chagas (DC) foi descrita no ano de 1909, pelo médico brasileiro Carlos Chagas (1879-1934) durante um projeto de erradicação da malária, em Lassance, no estado de Minas Gerais.

A doença é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) e possui como vetores insetos hematófagos da família Reduviidae, subfamília *Triatominae* e dos gêneros *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*. Originalmente de natureza enzoótica, a doença de Chagas passou à condição de antropozoonose, a partir de intervenções humanas no ambiente silvestre, alterando o ambiente natural de circulação do *T. cruzi* (DIAS, 2000; COURA *et al.*, 2007).

Estudos sobre os mecanismos de transmissão mostram que além da vetorial, a qual ocorre apenas em países endêmicos, há casos alternativos pela via transfusional (LEIBY *et al.*, 2002; YOUNG *et al.*, 2007), que é uma importante via de disseminação da doença, pois formas tripomastigotas sanguíneas permanecem viáveis em hemoderivados estocados nos bancos de sangue (PRATA, 2001). As vias oral (Da SILVA VALENTE *et al.*, 1999; MONCAYO & ORTIZ YANINE, 2006; DIAS *et al.*, 2008), congênita (GÜRTLER *et al.*, 2003; DORN *et al.*, 2007; SCHMUNIS *et al.*, 2007), por transplantes de órgãos (Centers For Disease Control And Prevention, 2006), por manuseio de animais infectados e acidentes laboratoriais também podem ser identificadas (PRATA, 2001).

De acordo com os dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) existem cerca de 7 a 8 milhões de pessoas infectadas no mundo e aproximadamente 90 milhões correm o risco de infecção. Essa zoonose é típica da América Latina, e está presente em países como Argentina, Belize, Bolívia, Brasil, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Guiana, Honduras, México, Nicarágua, Panamá, Paraguai, Peru, Suriname, Venezuela e Uruguai.

Nas últimas décadas, a doença tem sido observada, devido à alta taxa de migração, em países não endêmicos como Alemanha, Austrália, Áustria, Bélgica, Canadá, Croácia, Dinamarca, Espanha, Estados Unidos, França, Holanda, Itália, Japão, Luxemburgo, Noruega, Portugal, Reino Unido, Romênia, Suécia e Suíça (SCHMUNIS, 2010).

As principais formas de controle da doença abrangem as ações de combate químico periódico aos insetos vetores e melhorias habitacionais complementadas por

rigorosa seleção sorológica de doadores de sangue e órgãos bem como a realização de diagnóstico precoce e tratamento específico de indivíduos infectados (DIAS *et al.*, 2002).

Programas tradicionais de controle em países latino-americanos têm focado na pulverização com inseticidas em casas, edifícios e anexos domésticos. Programas nacionais de controle que visam a interrupção dos ciclos domésticos e peridomiciliares de transmissão envolvendo vetores, reservatórios animais e seres humanos são viáveis e têm provado ser muito eficazes em áreas endêmicas (DIAS *et al.*, 2002). Com a implementação de programas de eliminação da transmissão pelo vetor e por transfusão de sangue, coordenados por países do Cone Sul, houve um decréscimo substancial na incidência epidemiológica da doença em vários países da América Latina (SCHMUNIS, 2007; MONCAYO & SILVEIRA, 2009).

Na ausência da transmissão vetorial, aquelas que ocorrem por transfusão sanguínea e congênita ganham mais importância, principalmente em regiões não endêmicas, como nos Estados Unidos e Europa onde há um grande número de imigrantes Latino Americanos (GASCON *et al.*, 2010).

A legislação europeia rejeita doações de sangue por pessoas com risco de estarem contaminadas. Entretanto, os rastreamentos nos bancos de sangue não são confiáveis, uma vez que as informações são colhidas por formulários e grande parte dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* desconhecem esta condição. Nos Estados Unidos, devido ao elevado número de casos, algumas regiões possuem um rastreamento eficaz dos bancos de sangue. Neste país há raras infecções vetoriais, e assim como na Europa, a grande maioria dos indivíduos infectados é imigrante. (BERN, 2007; SCHMUNIS, 2007; GASCON *et al.*, 2010).

O *T. cruzi*, pertencente à classe *Kinetoplastea*, ordem *Trypanosomatida* e família *Trypanosomatidae*, é caracterizado pela existência de um único flagelo e do cinetoplasto, uma organela que contém DNA. O parasito apresenta três diferentes formas evolutivas, sendo que no hospedeiro invertebrado, o triatomíneo, são encontradas as formas epimastigotas e TM, enquanto, no hospedeiro vertebrado são encontradas as formas amastigotas, as quais são formas replicativas e as formas TS.

Ao se alimentar do sangue de um mamífero infectado o triatomíneo ingere as formas TS, que ao alcançarem o estômago, sob condições de pH e temperatura específicas, se transformam em formas epimastigotas e seguem para o intestino onde se reproduzem por divisão binária simples longitudinal e se instalam permanentemente.

Chegando ao reto, as formas epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigostas metacíclicas que são eliminadas junto às fezes e urina dos triatomíneos durante o repasto sanguíneo, podendo estas penetrar pela mucosa, conjuntiva ou pele lesionada. As formas TM podem invadir diferentes tipos de células do hospedeiro vertebrado incluindo as dos músculos estriado e liso, fibroblastos, macrófagos e células de Schwann, onde se transformam em amastigotas, que sofrem várias replicações se diferenciando em TS, que são assim liberadas na corrente sanguínea, infectando células e disseminando assim a infecção para os diferentes tecidos e órgãos (LEITE *et al.*, 1998; RASSI *et al.*, 2000; TYLER & ENGMAN, 2002; ANDRADE & ANDREWS, 2005). Após a infecção o indivíduo passa pelos períodos de incubação, período entre a penetração do agente etiológico e o aparecimento dos primeiros sintomas clínicos da doença, e pré-patente, entre a penetração do agente etiológico e o aparecimento das primeiras formas detectáveis do agente etiológico. Esses períodos são bastante variáveis dependendo da via de penetração, do inoculo, da cepa do parasito e das condições do paciente.

1.2 - As formas da doença de Chagas

A DC apresenta duas fases distintas. Inicialmente um período de curta duração, denominado de fase aguda, seguido por uma fase de longa duração, a fase crônica, que persiste por toda a vida do hospedeiro.

A fase aguda, com duração aproximada de 6 a 8 semanas, é caracterizada por parasitemia patente, parasitismo tecidual e processo inflamatório intenso, composto de células T e macrófagos o que é essencial para o controle da replicação do parasito (ANDRADE, 1985; GOLGHER & GAZZINELLI, 2004; ANDRADE & ANDREWS, 2005; HARDISON *et al.*, 2006).

Dependendo do ponto de entrada do parasito no corpo, o primeiro sinal da infecção pelo parasito pode ser uma lesão de pele, denominada chagoma de inoculação, ou pode ocorrer edema ocular bipalpebral unilateral com aumento dos gânglios linfáticos locais, o Sinal de Romana, e febre com duração de várias semanas. A maioria dos casos são assintomáticos ou oligossintomáticos, apresentando linfadenopatia, esplenomegalia e/ou edema e quadro febril. (PRATA, 2001; GOLGHER &

GAZZINELLI, 2004). Nessa fase os sintomas são geralmente pouco diferenciados, mas pacientes imunossuprimidos e crianças podem desenvolver uma forma mais grave de infecção, com envolvimento cardíaco e encefalomielite, podendo causar a morte (ZHANG & TARLETON, 1999; ANDRADE & ANDREWS, 2005).

As principais lesões ocorrem no tecido cardíaco e a intensidade dessas lesões está diretamente relacionada aos níveis de parasitemia e a carga parasitária tecidual. Além dos ninhos parasitários e focos inflamatórios constituídos predominantemente por células mononucleadas, com vários graus de alterações degenerativas nas fibras musculares, além do processo de necrose (ANDRADE, 1985; PARADA *et al.*, 1997).

A evolução da fase aguda para a fase crônica é acompanhada pelo gradativo desaparecimento das manifestações clínicas e diminuição da parasitemia, devido ao controle da proliferação do parasito pelo sistema imune (D'AVILA, 2009). Entretanto, as sequelas das lesões desenvolvidas na fase aguda podem ter consequências patofisiológicas na fase crônica da doença (ANDRADE, 1991).

A DC crônica, em humanos, pode-se apresentar clínica ou anátomo-patologicamente, em quatro formas: assintomática, cardíaca (miocardiopatia chagásica), digestiva (megacólon e/ou megaesôfago) ou mista (cardíaca e digestiva).

A ocorrência de manifestações cardíacas e digestivas simultâneas caracteriza a forma mista da doença (TANOWITZ *et al.*, 1992; PRATA, 2001).

A maioria dos indivíduos, aproximadamente 70%, permanece na forma assintomática, também nomeada como forma indeterminada da doença (TANOWITZ *et al.*, 1992; PRATA, 2001). Nesta fase, o indivíduo apresenta ausência de sinais e sintomas, exames eletrocardiográficos e radiológicos do tórax e abdômen normais e parasitemia baixa ou ausente.

Aproximadamente 30% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica sintomática em um período variável de 10 a 30 anos após a infecção (DIAS, 1989; BRENER E GAZZINELLI, 1997; MONCAYO, 1999), podendo evoluir para as formas clínicas cardíaca ou digestiva, consideradas as principais causas de morbidade e mortalidade na DC (PRATA, 2001).

Cerca de 5% a 10% dos pacientes podem evoluir para a forma digestiva da doença (PRATA, 2001), que apresenta diversidade de sintomas clínicos, variando desde uma leve dificuldade durante a deglutição (megaesôfago) a severas dilatações das estruturas intestinais (megacólon). Nessa forma da doença, ocorre redução no número de neurônios, característica da denervação dos plexos mioentérico e/ou submucoso

(ADAD *et al.*, 1991; 2001), sendo o megaesôfago associado a uma perda de cerca de 85% dos neurônios, e o megacólon a um dano neuronal de pelo menos 50% (KÖBERLE, 1968).

PÉREZ-FUENTES *et al.* (2007), observaram, na fase crônica, altos níveis plasmáticos de óxido nítrico (NO) em pacientes com a forma cardíaca descompensada quando comparados com pacientes com cardiopatia mais branda, sugerindo papel do NO sistêmico na cardiopatia dilatada. Além disso, diferentes estudos demonstraram predomínio de linfócitos TCD8⁺ em relação aos linfócitos TCD4⁺ na miocardite chagásica crônica (TOSTES JUNIOR *et al.*, 1994; HIGUCHI *et al.*, 1997; REIS *et al.*, 2000). Portanto, a presença dos linfócitos TCD8⁺ no tecido cardíaco pode estar associada à lesão tecidual, devido à ação imunopatológica destas células contra o hospedeiro, podendo assim causar citólise com destruição da miofibra cardíaca (CUÑA & CUÑA, 1995). Entretanto, os linfócitos TCD8⁺ podem ter papel protetor, principalmente durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, 1991, 1995; DUTRA *et al.*, 1997; BRENER E GAZZINELLI, 1997).

De acordo com DIAS (2000), a intensidade da doença crônica está relacionada com a intensidade da infecção aguda inicial. A presença do parasito, no tecido cardíaco, pode induzir alterações microvasculares que podem evoluir para uma degeneração cardíaca e inflamação crônica (FACTOR & SONNENBLICK, 1985; MORRIS *et al.*, 1990; PETKOVA *et al.*, 2001).

Os espaços deixados pelas fibras cardíacas destruídas são substituídos pelo colágeno. A hipertrofia dos miócitos restantes ocorre em paralelo. A deposição excessiva de colágeno resulta na substituição da arquitetura normal do tecido e comprometimento de sua atividade funcional. Estudos histológicos observaram que a miocardite pode estar associada ao parasitismo de alguns cardiomiócitos, com a infiltração de linfócitos e macrófagos difusos ou locais, agregação plaquetária nos capilares, intensiva deposição de tecido fibroso evidenciando os processos de degeneração, fibrose e necrose. (ANDRADE, 1985; ANDRADE *et al.*, 1994).

Camundongos sobreviventes a um longo período de infecção pelo *T. cruzi* podem desenvolver miocardite intensa e lesões na inervação autônoma do coração (TAFURI, 1970; MACHADO *et al.*, 1975), na microcirculação (FACTOR & SONNENBLICK, 1985;) e mudanças eletrocardiográficas, parecidas com as encontradas na miocardite chagásica humana (LAGUENS *et al.*, 1981a).

As razões pelas quais a DC se manifesta de formas distintas e a gravidade das mesmas permanece desconhecida. A prevalência de diferentes formas clínicas da doença varia de acordo com a região geográfica (COURA *et al.*, 1983; PRATA, 2001), mas as causas destas heterogeneidades clínicas e epidemiológicas não são completamente compreendidas (MACEDO *et al.*, 2004; LAGES-SILVA *et al.*, 2006). Sabe-se, no entanto, que as diferentes manifestações clínicas são dependentes de fatores relacionados tanto ao parasito quanto ao hospedeiro, dentre eles pode-se citar, o tipo de cepa do parasito, o tropismo tecidual, a carga parasitária, o tempo de infecção, a natureza da resposta imune e a genética do hospedeiro (VAGO *et al.*, 2000 ; DUTRA *et al.*, 2005; BRAZÃO *et al.*, 2008).

1.3 - Interação Parasito x Hospedeiro

A interação do *T. cruzi* com a célula hospedeira inicia-se com a adesão do parasito à superfície celular da mesma, entretanto, nem todos os parasitos que estão aderidos a essa superfície permanecem fixos a ela. O grau de adesão varia de acordo com a cepa do parasito, com a forma evolutiva (nem todas as formas evolutivas aderem à célula hospedeira) e com o tipo celular do hospedeiro (De CARVALHO, 2008).

O processo de adesão e invasão da célula hospedeira pelo parasito envolve a participação de diversas moléculas de superfície do parasito ancoradas em moléculas GPI (glicosilfosfatidilinositol) de membrana (PREVIATO *et al.*, 1985; YOSHIDA *et al.*, 1989; SCHENKMAN *et al.*, 1993; ACOSTA SERRANO *et al.*, 2001). As formas tripomastigotas do *T. cruzi*, não sintetizam ácido siálico, (SCHAUER *et al.*, 1983), mas possuem glicoproteínas de ação enzimática localizadas na superfície da membrana denominadas transialidases responsáveis pela captação deste ácido siálico na célula hospedeira através de moléculas do tipo mucinas ligadas por âncora de GPI na superfície do parasito (PREVIATO *et al.*, 1985; YOSHIDA *et al.*, 1989; SCHENKMAN *et al.*, 1993; ACOSTA SERRANO *et al.*, 2001). Este fenômeno é importante para o processo de interação com a célula hospedeira e interiorização do parasito (RODRIGUEZ *et al.*, 1999).

Embora tenha sido demonstrado que as formas TS e TM sejam funcionais em relação à interação parasito-hospedeiro e/ou invasão da célula-alvo (RAMIREZ *et al.*, 1993) elas diferem quanto as moléculas presentes na sua superfície.

As formas TS possuem em sua membrana GPI mucinas purificadas, ancoradas em glicosilfosfatidilinositol, que iniciam potencialmente a resposta pró-inflamatória, podendo ser 100 a 1000 vezes mais reativas na indução de citocinas pró-inflamatórias Interleucina - 12 (IL-12), Fator de Necrose Tumoral-alfa (TNF- α) e NO por macrófagos (CAMARGO *et al.*, 1997a; CAMARGO *et al.*, 1997b; ALMEIDA *et al.*, 2000). Por outro lado, glico-inositol-fosfolipídios (GIPLs), extraídos da membrana celular de formas epimastigotas e TM do *T. cruzi*, exercem função supressiva na ativação de macrófagos e células dendríticas, inibindo assim a secreção de TNF- α e IL-12 (ZAMBRANO-VILLA *et al.*, 2002).

Estudos referentes ao processo de interação das formas TS do *T. cruzi* com as células hospedeiras indicam que essas utilizam uma glicoproteína (70-200kDA), membro da família das transialidases, que leva à mobilização de Ca^{2+} intracitoplasmático participando assim do processo de internalização do parasito. A glicoproteína 85 (gp85), uma molécula também pertencente à família das transialidases, possui ligantes para laminina e fibronectina e apresenta uma íntima relação com a fosfoinositol-3-quinase (PI-3K), sendo que tratamentos que visam bloquear esta interação diminuem drasticamente o processo de penetração do *T. cruzi* na célula hospedeira (TODOROV *et al.*, 2000; YOSHIDA, 2006).

As formas TM do *T. cruzi*, que apresentam elevada capacidade infectiva, ligam-se à superfície da célula hospedeira por meio de moléculas, como as gp82; oligopeptidase B, trans-sialidases e cruzipaína. Essas moléculas de superfície induzem a ativação de proteínas tirosina kinases (PTK), acionando mecanismos de sinalização celular envolvendo a ativação da fosfolipase C (PLC) e, conseqüentemente, a geração de fosfatidilinositol 1,4,5-Fosfato (PIP3). Estes eventos culminam na mobilização de Ca^{2+} dos seus estoques intracelulares, provavelmente do retículo endoplasmático, com um papel chave no processo de recrutamento de lisossomo e sua fusão na membrana celular. Além disso, gp82 induz o desagrupamento da actina auxiliando no processo de internalização, muito importante para algumas células não fagocíticas (BURLEIGH & ANDREWS, 1995; BURLEIGH *et al.*, 1997; YOSHIDA *et al.*, 2000; YOSHIDA, 2006; FERREIRA, 2006).

Aspectos relacionados à variabilidade com que as formas do *T. cruzi* interagem com as células hospedeiras podem ocasionar implicações fundamentais na resposta imune contra este parasito e, conseqüentemente, na evolução clínica da DC.

As formas sanguíneas diferem das metacíclicas, uma vez que as últimas, aparentemente, não estão envolvidas no início do processo inflamatório, provavelmente devido à diferenciação na composição gênica. CARNEIRO *et al.* (2007) demonstraram que durante a fase aguda da infecção, de cães, pelas formas TM ou TS da cepa Berenice-78 (Be-78) do *T. cruzi*, ocorre um predomínio dos linfócitos TCD8⁺ no sangue periférico no grupo TM em relação ao grupo TS e grupo controle. Análises das diferentes regiões cardíacas verificaram maior expressão da enzima iNOS e maior produção de óxido nítrico (NO) sérico no grupo TM, quando comparado aos animais não infectados e infectados por formas TS. O aumento dos níveis de NO no grupo TM pode ser um dos fatores determinantes da menor parasitemia observada neste grupo. Por outro lado, no grupo TS houve um maior processo inflamatório cardíaco em relação ao TM no final da fase aguda (VIEIRA *et al.*, 2009).

VIEIRA *et al.* (2012) demonstraram, em modelo murino, que a interação inicial entre formas TM e o hospedeiro vertebrado na fase aguda induz um perfil de resposta imunológica diferente daquela observada na infecção com formas TS. Dessa maneira, observou-se que a infecção por formas TM ocorre de forma mais silenciosa, promovendo uma resposta imune capaz não só de controlar o número de parasitos durante a fase aguda da infecção como também de estabelecer uma resposta imunoreguladora ao final da fase aguda, limitando assim o desenvolvimento das lesões associadas à DC. Entretanto, a infecção por formas TS ocorre de uma maneira mais alarmante e apesar de haver o controle da parasitemia, não há o estabelecimento de uma resposta imunoreguladora eficaz, levando a uma inflamação persistente.

1.3 - Resposta Imune

A resposta imune do hospedeiro apresenta importante papel no controle da infecção causada pelo *T. cruzi*. Ao entrar em contato com as células do hospedeiro, os antígenos do parasito desencadeiam uma série de eventos, para que haja a eliminação do patógeno. Tanto o parasito quanto a resposta imune podem persistir por um longo período no organismo hospedeiro, resultando em lesões teciduais características da doença (TARLETON, 2001). Em cada fase da DC, existe uma resposta imune específica com repertório de células, citocinas e outras substâncias que reduzem a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo que podem estar envolvidos no desenvolvimento da doença (JANEWAY, 2001).

A resposta imune durante a infecção inicial pelo *T. cruzi* é crucial na distinção das formas clínicas da doença crônica. Fatores celulares e moleculares inerentes ao hospedeiro estão envolvidos na resistência à infecção pelo parasito seja *in vivo* ou *in vitro*, destacando-se a produção de quimiocinas, citocinas e NO (VESPA *et al.*, 1994; VILLALTA *et al.*, 1998). A resistência do hospedeiro durante a DC experimental depende tanto da imunidade inata quanto da adquirida e requer atuação de diversas células incluindo as células NK, células B, células TCD4⁺ e TCD8⁺ (ROTTENBERG *et al.*, 1988; RUSSO *et al.*, 1988; ALIBERTI *et al.*, 1996;).

A ativação precoce do sistema imune inato está envolvida, aparentemente, na resistência do hospedeiro ao *T. cruzi*. A estimulação da síntese de IL-12 e TNF- α pelos macrófagos ativam as células NK que passam a produzir IFN- γ , favorecendo a diferenciação dos linfócitos T no fenótipo Th1, que consiste na principal população celular produtora de IFN- γ . Os macrófagos ativados pelo IFN- γ e TNF- α irão produzir NO, um dos principais responsáveis pelo controle da replicação do parasito na fase aguda da doença (HOLSCHER *et al.*, 1998; KUMAR & TARLETON, 2001; MICHAILOWSKY *et al.*, 2001).

Durante a fase aguda da infecção, a produção de citocinas de perfil Th1 (inflamatórias) responsáveis pela ativação de macrófagos e diferenciação e proliferação de linfócitos TCD8⁺ é necessária para limitar a multiplicação do parasito em pacientes chagásicos. Além disso, linfócitos TCD4⁺ mostram-se necessários, mas não suficientes para controlar a infecção pelo *T. cruzi* em modelo murino (HOFT *et al.*, 2000). Entretanto, um aumento na produção de IL-10 durante a fase crônica auxilia o hospedeiro a evitar um processo patológico induzido por citocinas do perfil Th1 (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000)

Por muito tempo acreditou-se que a resposta imunológica tipo Th1, desencadeada frente à infecção pelo *T. cruzi*, levava ao controle da infecção e consequente eliminação do parasito (HOFT *et al.*, 2000; FERRAZ *et al.*, 2009). Entretanto, tem sido mostrado que alguns componentes da resposta imune, como a IL-10 na fase aguda e a IL-4 na fase crônica, atuam de maneira sinérgica e benéfica no controle do processo inflamatório podendo reduzir o dano tecidual (O’GARRA, 1998; SALES-JUNIOR *et al.*, 2008; GUEDES *et al.*, 2009). Citocinas como IL-4 (padrão Th2), TGF- β e IL-10 possuem ação anti-inflamatória e são capazes de inibir a ativação dos macrófagos induzidos por IFN- γ , inibindo tanto a liberação dos metabólicos tóxicos

quanto a diferenciação de células Th1 (REED *et al.*, 1994; ABRAHAMSOHN, 1998; BRODSKYN & BARRAL-NETO, 2000).

Diferentes mecanismos relacionados à resposta imune têm sido propostos e apresentados como elos no estabelecimento e manutenção das diferentes formas clínicas na fase crônica da DC.

O estudo do sangue periférico de pacientes na fase crônica da DC demonstra grande número de linfócitos T e B circulantes (DUTRA *et al.*, 1994). No contexto da imunomodulação, diferentes citocinas são importantes para determinar a morbidade da DC. Trabalhos sugerem uma correlação entre a produção de IFN- γ e o desenvolvimento da forma cardíaca grave e o papel da IL-10 no controle da imunopatologia (BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000; GOMES *et al.*, 2003).

A imunidade mediada por células T durante a forma clínica indeterminada recente da DC pode representar um fenômeno restrito aos focos inflamatórios, considerando relatos prévios da presença de células T, principalmente linfócitos TCD8⁺, no infiltrado inflamatório do tecido cardíaco de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Estudo realizado em modelo experimental murino demonstrou que o aparecimento no coração de células T produtoras de citocinas está correlacionado com o aumento local da expressão de moléculas de adesão celular, o que seria consistente com a migração de linfócitos T para o foco inflamatório (FUENMAYOUR *et al.*, 2005).

É bem aceito que a ausência da doença em indivíduos infectados pelo *T. cruzi* está associada à capacidade de regulação da resposta anti-*T. cruzi*, responsável pelo controle da parasitemia e do dano inflamatório tecidual, característicos da DC (BRENER *et al.*, 1997). Certamente, o dano tecidual frente à inflamação deve ser mais grave na ausência de mecanismos reguladores que envolvem tanto a resposta imune inata eficaz quanto a adaptativa. (BLUESTONE & ABBAS, 2003; PICCIRILLO & SHEVACH, 2004; BELKAID & ROUSE, 2005).

Vários mecanismos pelos quais as células T reguladoras realizam suas atividades moduladoras têm sido propostos, incluindo a inibição da atividade citotóxica pela regulação negativa de IL-12 e em linfócitos TCD8⁺ ou através de contato direto com essas células efectoras (PICCIRILLO & SHEVACH, 2001; GROSSMAN *et al.*, 2004; O'GARRA & VIEIRA, 2004; TRZONKOWSKI *et al.*, 2004; CASSIS *et al.*, 2005.).

A mobilização do sistema imune é essencial na redução da carga parasitária, mas por outro lado, eventualmente contribui para o aparecimento das manifestações clínicas crônicas devido às respostas autoimunes (ENGMAN & LEON, 2002). Apesar de todas

as tentativas do sistema imune, o parasito pode persistir indefinidamente no hospedeiro, assim como a atividade imunológica com conseqüente lesão tecidual e alterações histológicas e funcionais, características da doença.

A escassez de parasitos contraposta à intensidade e extensão das lesões, assim como o prolongado período de latência que precede essas lesões, tem levado diversos autores a avaliarem o envolvimento de fatores autoimunes na patogênese da lesão chagásica. Alguns autores apontam para a existência de reação cruzada entre os componentes autólogos e antígenos do *T. cruzi* (WOOD *et al.*, 1982; ACOSTA & SANTOS-BUCH, 1985; KIERSZENBAUM, 1986; VAN VOORHIS & EISEN, 1989; LEVITUS *et al.*, 1991; CUNHA-NETO *et al.*, 1995, CUNHA-NETO *et al.*, 1996; AL-SABBAGH *et al.*, 1998; BAHIA-OLIVEIRA *et al.*, 2000, MONTRAN *et al.*, 2000).

A persistência do parasito e/ou a autoimunidade no indivíduo infectado contribuem para o desenvolvimento da doença e patogenicidade (SOARES, *et al.*, 2001). Antígenos persistentes do *T. cruzi* podem se tornar focos para as células T específicas mediando o processo de hipersensibilidade tardia (DTH), que conduz a lesões nos tecidos dos hospedeiros (BEN YOUNES-CHENNOUFI *et al.*, 1998; ZHANG & TARLETON, 1999; TARLETON, 2001).

A presença do *T. cruzi* faz com que o sistema imunológico, respostas imunes celular e humoral, do hospedeiro vertebrado sejam estimuladas. Além disso, a presença de linfócitos e macrófagos nos infiltrados inflamatórios pode estar diretamente relacionada à produção de citocinas que induziriam a destruição tecidual com a posterior indução de fatores de crescimento que ativam a formação de tecido fibroso cicatricial (REIS *et al.*, 1997; WAGHABI *et al.*, 2002; GUEDES *et al.*, 2007; 2009) O balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é um fator relevante na patogênese da DC podendo ser a principal forma de se controlar a morbidade durante a fase crônica da doença (DUTRA *et al.*, 1997; GOMES *et al.*, 2003).

O sistema imune do hospedeiro não é capaz de eliminar totalmente a infecção. Assim, a permanência do *T. cruzi* no organismo mantém a produção de compostos citotóxicos. A resposta inflamatória desencadeada pela presença do parasito no tecido possui importante papel na proteção contra a infecção, no entanto, essa mesma resposta pode contribuir para patologia da doença. Desta forma se torna importante a regulação desta, para que não ocorra exacerbação das lesões inflamatórias (RODRIGUES *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores do nosso grupo de pesquisa demonstraram que na fase aguda da DC experimental a interação inicial entre TS e o hospedeiro vertebrado induz um perfil de resposta imunológica diferente daquele observado na infecção por TM. A infecção por TS é mais exuberante e, mesmo com o controle da parasitemia, não há o estabelecimento de uma resposta imunoreguladora eficaz, levando assim a uma inflamação persistente. Por outro lado, a infecção por TM é mais silenciosa, promovendo uma resposta imune capaz não só de controlar o número de parasitos durante a fase inicial da infecção como também de estabelecer uma resposta imunoreguladora ao final da fase aguda, limitando assim o desenvolvimento das lesões associadas à DC.

Desse modo, a análise da infecção de camundongos por diferentes formas infectantes, TS e TM, da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* no decorrer da fase crônica da infecção possibilitará uma melhor compreensão de como a fonte do inóculo pode interferir na interação *T. cruzi*/hospedeiro, além de contribuir para o entendimento da história natural da doença e de seus mecanismos imunológicos, fenômenos de resistência e patogênese. Além disso, devido ao fato de que as infecções transfusional e congênita em países não endêmicos são reconhecidas como um sério problema seria importante saber qual o impacto da infecção por TS no curso da doença.

3.1 - Objetivo geral

Avaliar as alterações imunopatológicas durante a fase crônica da infecção experimental de camundongos por formas TS ou TM da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.

3.2 - Objetivos específicos

3.2.1 - Investigar o perfil hematológico;

3.2.2 - Identificar o fenótipo das células mononucleares (TCD4⁺, TCD8⁺, CD19⁺ e NK) do sangue periférico;

3.2.3 - Analisar o fenótipo dos esplenócitos e das citocinas (TNF- α , IFN- γ , IL-10) presentes no citoplasma dessas células.

3.2.4 - Avaliar os níveis teciduais das citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β no coração;

3.2.5 - Quantificar o infiltrado inflamatório e a fibrose cardíaca.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animais e Infecção pelo *T. cruzi*

Foram utilizados 60 camundongos *Swiss*, machos, provenientes do setor de Criação do Centro de Ciência Animal da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram distribuídos em três grupos experimentais: Não infectados (NI), infectados com formas tripomastigotas sanguíneas (TS) e infectados com formas tripomastigotas metacíclicas (TM), como demonstrado no delineamento experimental (Figura 1).

Os camundongos, dos grupos TS e TM, com 30 dias de idade, foram inoculados com 5×10^3 formas TS ou TM pela via intraperitoneal. As formas TS foram obtidas de camundongos infectados pela cepa Be-78 (*T. cruzi* II). Esta cepa é mantida por nosso laboratório através de passagens quinzenais em camundongos *Swiss*. As formas metacíclicas desta mesma cepa foram obtidas de ninfas de *Triatoma infestans* provenientes da colônia de triatomíneos do Laboratório de DC (UFOP), alimentadas em camundongos infectados pela mesma cepa.

Os animais foram acompanhados ao longo da fase aguda, na qual foi realizada a parasitemia e avaliação da taxa de mortalidade dos mesmos (VIEIRA *et al.*, 2012). O acompanhamento foi realizado até aos 180 dias após a infecção, considerada fase crônica em camundongos.

4.2 - Necropsia

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados 180 dias após a infecção (DAI). No momento da eutanásia, 300µl de sangue, de cada animal, foram coletados com o objetivo de realizar o leucograma (100µl) e a imunofenotipagem (200µl).

Durante a necropsia foram coletados fragmentos do coração, para a quantificação de citocinas, do infiltrado inflamatório e da fibrose cardíaca. O baço foi coletado para a realização da cultura dos esplenócitos. Todas as etapas, demonstradas no delineamento experimental foram realizadas em duplicata (Figura 1).

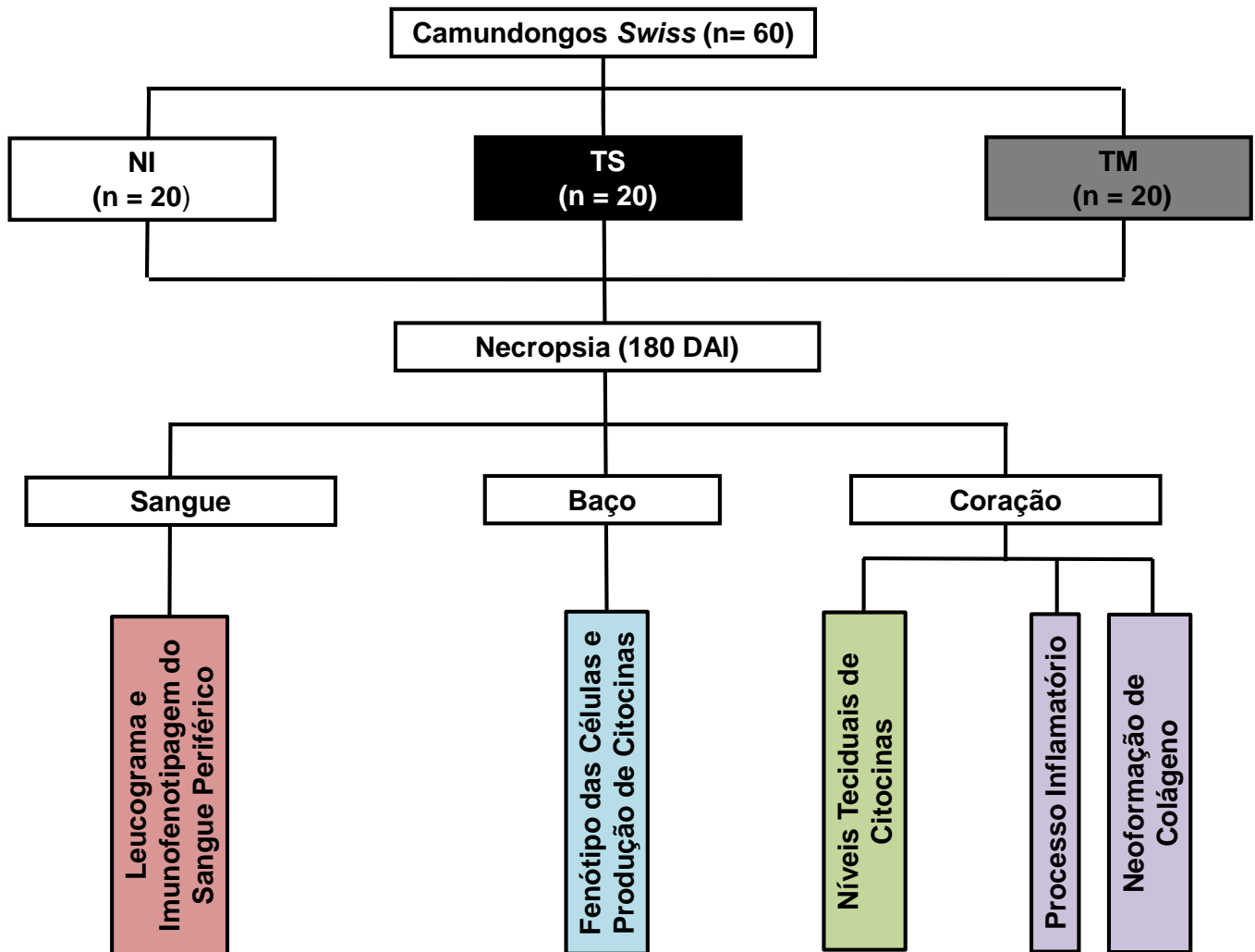


Figura 1: Camundongos *Swiss*, machos, divididos em três grupos experimentais: NI (não infectados), TS (infectados com formas tripomastigotas sanguíneas) e TM (infectados com formas tripomastigotas metacíclicas). A necropsia foi realizada aos 180 DAI. O sangue periférico, de todos os animais, foi coletado para realização do leucograma e imunofenotipagem do sangue periférico. O coração, de cinco animais, foi coletado para a quantificação do processo inflamatório e fibrose cardíacos. O coração e baço, dos cinco animais restantes, foram coletados para a avaliação dos níveis teciduais de citocinas através da técnica de Real Time - PCR. O baço foi utilizado para a realização da cultura de esplenócitos. Os protocolos foram realizados em duplicata.

4.3 - Leucograma

Foram coletados, de cada animal, 100µL do sangue periférico em EDTA. O perfil hematológico do sangue dos camundongos foi determinado utilizando-se o contador hematológico veterinário automático (BC-2800VET, Mindray) pelo qual avaliou-se a série branca (linfócitos, monócitos e granulócitos).

Para contagem diferencial de células foram confeccionados esfregaços sanguíneos, corados pelo método do Panótico Rápido InstantProv (Newprov®) e avaliados por microscopia óptica em objetiva de imersão para análise do leucograma.

4.4 - Imunofenotipagem do sangue periférico

Dentre os parâmetros imunológicos foi realizada a caracterização das células mononucleares (TCD4⁺, TCD8⁺, CD19⁺ e NK). Para isso, foram coletados 200µL do sangue periférico de cada animal.

Em tubos de poliestireno 12x75mm, adicionou-se 2µL do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse conjugado com fluorocromo (Tabela 1). Para cada tubo com anticorpo monoclonal, foram adicionadas alíquotas de 25µL de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização, em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise diluída 10 vezes em água destilada. Posteriormente a nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos a temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (340g, 7 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 3mL de PBS (pH7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Numa etapa final, os leucócitos foram fixados com 200µL de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1 % de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de pelo menos 15 minutos a 4°C, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® - Becton Dickinson). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e o programa o FlowJo® para a análise dos resultados empregando diferentes estratégias.

Tabela 1: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações e subpopulações celulares.

Anticorpos	Fluorocromo	Fabricante	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4	FITC	Caltag	RM4-5	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Caltag	5H10	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD19	FITC	Caltag	6D5	Linfócitos B
Anti-CD49b	FITC	Pharmingen	DX5	Células NK
Anti-IgG2a	FITC	Caltag	-	Controle de isotipo

4.5 - Avaliação fenotípica de esplenócitos

Cinco animais de cada grupo foram eutanasiados no 180° DAI para a coleta do baço para a realização da cultura dos esplenócitos.

4.5.1 - Cultura de células esplênicas

As suspensões de células do baço foram preparadas de acordo com o método descrito por TAYLOR *et al.* (1987). O órgão foi retirado e colocado em um macerador de tecido de vidro com 10 mL de RPMI. Posteriormente, após a retirada dos debris, a suspensão celular foi transferida para um tubo cônico de 15 mL e centrifugada a 290g por 7 minutos. Alíquotas de 1000 μ L de células esplênicas (1×10^7 /mL) foram incubadas na presença apenas de meio de cultura RPMI, por 12 horas em estufa de CO₂ com 5% de umidade a 37°C. Os tubos foram retirados da estufa e acrescidos com Brefeldina A - BFA (10 μ g/ml, Sigma) permanecendo incubados por mais 4 horas. A BFA é utilizada para inibir a secreção da citocina, mantendo-a no interior do complexo de Golgi. Ao término da incubação, as culturas foram tratadas com 200 μ L EDTA (Sigma), numa concentração final de 20 mM, e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente. Este procedimento bloqueia o processo de ativação posterior das células e garante a obtenção de resultados padronizados. Posteriormente ao tratamento com EDTA, as células foram lavadas com 3mL de tampão de lavagem - PBS-W (0,015M de PBS 1X, 0,5% albumina sérica bovina - BSA e 0,1% de azida sódica), por centrifugação a 290g durante 7 minutos a 18°C.

Após a última lavagem, as células foram ressuspensas em 2 mL de PBS-W. Em seguida, as amostras foram incubadas com anticorpos anti-moléculas de superfície conjugadas com fluorocromos FITC (CD4⁺, CD8⁺, CD19⁺ e CD49b⁺) por 30 minutos ao abrigo da luz. Após a etapa da identificação das populações celulares, procedeu-se à lise dos eritrócitos e à fixação dos leucócitos pelo tratamento com 2mL de solução de lise por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a fixação, a suspensão de leucócitos foi centrifugada a 290g durante 7 minutos a 18°C, o sobrenadante descartado e as células permeabilizadas com 2mL de solução permeabilizante - PBS-P (PBS-W e 0,5% de saponina - Sigma), por 10 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a permeabilização, as suspensões de leucócitos foram centrifugadas a 290g durante 7 minutos, o sobrenadante descartado e as células lavadas com 3mL de PBS-W. Em seguida, as células foram ressuspensas em PBS- W. Após a suspensão das células, procedeu-se à marcação das citocinas intracitoplasmáticas em placas de 96 poços e fundo em “U”. Para isso, alíquotas de 30µL das suspensões celulares foram incubadas por 30 minutos à temperatura ambiente, ao abrigo da luz na presença de 20µL da suspensão de anticorpos anti-citocinas conjugados com o fluorocromo PE (anti-IL-10, anti-TNF- α e anti-IFN- γ - Tabela 3), e previamente diluídos a 1:50 em PBS-P estéril com 10% de soro normal de Rato. Após a incubação, as células foram lavadas com 100µL de PBS-P e, em seguida, com 200µL de PBS-W. As preparações celulares foram então fixadas em 200µL de solução fixadora e estocadas a 4°C ao abrigo da luz até a sua leitura no citômetro de fluxo dentro de 24 horas.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais utilizados para identificação de citocinas intracelulares em subpopulações leucocitárias

Anticorpos	Fabricante	Clone	Concentração
Anti TNF- α PE	Caltag	MP6-XT22	50µg/0,5mL
Anti IL-10 PE	Caltag	JES5-2A5	50µg/0,5mL
Anti IFN- γ PE	Serotec	XMG1.2	0,1mg/mL

4.5.2 - Análise da produção de citocinas por linfócitos

A produção de citocinas por células NK, linfócitos B e T foi realizada através de análise convencional. A população celular de interesse (R1) (Figura 2A) foi estabelecida para linfócitos em gráficos de distribuição pontual de tamanho (FSC) versus granulidade (SSC). Após a seleção da região de interesse, a frequência de populações celulares produtoras de citocinas, dentro de R1, foi obtida em gráficos bidimensionais de distribuição pontual de fluorescência FL2 versus FL1 (Figura 2B).

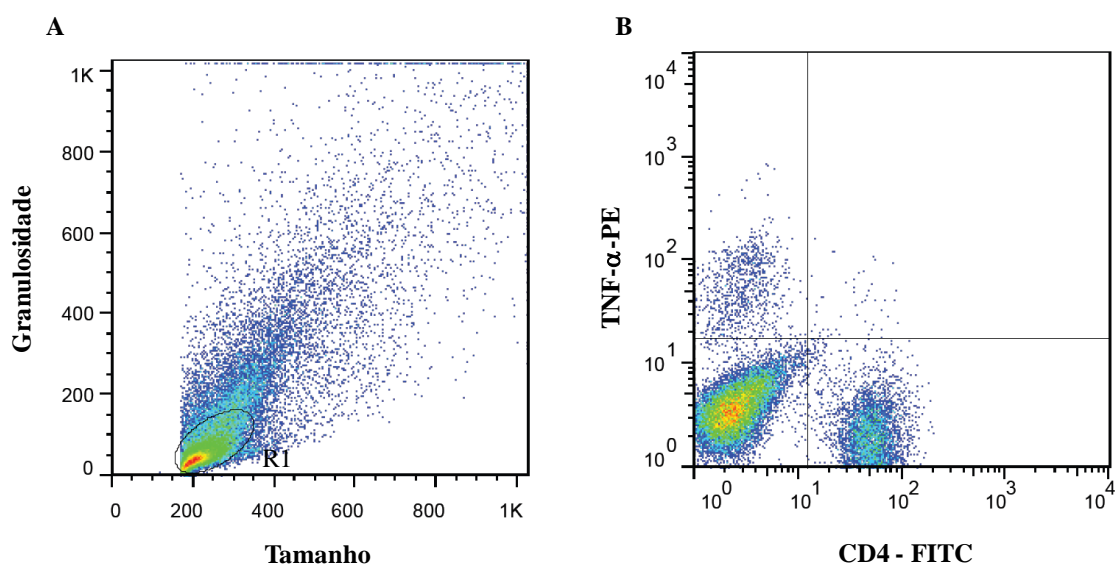


Figura 2: Análise da produção de citocinas citoplasmáticas por células NK, B, TCD4⁺, e TCD8⁺. (A) Gráfico de distribuição pontual FSC versus SSC utilizado para a seleção da população de linfócitos - R1. (B) Gráfico de distribuição pontual FL1 versus FL2 utilizado para quantificar o percentual de células produtoras de citocinas em R1.

4.6 - Avaliação dos níveis teciduais das citocinas IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-10 e TGF- β no coração

4.6.1 - Sequência dos primers

Os primers utilizados nas reações de PCR quantitativo em tempo real (q-PCR) foram desenhados, sintetizados, e padronizados quanto a sua concentração de uso e verificados quanto a sua especificidade e eficiência, como mostrado no esquema abaixo:

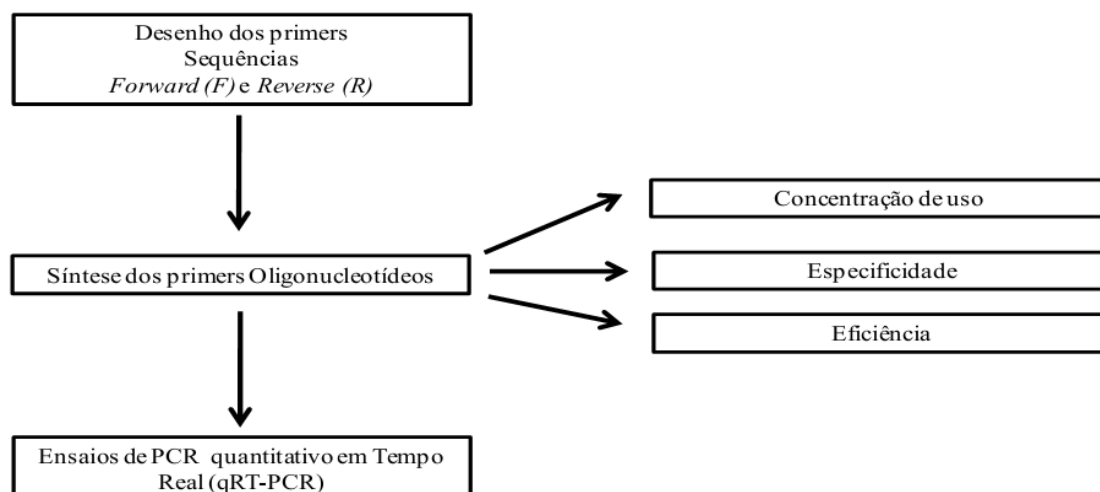


Figura 3: Desenho, síntese e padronização dos iniciadores utilizados.

Todas as etapas citadas acima, que antecedem os ensaios de q-PCR, são necessárias e foram cuidadosamente seguidas, garantindo a qualidade dos resultados.

Segue abaixo a tabela 3 com a sequência dos iniciadores utilizados.

Tabela 3: Sequências dos iniciadores.

Gene	Sequência de nucleotídeos (5' - 3')	Função
GAPDH	F: 5' - GTG AAG GTC GGT GTG AAC - 3'	Constitutivo
	R: 5' - CAA CAA TCT CCA CTT TGC - 3'	
IL-12p40	F: 5' - GCA AGA TGT GTC CTC AGA AG - 3'	Citocina
	R: 5' - TCC AGT CCA CCT CTA CAA C - 3'	
TNF- α	F: 5' - ACC ACG CTC TTC TGT CTA CTG - 3'	Citocina
	R: 5 - GGG CTA CAG GCT TGT CAC TC - 3'	
IFN- γ	F: 5' - ATG AAC GCT ACA CAC TGC - 3'	Citocina
	R: 5' - CAC ATC TAT GCC ACT TGA G - 3'	
IL-10	F: 5' - GCT AAC CGA CTC CTT AAT G - 3'	Citocina
	R: 5' - GGG CAT CAC TTC TAC CAG - 3'	
TGF- β	F: 5' - ACA ATT CCT GGC GTT ACC - 3'	Citocina
	R: 5' - TTC CGT CTC CTT GGT TCA G - 3'	

4.6.2 - Extração e purificação do RNA total das amostras de tecido

Na etapa de extração do RNA total, foram utilizados tecidos cardíacos com o peso estimado entre 20-40 mg. As amostras, após retiradas do freezer -80°C, foram imediatamente imersas em 1 mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen São Paulo, SP, Brasil) e maceradas utilizando o aparelho Polítron (Modelo OV5, VELP) até total

dissolução do tecido. Todos os instrumentos utilizados no processo de maceração foram lavados com água tratada com Dietil-Pirocarbonato (DEPC) e posteriormente limpos com gaze embebida em um removedor de nucleases (RNAses) RNaseAway® (Invitrogen, São Paulo).

Posteriormente, o homogeneizado foi transferido para microtubos de 1,5 mL e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA) para cada 1,0 mL de TRIzol® Reagent nos tubos contendo o homogeneizado, que em seguida foram fechados e agitados vigorosamente por 15 segundos e incubado por 5 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 g em microcentrífuga (Centrífuga 5418, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) a temperatura ambiente. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL, seguido da adição de volume equivalente de etanol 95% v/v (preparado com água tratada com DEPC) e homogeneizado suavemente invertendo o tubo por três vezes para precipitação do RNA total.

Para purificação do RNA total contido na amostra, utilizou-se o kit de extração de RNA total (SV total RNA Isolation System - Promega, Madison, WI, USA) com algumas adaptações do protocolo do fabricante, descritas a seguir.

O RNA obtido, como descrito acima, foi transferido para um *spin basket* acoplado a um tubo coletor de 2 mL e centrifugado a 12.000g por 2 minutos em microcentrífuga. Foram adicionados 600 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) e em seguida centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos. Após esta etapa, as amostras de RNA foram tratadas com DNase para assegurar a ausência de contaminação por DNAg. Posteriormente, foi adicionado 200 µL de SV DNase Stop Solution para inibição da atividade enzimática da DNase. O tubo foi então centrifugado a 12.000g por 2 minutos e o líquido contido no tubo coletor descartado. Foi adicionado então 600 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) e realizada a centrifugação por 12.000g por 2 minutos. Foi adicionado então, 250 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) seguido de centrifugação a 14.000g por 3 minutos. Posteriormente, o *spin* foi transferido para um tubo de eluição e adicionou-se 100 µL de água livre de nuclease seguido centrifugação a 12.000g por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas imediatamente a -80°C até o momento do uso.

4.6.3- Síntese da 1ª fita de DNA complementar - cDNA

A primeira fita de cDNA foi sintetizada utilizando o kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription kit” (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) de acordo com as recomendações do fabricante. Para isso, foi adicionado em um tubo, 1 µg de RNA total presente em um volume final máximo de 10 µL. Posteriormente, foi adicionado 10 µL do mix de transcrição reversa em cada tubo contendo RNA, e posteriormente, os tubos foram colocados no termociclador Veriti™ Thermal Cycler (Applied Biosystems) nas seguintes condições: 1 ciclo de 10 minutos a 25°C, 1 ciclo de 120 minutos a 37°C, 1 ciclo de 15 segundos a 85°C e 1 ciclo de 5 minutos a 10°C, consecutivamente. Após o término, os tubos foram retirados do termociclador e armazenados a temperatura de -20°C até o momento da amplificação da etapa de PCR em tempo real.

4.6.4- Detecção dos níveis de citocinas e receptores por q-PCR

O ensaio para avaliar a expressão gênica de citocinas e receptores nas amostras do coração, foi realizado utilizando-se 3 µL dos iniciadores (primers) na concentração de 100 nM, 5 µL de SYBR™ Green, 2 µL de cDNA diluído 5x com água livre de DNase, perfazendo um volume final de 10 µL de reação. O ensaio foi realizado em duplicata para todos os genes, com o constitutivo GAPDH (Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase) presente na mesma placa que os genes avaliados. Os resultados foram expressos pelo método $2^{-\Delta\Delta C_t}$ e multiplicados por 10.

4.7 - Processamento do material para microscopia óptica

Foram coletados fragmentos do coração fixados em formol a 10% tamponado (pH 7.2), processados rotineiramente e incluídos em parafina

4.7.1 - Colorações empregadas

Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com espessura de quatro micrômetros. Foram confeccionadas duas lâminas dos blocos parafinizados do coração, sendo o primeiro submetido à coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (H&E) e o segundo submetido a coloração pelo Tricrômico de

Masson para a quantificação da fibrose, ambos realizados para análise rotineira das alterações histopatológicas

4.7.1.1 - Hematoxilina-Eosina (H&E)

Os cortes foram desparafinados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e então lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina de Harris, por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (100mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e novamente lavados em água corrente para evitar acidificação excessiva.

Posteriormente, foram corados pela Eosina, por 30 segundos. Após a última lavagem em água corrente, foram desidratados, em dois banhos consecutivos de álcool absoluto e levados à estufa a 56 °C para secagem e montados com lamínula e Entellan.

4.7.1.2 - Tricrômico de Masson

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

4.7.2 - Avaliações histopatológicas

4.7.2.1 - Análises morfológicas

As imagens visualizadas pela objetiva 40x foram digitalizadas através do microscópio Leica DM5000B com uma microcâmara acoplada e do programa Leica Application Suite (Versão 2.4.0 R1) ambos pertencentes ao Laboratório Multiusuário do NUPEB. Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa Leica QWin V3.

Para quantificação das células inflamatórias nos cortes histológicos do coração, todos os núcleos celulares presentes nos fragmentos do tecido foram quantificados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). O número de núcleos observado em cortes histológicos cardíacos normais foi determinado pela média do número de núcleos das células presentes nos animais não infectados \pm desvio padrão. Com este valor estabeleceu-se um valor tido como *cut off* sendo o processo inflamatório considerado como presente quando acima deste valor.

Para quantificação da fibrose, foram fotografados 30 campos aleatórios dos cortes corados por Tricrômico de Masson de cada animal do estudo. Os pixels com tons de azul foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total ocupada por fibrose.

Cálculo da área total ocupada por fibrose:

$$\text{Percentual de colágeno} = \frac{\text{Área do colágeno}}{(\text{Área do colágeno} + \text{Fibras cardíacas})} \times 100$$

$$\text{Colágeno corrigido} = (\text{Percentual de colágeno} \times \text{Área do frame}) \times 100$$

4.8 - Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para confirmar os padrões de normalidade. Para comparação entre os grupos foram realizadas análises de variância (ANOVA one-way). Quando as alterações foram significativas, o teste de Tukey foi

realizado para determinar as diferenças específicas entre as médias. Foram consideradas significativas as diferenças entre médias com valores de $p < 0,05$.

5.1 – Leucograma

A infecção por ambas as formas, TS e TM, promoveram a redução dos leucócitos totais no 180° DAI, em relação ao grupo NI (Figura 4A). Verificou-se redução do número de monócitos (Figura 4B) no grupo TS e redução de linfócitos (Figura 4C) nos grupos TS e TM quando comparados ao grupo NI.

Não foram encontradas diferenças estatísticas na análise de neutrófilos e eosinófilos (dados não mostrados).

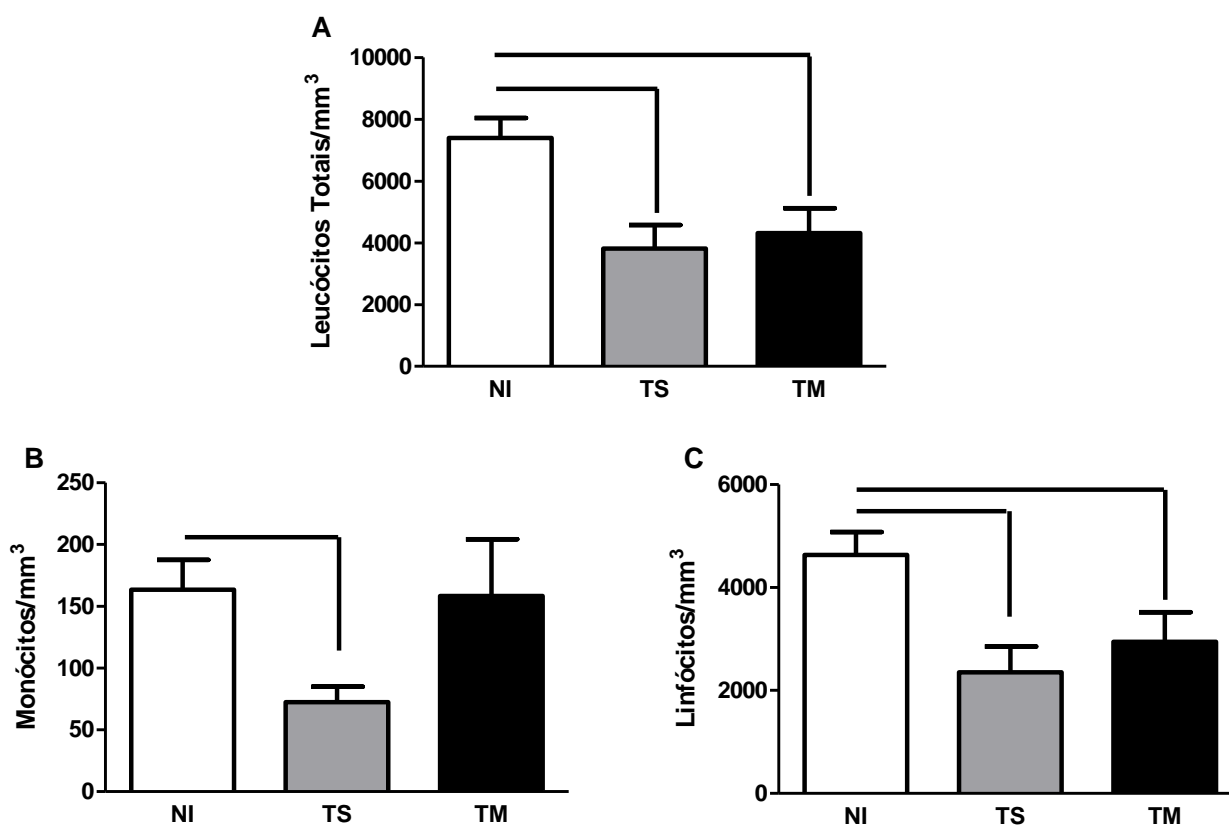


Figura 4: Valores absolutos do leucograma de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

5.2 - Imunofenotipagem das Células do Sangue Periférico

O efeito da infecção por formas TS e TM sobre a resposta imune inata (células NK - CD49⁺) e adquirida (linfócitos B - CD19⁺ e linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺) no sangue periférico foi avaliado durante a fase crônica da doença e os resultados estão demonstrados na Figura 5.

Os animais do grupo TM apresentaram aumento no número absoluto de células NK no sangue periférico, quando comparados aos demais grupos experimentais (Figura 5A). Os animais do grupo TM apresentaram maior número absoluto de células TCD4⁺ circulantes em relação aos animais do grupo NI (Figura 5C). Por outro lado, não foram observadas diferenças significativas entre os grupos em relação número de células B e TCD8⁺ no sangue periférico (Figuras 5B e 5D, respectivamente).

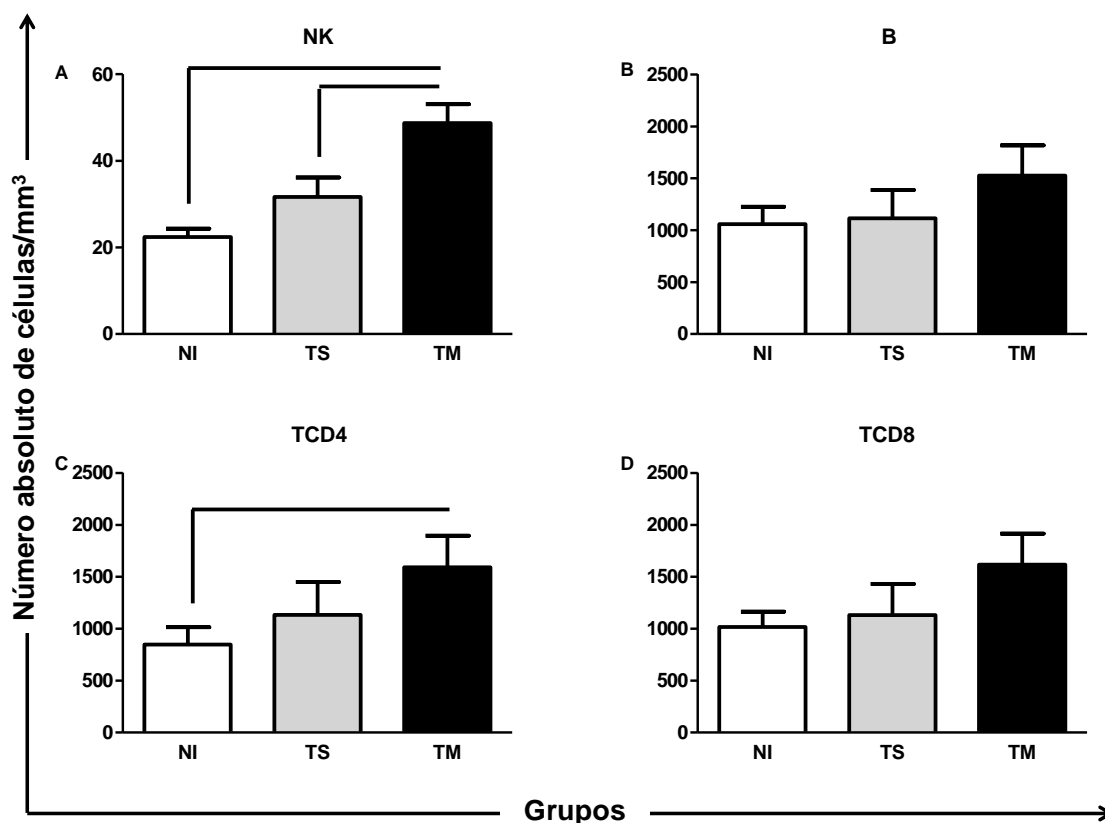


Figura 5: Número absoluto de células NK, B, TCD4 e TCD8 no sangue periférico de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ▒) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

5.3 - Análise do perfil leucocitário do baço

O efeito da infecção por formas TS ou TM sobre as respostas imunes inata e adquirida, na fase crônica da infecção, foi avaliado pela análise fenotípica das células NK, B, TCD4⁺ e TCD8⁺ no baço.

Foi observado aumento do percentual TCD8⁺ (Figura 6D), esplênicas, no grupo infectado por formas TS em relação ao grupo TM e NI.

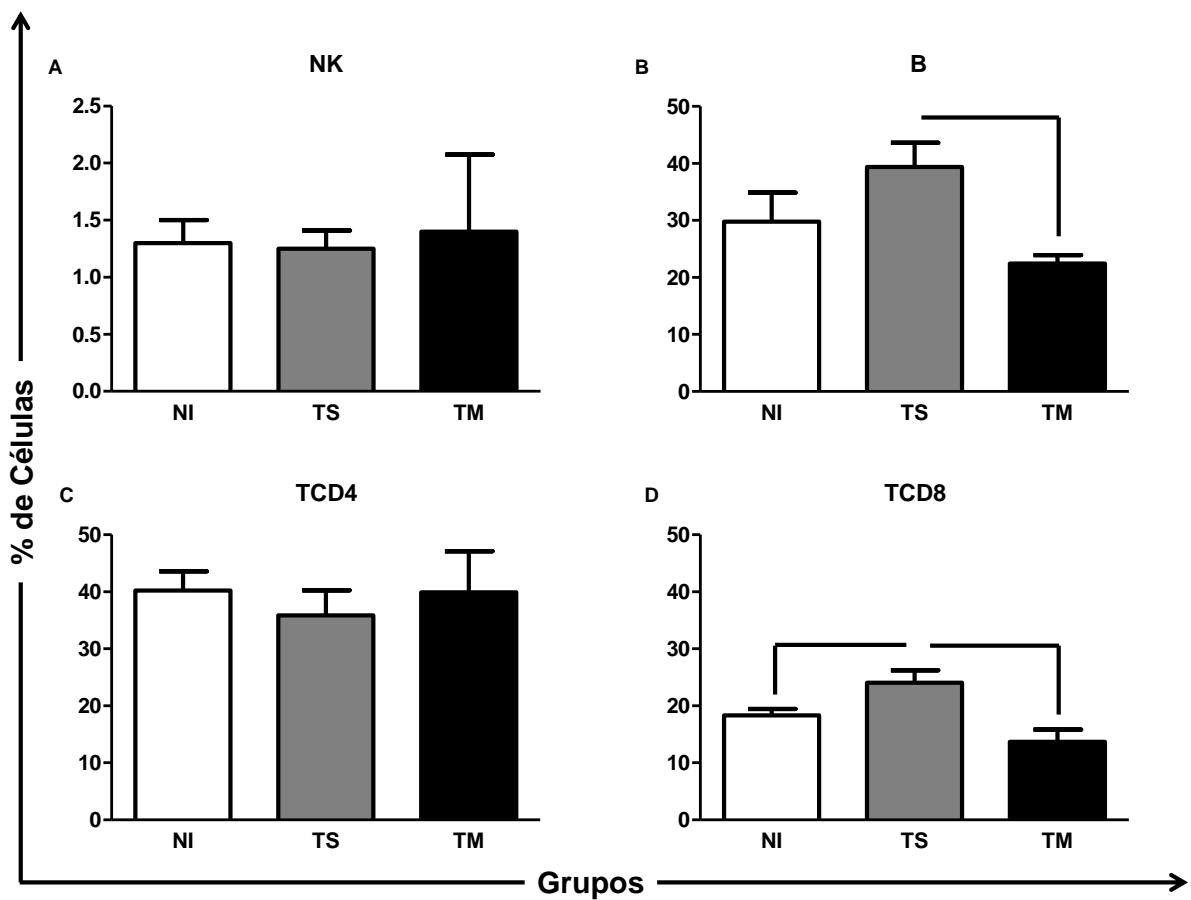


Figura 6: Percentual médio de células NK, B, TCD4⁺ e TCD8⁺ no baço de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas (p<0.05) entre os grupos.

5.4 - Citocinas produzidas por células esplênicas

O percentual de células NK, Linfócitos B, Linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ produtores de TNF α , IFN- γ e IL-10, no baço, foi caracterizado a fim de avaliar o impacto da infecção por formas TS ou TM sobre a produção de citocinas por células da imunidade inata e adaptativa na fase crônica da infecção.

5.4.1 - Resposta imune inata

5.4.1.1 - Células NK

Não foram encontradas alterações no percentual de células NK TNF- α ⁺ (Figura 7A), NK IFN- γ ⁺ (Figura 7B) e NK IL-10⁺ (Figura 7C) entre os grupos experimentais.

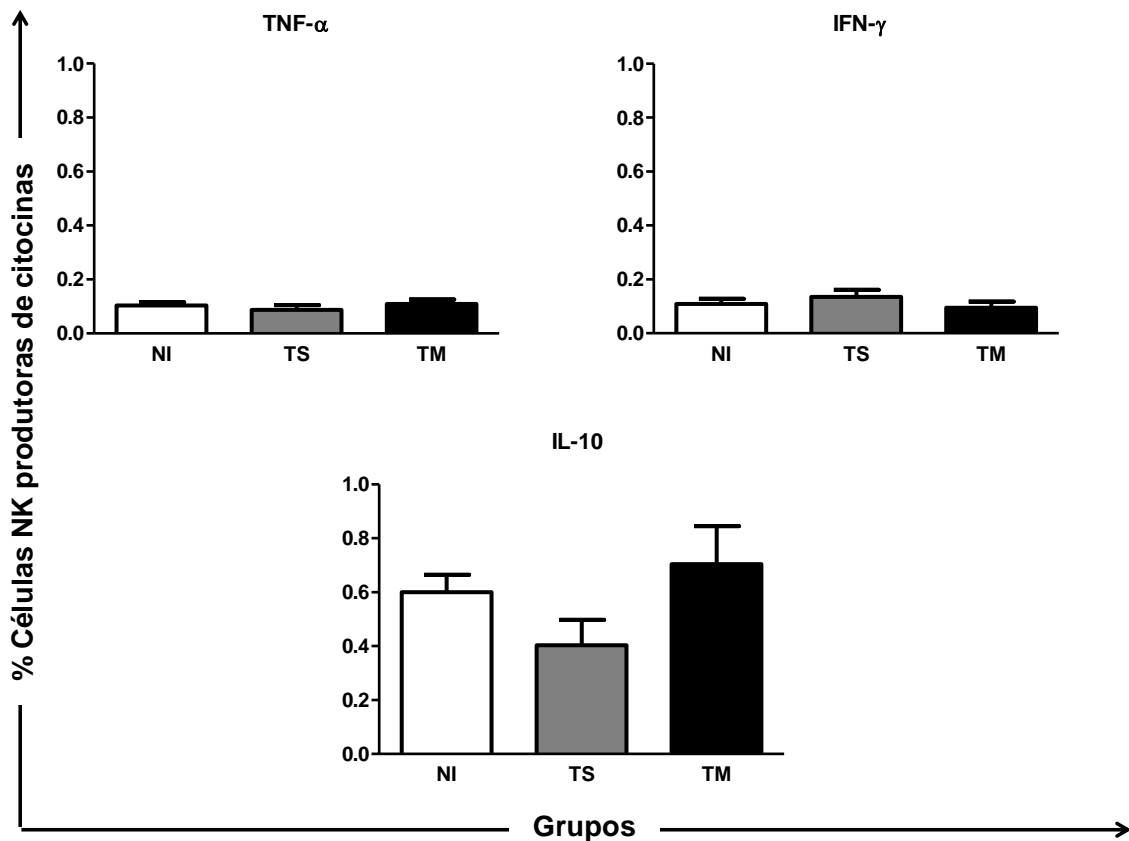


Figura 7: Percentual de células NK TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ e IL-10⁺ no baço de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

5.4.2 - Resposta imune adquirida

5.4.2.1 - Células B

Verificou-se aumento significativo, no grupo TM, do percentual de células B $\text{IFN-}\gamma^+$ quando comparado ao grupo NI (Figura 8B) e no percentual de células B $\text{TNF-}\alpha^+$ (Figura 8A) e B IL-10^+ (Figura 8C) em relação aos grupos NI e TS.

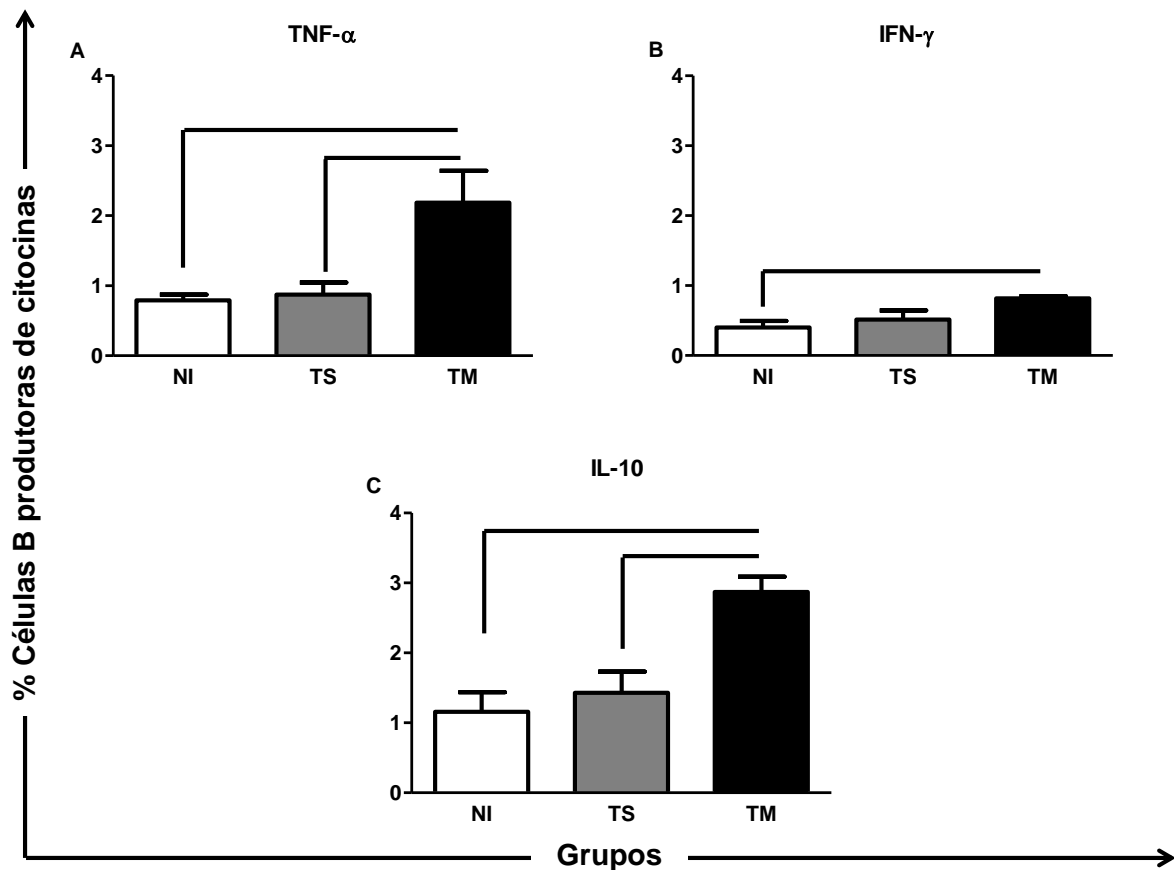


Figura 8: Percentual de células B $\text{TNF-}\alpha^+$, $\text{IFN-}\gamma^+$ ou IL-10^+ no baço de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

5.4.2.2 - Células TCD4⁺ e TCD8⁺

Observou-se aumento do percentual de células TCD4⁺ TNF- α ⁺ no grupo TS, quando comparado ao grupo NI (Figura 9A). Não foram observadas diferenças significativas no percentual de células TCD4⁺ IFN- γ ⁺ (Figura 9B). Em relação ao percentual de células TCD4⁺ IL-10⁺, observou-se aumento significativo no grupo TM quando comparado ao TS (Figura 9C).

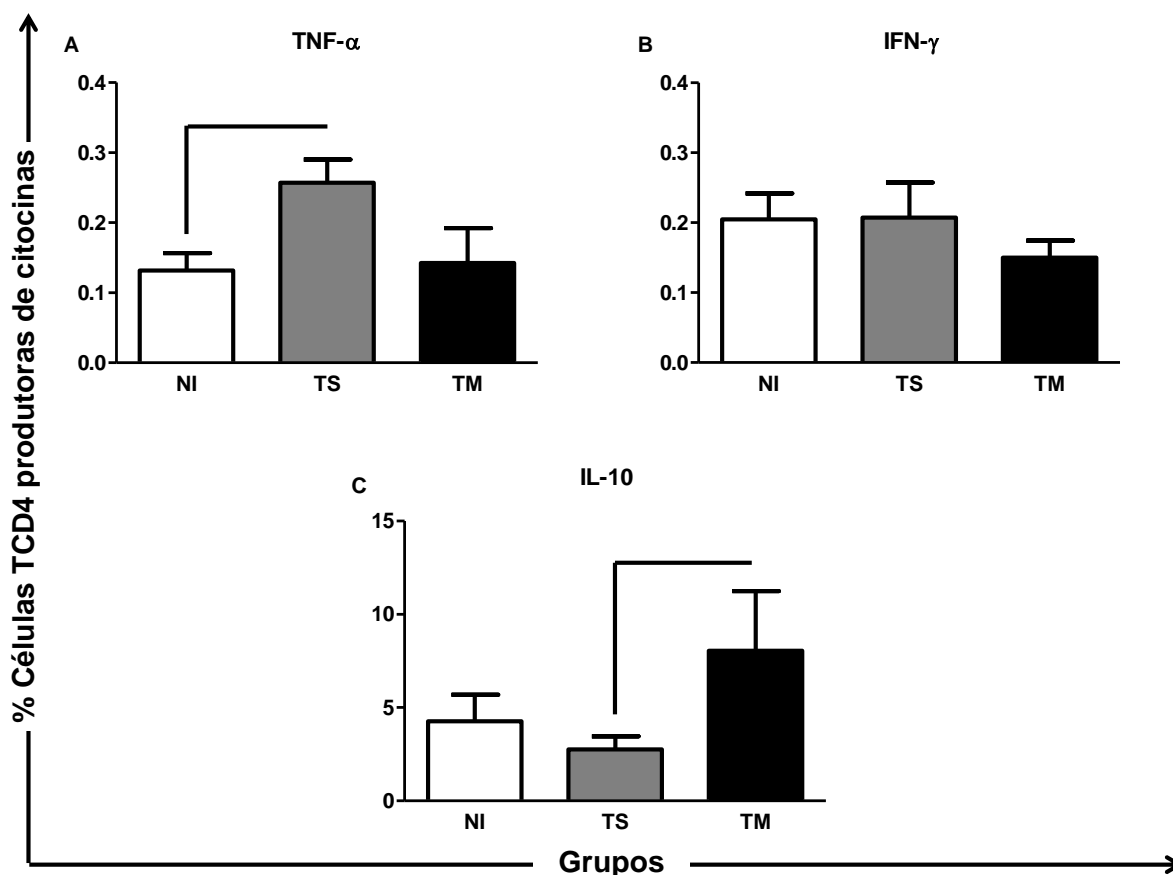


Figura 9: Percentual médio de células TCD4 TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

Não foram observadas diferenças significativas no percentual de células TCD8⁺ TNF- α ⁺ (Figura 10A) e TCD8⁺ IL-10⁺ (Figura 10C). Por outro lado, o percentual de células TCD8⁺ IFN- γ ⁺ diminuiu no grupo TM quando comparado aos grupos TS e NI (Figura 10B).

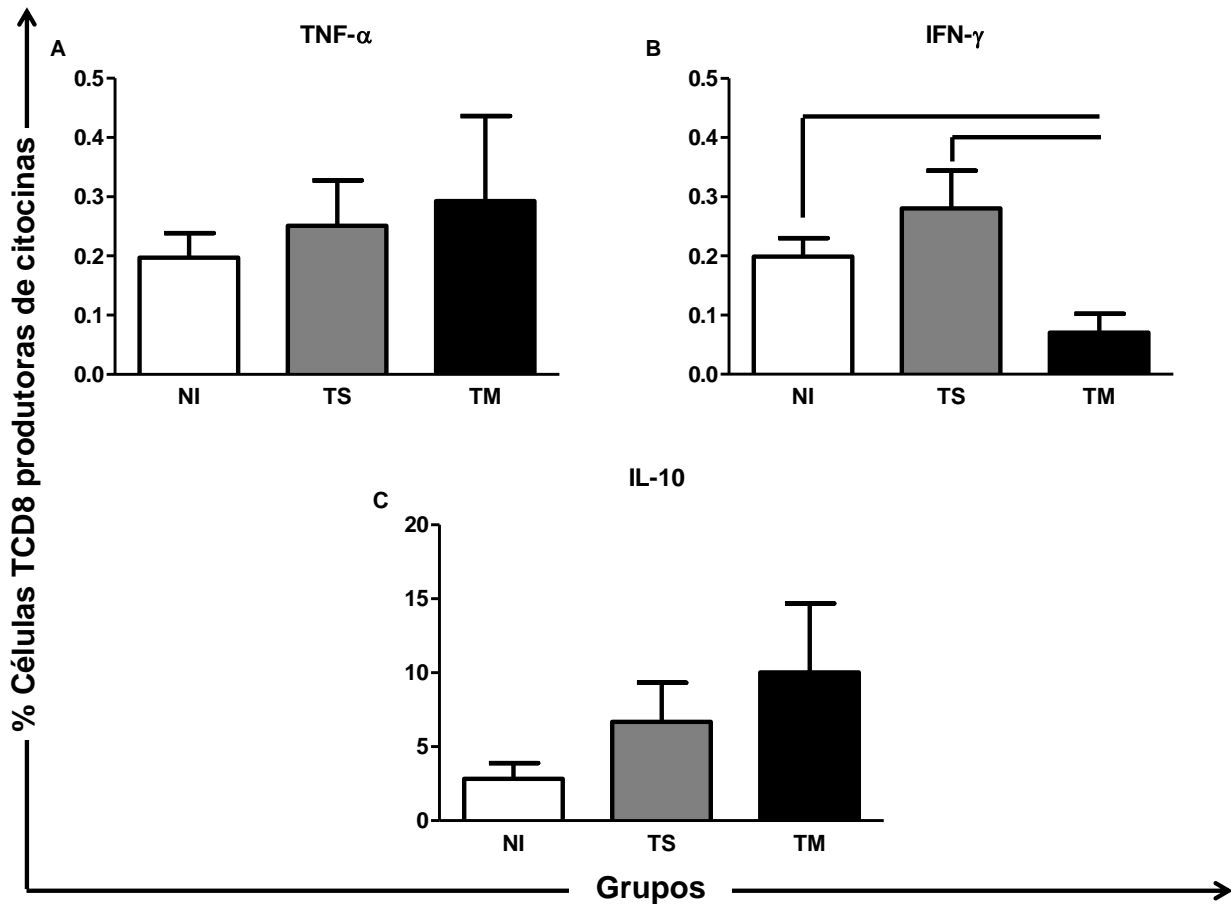


Figura 10: Percentual médio de células TCD8 TNF- α ⁺, IFN- γ ⁺ ou IL-10⁺ no baço de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas (p<0.05) entre os grupos.

5.5 - Avaliação dos Níveis Cardíacos de Citocinas

A expressão gênica das citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β), no coração, foi realizada quantitativamente a fim de avaliar o impacto da infecção por formas TS ou TM na fase crônica.

5.5.1 - Avaliação da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias no coração

A infecção desencadeada por TS ou TM promoveu aumento da expressão gênica de IL12 e IFN- γ nos grupos TS e TM em relação ao grupo NI, mas não houve diferença entre os dois grupos infectados. Para TNF- α não houve diferença em relação ao grupo NI, para nenhum dos dois grupos. Porém, foi observada redução da expressão do mRNA da citocina TNF- α no grupo TM em relação ao grupo TS (Figura 11 B).

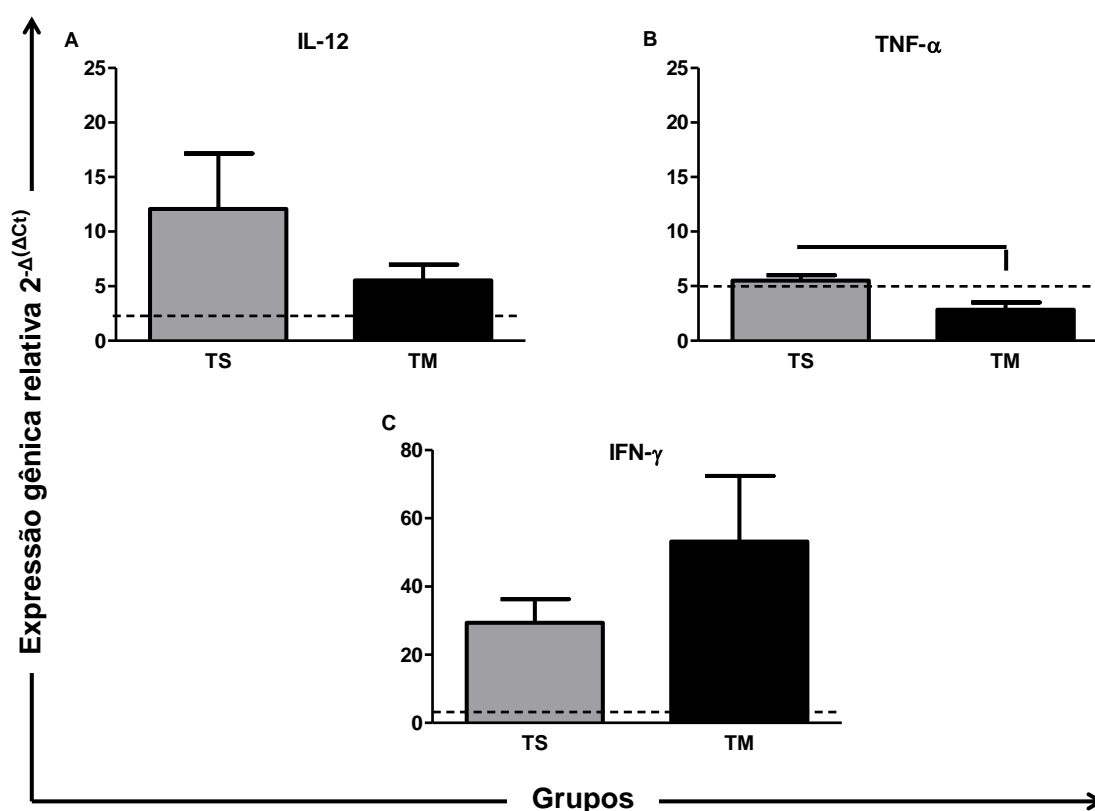


Figura 11: Expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) no coração de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; \square) ou metacíclicas (TM; \blacksquare) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção. A linha tracejada representa a expressão gênica relativa do mRNA de citocinas pró-inflamatórias no coração de animais não infectados. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

5.5.2 - Avaliação da expressão de mRNA de citocinas anti-inflamatórias

Ambos os grupos apresentaram aumento da expressão gênica do mRNA da citocina IL-10 em relação ao grupo NI (Figura 12A). Para a citocina TGF- β apenas no grupo TS foi verificada maior expressão que o grupo NI (Figura 12B). O grupo TS apresentou aumento na expressão do mRNA das citocinas IL-10 (Figura 12A) e TGF- β (Figura 12B) em relação ao grupo TM.

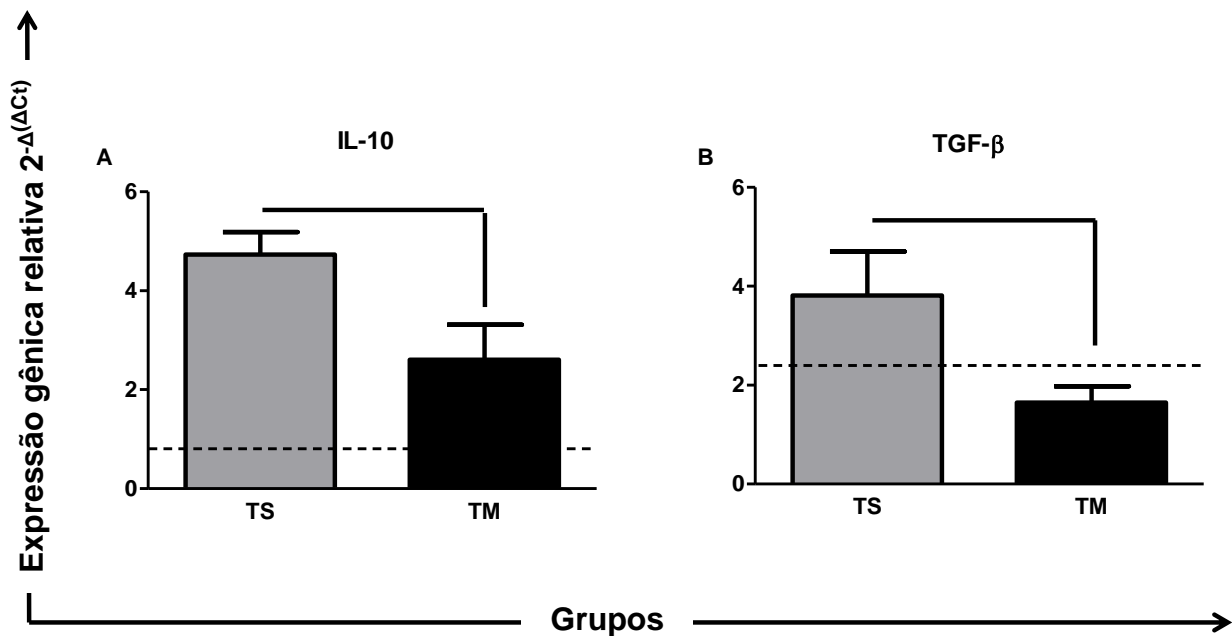


Figura 12: Expressão do mRNA de citocinas anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) no coração de camundongos infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* na fase crônica da infecção. A linha tracejada representa a expressão gênica relativa do mRNA de citocinas anti-inflamatórias no coração de animais não infectados. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

5.6 - Alterações histopatológicas

O impacto da infecção por formas TS ou TM também foi verificado sobre as alterações histopatológicas cardíacas durante a fase crônica da DC.

5.6.1 - Quantificação do processo inflamatório cardíaco

Embora na análise qualitativa os animais infectados por formas TS (Figura 15B) ou TM (Figura 15C) tenham apresentado infiltrado inflamatório cardíaco discreto com predomínio de células mononucleares não foram observadas diferenças estatísticas no número de células inflamatórias no tecido cardíaco de animais (Figura 13).

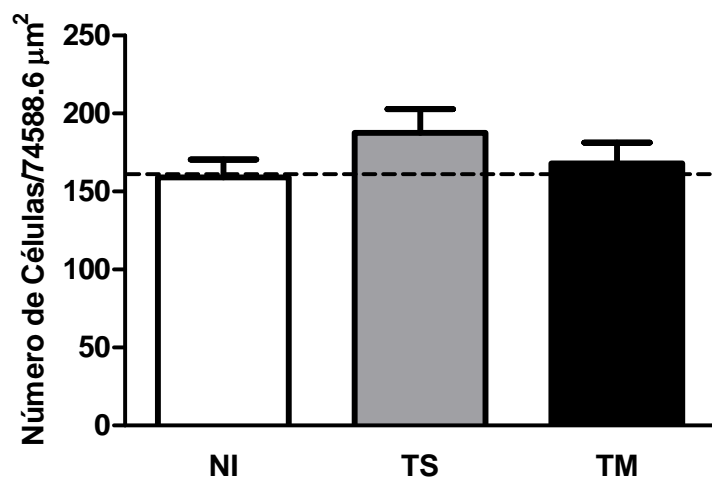


Figura 13: Quantificação de núcleos celulares no tecido cardíaco de camundongos não infectados (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. As linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

5.6.2 - Análise morfométrica da fibrose cardíaca

Os animais dos grupos TS (Figura 15E) ou TM (Figura 15F) mostraram área de fibrose estatisticamente maior quando comparados aos animais do grupo NI que apresentaram aspecto histológico cardíaco normal (Figuras 14 e 15D). Além disso, este processo foi maior no grupo TM em relação ao grupo TS (Figura 14).

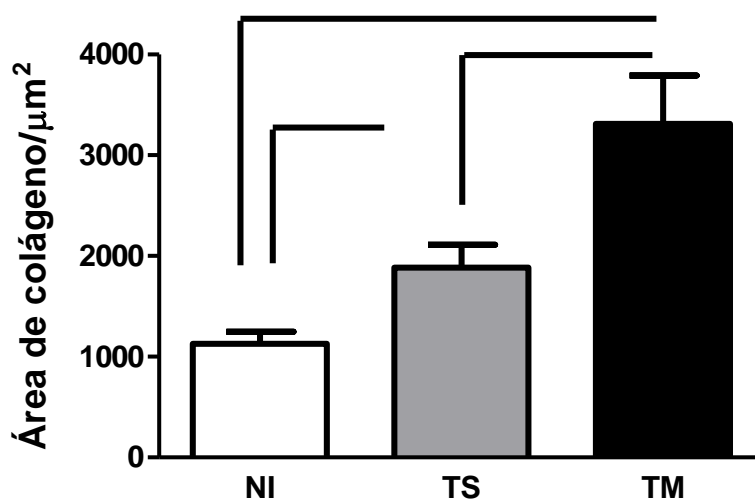


Figura 14: Quantificação da área de fibrose no músculo cardíaco de camundongos não infectado (NI; □) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS; ■) ou metacíclicas (TM; ■) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. As linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos.

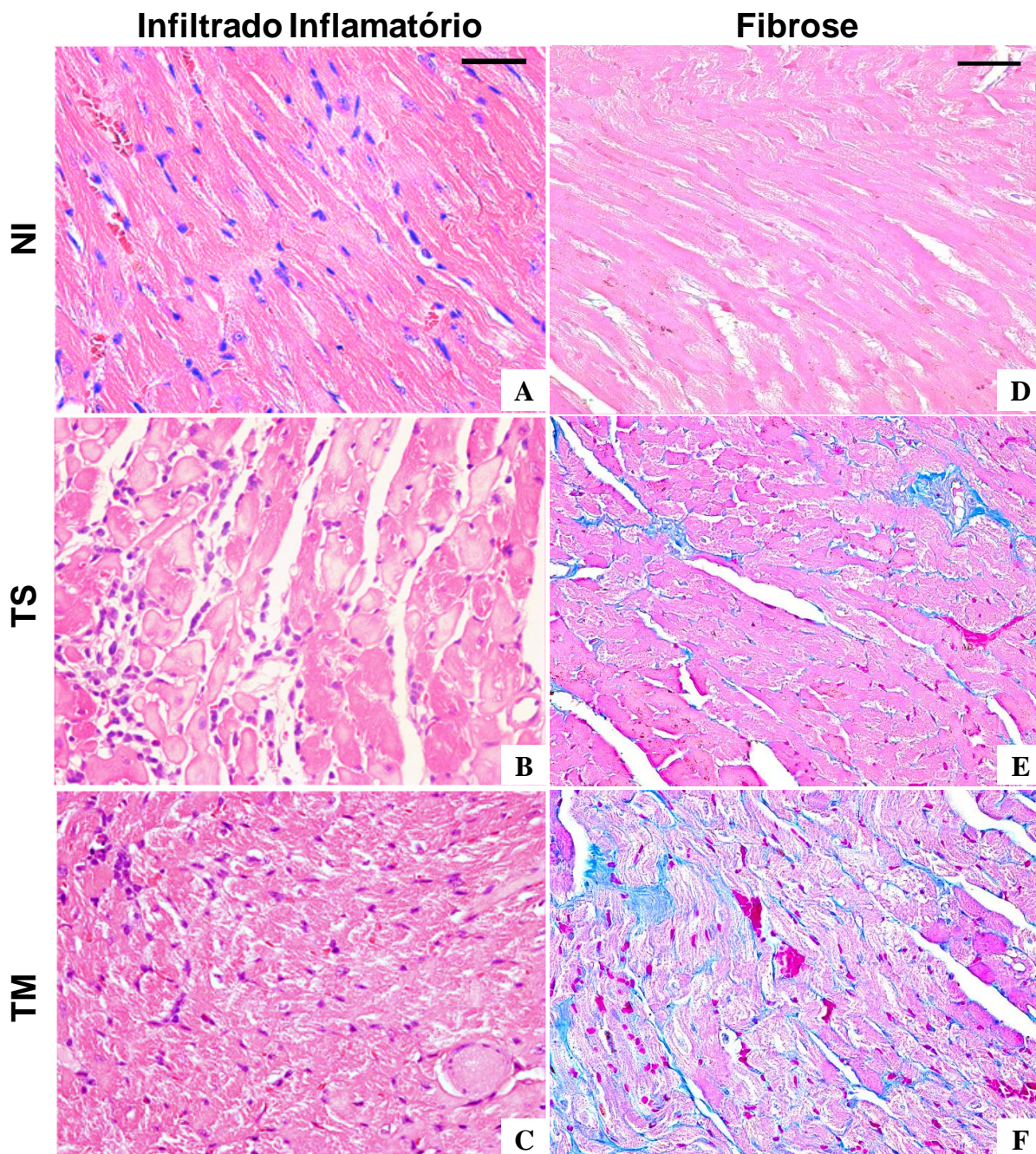


Figura 15: Fotomicrografias de cortes histológicos cardíacos de camundongos *Swiss* machos não infectados (NI) e infectados com formas tripomastigostas sanguíneas (TS) ou metacíclicas (TM) da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi* eutanasiados aos 180 dias após a infecção. Animais do grupo NI apresentando aspecto histológico cardíaco normal (A e D); infectados por formas TS (B) ou TM (C) apresentando infiltrado inflamatório. Fibrose nos animais dos grupos TS (E) e TM (F). A, B e C: Hematoxilina Eosina. D, E e F: Tricrômico de Masson. Barra = 50µm.

6 - DISCUSSÃO

A infecção mediada por formas TM pode simular o contágio pelo agente vetor, já a infecção com formas TS simula as formas de transmissão sanguínea e por acidentes de laboratório. Grande parte das infecções experimentais é realizada utilizando formas TS, pois estas são de fácil obtenção e manutenção. Portanto, o conhecimento da resposta imune desencadeada por estas diferentes formas infectantes, pode nortear a escolha das mesmas em diferentes protocolos experimentais, principalmente se considerarmos que com a erradicação do vetor, na atualidade, cada vez se tornam mais importantes os mecanismos de transmissão que envolve formas TS.

Experimentos do nosso grupo de pesquisa demonstraram, em cães e camundongos, que a infecção por formas TM apresenta maior período pré-patente, pico de parasitemia mais tardio, bem como menores níveis de parasitemia em relação à infecção por formas TS. Estes dados sugerem que a interação parasito/célula hospedeira ocorre de forma distinta, dependendo da fonte do inóculo. Portanto, independente do modelo experimental utilizado, a fonte do inóculo mostra-se como um fator relevante no desenvolvimento da fase aguda DC (Carneiro *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2012). No entanto, no que diz respeito a fase crônica da doença não há relatos, o que justifica a investigação das principais alterações na resposta imunológica em camundongos infectados experimentalmente por formas TS ou TM do *T. cruzi* na fase crônica da DC.

A fase crônica inicia-se quando o sistema imune do hospedeiro controla a multiplicação do parasito, ocorrendo simultaneamente a redução do parasitismo tecidual e sanguíneo. Consequentemente, o processo inflamatório tende a reduzir, porém a manutenção de uma resposta inflamatória ativa e progressiva está associada às alterações graves da DC e ao desenvolvimento da fase crônica determinada ou aparente, na qual as manifestações clínicas mais comuns envolvem o coração e o trato digestório, caracterizando as formas cardíaca ou digestiva (mega cólon ou esôfago), respectivamente, que podem ocorrer isoladas ou em associação (TAFURI, 1971; PRATA, 2001).

O conhecimento das populações celulares presentes no sangue periférico constitui uma das melhores formas de avaliação da resposta imune, pois permite acompanhar, ao longo do tempo, a evolução da doença. No caso da DC, este acompanhamento permite compreender os múltiplos fatores relacionados ao curso da doença, possibilitando a elaboração de hipóteses que expliquem os mecanismos envolvidos na amplificação e manutenção de determinadas lesões.

Neste trabalho, foi observada redução do número de leucócitos totais nos grupo de animais infectados por ambas as formas infectantes e a diminuição de monócitos no grupo TS e linfócitos nos animais infectados pelas formas TS e TM, o que pode estar relacionado com o recrutamento dessas células para os órgãos alvo, o que corrobora com os resultados da avaliação histopatológica no coração, que mostrou uma distribuição discreta e difusa de células inflamatórias mononucleares no tecido cardíaco.

O sucesso no controle da infecção pelo *T. cruzi* e, conseqüentemente, da DC envolve o desenvolvimento de uma resposta imune modulada que promova o menor dano tecidual.

O aumento de células NK e linfócitos TCD4⁺ observado no sangue periférico, no grupo TM, sugere uma resposta resolutive mais precoce quando comparado ao grupo TS, na qual foi verificada apenas redução da população de monócitos do sangue periférico. Esses dados sugerem, semelhante ao observado na fase aguda da infecção em camundongos, uma resposta imune mais precoce e modulada no grupo TM quando comparado ao grupo TS (VIEIRA *et al.*, 2012).

As células Natural Killer (NK) são as primeiras a atuarem na resposta imune inata. Elas possuem mecanismos semelhantes aos dos linfócitos T citotóxicos (LIEBERMAN, 2003), sendo responsáveis pela produção de IFN- γ , citocina que irá promover a estimulação da atividade microbicida dos macrófagos. Ao investigarmos o perfil fenotípico destas células no sangue periférico dos animais foi constatada diferença no percentual de células entre os diferentes grupos. Análises do perfil fenotípico de linfócitos no sangue periférico de humanos com doença de Chagas aguda indicam que as células NK são ativadas pelo *T. cruzi* anteriormente ao desenvolvimento da imunidade celular (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2003). Como as análises do presente estudo foram realizadas na fase crônica, a análise da produção de IFN- γ por células NK já não seria tão importante, pois os linfócitos T são capazes de produzir maior quantidade desta citocina neste estágio da infecção, o que corrobora com a ausência da produção dessa citocina por células NK no presente estudo.

O aumento do número de linfócitos TCD4⁺ no sangue periférico pode estar associado ao recrutamento, diferenciação e ativação de células B, como observado no baço, semelhante ao observado por (KUMAR & TARLETON, 1998), que descreveram o papel das células TCD4⁺ não só no recrutamento, diferenciação e ativação das células B, como também de linfócitos TCD8⁺ e macrófagos, bem como na produção de anticorpos e citocinas (FERRAZ *et al.*, 2009). Além disso, estudos realizados por

TARLETON *et al.* (1994) e ROTTENBERG *et al.* (1995) em modelos de infecção chagásica experimental têm mostrado a participação não somente das células TCD8⁺, mas também das células TCD4⁺ no aumento da sobrevivência assim como no controle do parasitismo. As células TCD4⁺ direcionam e potencializam mecanismos efetores, incluindo a mudança de isotipos de anticorpo e ativação de fagócitos e células TCD8⁺.

A infecção pelo *T. cruzi* promove esplenomegalia em camundongos e humanos, tanto durante a fase aguda quanto crônica, sendo os esplenócitos importantes na resposta imune do hospedeiro. SATHLER-AVELAR *et al.* (2003) e KROLL PALHARES *et al.* (2008) relataram que a DC induz em humanos e em modelos experimentais alterações na resposta imune celular do hospedeiro que refletem alterações fenotípicas, não apenas no que diz respeito a imunidade inata, mas também no contexto da imunidade adaptativa.

GRISOTTO *et al.* (2001) estudando camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, demonstraram o aumento de células no baço traduzido pelo aumento das células TCD4⁺ e TCD8⁺ e das células B, durante a fase aguda. Durante a fase crônica recente, linfócitos TCD4⁺ e B retornaram aos valores normais, enquanto que as células TCD8⁺ continuaram elevadas. Entretanto, neste trabalho não foram observadas alterações no percentual de células TCD4⁺ no baço de camundongos infectados por formas TM ou TS ao longo da fase crônica, demonstrando que em nosso modelo não há expansão das células TCD4⁺ no baço. ROTTENBERG *et al.* (1993) mostraram que a ausência dessas células em animais deficientes foi determinante para a proliferação de parasitos no coração. Por outro lado, alguns autores têm demonstrado que apesar da importância destas células no controle da disseminação dos parasitos, elas também contribuem para a patogênese na infecção. Assim, a eliminação dessas células por anticorpos monoclonais, embora favoreça a multiplicação dos parasitos em diversos órgãos, também acarreta uma significativa redução do infiltrado inflamatório cardíaco (RUSSO *et al.*, 1996). Com base nestes fatos, foi realizado um estudo de análise fenotípica das células da resposta inata e adaptativa no baço.

O aumento do percentual de esplenócitos TCD8⁺ no grupo TS pode sugerir uma infecção crônica ainda ativa, diferente do observado no grupo TM. Estes resultados são corroborados por MARINHO *et al.* (1998) que demonstraram que o número de linfócitos TCD8⁺ no baço de camundongos cronicamente infectados está relacionado à gravidade da doença. Considerando que em ambos os grupos foi observada inflamação cardíaca, é importante que uma avaliação imuno-histoquímica seja realizada, nos dois

grupos visando confirmar se em TS predominam linfócitos TCD8⁺ e em TM linfócitos TCD4⁺, semelhante ao descrito em humanos por HIGUCHI *et al.* (1997) e em camundongos por TARLETON *et al.* (1995) que relacionaram estas células, respectivamente, à doença e proteção.

A produção das citocinas, pró-inflamatórias, TNF- α e IFN- γ , por células B, no grupo TM corrobora com os resultados da avaliação histopatológica qualitativa que mostrou presença de células inflamatórias no tecido cardíaco. Por outro lado, o aumento da produção da citocina anti-inflamatória IL-10 por essas células pode estar relacionado ao controle da lesão nesse grupo. Estudos demonstraram que as células B que podem suprimir a progressão e/ou melhoram a recuperação de inflamações mediadas pela imunidade adquirida, por mecanismos que incluem a produção de IL-10, apresentação secundária de antígenos e interação com outras células imunes diretamente ou através de anticorpos secretados, tanto no contexto *ex vivo* quanto após estimulação antigênica (SATHLER-AVELAR *et al.*, 2003; MIZOGUCHI & BHAN, 2006).

O aumento da produção de TNF- α ⁺ no grupo TS e IL-10⁺ no grupo TM por células TCD4⁺ sugere infecção ativa em TS relacionada à citocina pro-inflamatória TNF- α que pode modular a expressão de quimiocinas envolvidas no recrutamento celular e no controle do parasitismo de macrófagos pelo *T. cruzi* (ALIBERTI *et al.*, 2001) e infecção modulada no grupo TM por IL10 que inibe a produção de IFN- γ por linfócitos T e de várias citocinas e quimiocinas por macrófagos, bloqueando as funções destas células na ativação de células T (TRINCHIERI, 1997).

Sabe-se que células TCD8⁺ podem ter um duplo papel na DC, no controle do parasitismo intracelular e indução de danos teciduais, dependendo da fase da doença (FUENMAYOR-MEZA, 2000; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2005).

ALBAREDA *et al.* (2006) e LAUCELLA *et al.* (2004) observaram que a produção de IFN- γ pelas células TCD8⁺ específicas para *T. cruzi* é inversamente correlacionada a gravidade da DC crônica humana. Estudos anteriores relataram que indivíduos com a forma clínica mais grave têm baixas quantidades de células TCD8⁺ IFN- γ ⁺ específicas para *T. cruzi* do que pacientes na fase assintomática da infecção ou apenas com manifestações discretas da doença cardíaca chagásica crônica. Esta deficiência aparente foi também associada a uma maior frequência de células de memória diferenciadas e um aumento da taxa de apoptose da população de células TCD8⁺ (ALBAREDA *et al.*, 2006).

De maneira geral, os dois compartimentos avaliados nesse trabalho (sangue periférico e baço) desencadeiam respostas distintas na infecção pelas diferentes formas infectantes do *T. cruzi*. No sangue periférico a imunofenotipagem das células mononucleares mostrou aumento no número absoluto de células NK e TCD4⁺ no grupo TM. Por outro lado, no baço, ocorre aumento na população de linfócitos TCD8⁺ do grupo TS.

Uma vez estabelecido o perfil imunofenotípico na fase crônica da infecção experimental, em camundongos, pelo *T. cruzi*, o próximo passo foi avaliar o efeito da infecção por formas TS e TM sobre a produção de citocinas pró (IL-12, IFN- γ e TNF- α) e anti-inflamatórias (IL-10 e TGF- β) nesses animais. Na fase crônica da infecção foi observada diminuição da expressão do mRNA da citocina pró-inflamatória TNF- α no grupo TM e aumento das citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β no grupo infectado por formas TS.

A resposta inflamatória no grupo TM está controlada devido ao aumento da produção de IL-10, citocina imunorreguladora, por células TCD4⁺ e da diminuição da produção de IFN- γ por células TCD8⁺ presentes no baço.

Citocinas como IL-10 e TGF- β possuem ação anti-inflamatória e são capazes de inibir a ativação dos macrófagos induzidos por IFN- γ , inibindo tanto a liberação dos metabólicos tóxicos quanto a diferenciação de células Th1 (REED *et al.*, 1994; ABRAHAMSOHN, 1998; BRODSKYN & BARRAL-NETO, 2000). O aumento de células TCD8⁺ e a alta produção de citocinas pró-inflamatórias, TNF- α por células TCD4⁺, nos animais infectados pelas formas TS pode sugerir que ainda há infecção ativa, que pode estar progredindo para uma resposta imune modulada, porém mais tardia que no grupo TM, corroborado pela produção de citocinas anti-inflamatórias IL-10 e TGF- β no coração dos animais do grupo TS.

Atualmente sabe-se da importância entre a gravidade das lesões inflamatórias na miocardite aguda e o surgimento da cardiomiopatia chagásica dilatada na fase crônica. Desse modo foi quantificado o processo inflamatório e a área de deposição de colágeno nos animais infectados pelas formas TS ou TM na fase crônica.

Foi observada a manutenção do processo inflamatório discreto e difuso com predomínio de células mononucleares em ambos os grupos infectados.

O processo inflamatório tem início após a infecção, caracterizado pela presença multifocal de infiltrado inflamatório no tecido e recrutamento de células mononucleares,

que normalmente ficam aderidas aos cardiomiócitos. VIEIRA *et al.* (2012) observaram a ausência de uma inversão de um perfil inflamatório para um perfil imunomodulado nos animais do grupo TS, mesmo quando a parasitemia estava sob controle. Além disso, o processo inflamatório cardíaco se manteve elevado até o 42º DAI nos animais do grupo TS.

Embora o parasitismo de tecido seja raro na fase crônica da infecção, pode haver a produção de antígenos em decorrência da presença do parasito, resultando em uma resposta imune (CABRAL *et al.*, 2002). É possível que até mesmo um baixo grau de parasitismo persistente sirva como um estímulo antigênico contínuo, e que tanto a inflamação por *T. cruzi* quanto uma resposta autoimune possam desempenhar papéis importantes na patogênese da DC (ROSSI, 1991).

Estudos propõem que na fase crônica da DC, as células TCD4⁺ respondam de forma deletéria contra antígenos próprios, desencadeando reações inflamatórias de cunho autoimune, sendo estas responsáveis pela manutenção da miocardite crônica (RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 1991; Dos SANTOS *et al.*, 1992; 2001).

As células TCD8⁺ constituem o tipo predominante de linfócitos no coração (REIS *et al.*, 1993; TARLETON *et al.*, 1994; HIGUCHI *et al.*, 1997), baço (MARINHO *et al.*, 1998) e tecido nervoso (MIRKIN *et al.*, 1994). Outros autores demonstraram predomínio de linfócitos TCD8⁺ em relação aos linfócitos TCD4⁺ na miocardite chagásica crônica (HIGUCHI *et al.*, 1997; TOSTES JUNIOR *et al.*, 1994; REIS *et al.*, 2000). Portanto, a presença dos linfócitos TCD8⁺ no tecido cardíaco pode estar associada à lesão tecidual, devido à ação imunopatogênica destas células contra o hospedeiro, podendo assim causar citólise com destruição da miofibra cardíaca (CUÑA & CUÑA, 1995). SILVERIO *et al.* (2010) também observaram que camundongos nocautes para linfócitos TCD8⁺ tiveram menores lesões e disfunções cardíacas, demonstrando que essas células poderiam ser também responsáveis por dano aos cardiomiócitos, favorecendo o desenvolvimento de lesões no tecido cardíaco. Além disso, CALIARI *et al.* (2002) e LEAVEY & TARLETON (2003) observaram a participação das células TCD8⁺ na gênese das lesões cardíacas de fase crônica.

Avaliando o aumento de citocinas anti-inflamatórias e diminuição da produção de citocinas pró-inflamatórias pode-se sugerir que a infecção pela forma infectante TM já se encontra em sua maior parte resolvida, aos 180 dias após a infecção, mesmo que ainda exista a permanência de infiltrado inflamatório no tecido cardíaco. Já na infecção pelas formas TS, esta ainda encontra-se ativa, pois ainda ocorre o recrutamento de

células para o tecido cardíaco, assim como grande produção de citocinas pró-inflamatórias. A produção de citocinas anti-inflamatórias no tecido cardíaco pode estar relacionada à presença do infiltrado inflamatório ainda ativo no coração.

A fibrose é uma das manifestações mais significativas da cardiopatia chagásica crônica e encontra-se associada a infiltrado inflamatório e cardiomiócitos em degeneração. Os mecanismos que regulam a fibrose em diferentes órgãos e tecidos são semelhantes e possuem características comuns, como o acúmulo progressivo de tecido conjuntivo e deposição excessiva de colágeno, resultando em substituição da arquitetura normal do tecido e comprometimento de sua atividade funcional. Este processo é mediado por citocinas e fatores de crescimento solúveis que regulam a migração, proliferação e diferenciação celular, assim como a síntese e degradação de componentes de matriz extracelular.

O acometimento do miocárdio em camundongos cronicamente infectados parece ser consequência do parasitismo e da inflamação durante os primeiros estágios da doença (SCHLEMPER *et al.*, 1983). Componentes da matriz podem adsorver antígenos do parasito e citocinas que podem contribuir para o estabelecimento e perpetuação da inflamação. PINHO *et al.* (2002) demonstraram que a adsorção de antígenos do parasito por células sensibilizadas levava a um aumento na expressão de componentes de matriz tais como fibronectina, laminina e colágeno tipo I. Este dado reforça a ideia de que antígenos liberados por *T. cruzi* podem estar envolvidos no estabelecimento da inflamação, sensibilizando células hospedeiras não infectadas, levando a uma resposta imune contra os antígenos do parasito.

No coração, além dos fibroblastos, também os cardiomiócitos secretam citocinas fibrogênicas como TGF- β . Essa citocina associada àquelas produzidas pelas células inflamatórias recrutadas para o tecido inflamado podem contribuir para o desencadeamento e manutenção do processo fibrótico (ARAÚJO-JORGE *et al.*, 2008). O TGF- β participa da regulação do processo inflamatório e da resposta imune, mas, também, é responsável pelo surgimento da fibrose e do remodelamento cardíaco que ocorre na DC. Pacientes com a disfunção cardíaca moderada ou grave apresentam imunorreatividade para PS2, marcador da ativação da via de sinalização de TGF- β , e fibronectina, marcador de fibrose, e maiores níveis de TGF- β no soro quando comparado a indivíduos saudáveis (ARAÚJO-JORGE *et al.* 2002, ARAÚJO-JORGE *et al.* 2008).

Além da elevada expressão de colágeno durante a fase crônica da DC, outros componentes de matriz extracelular também têm sua expressão aumentada durante a evolução do processo de fibrose, tais como laminina e fibronectina. Além disso, em resposta a injúria, TGF- β promove a migração e proliferação de fibroblastos requerida para a regeneração tecidual. Estudos anteriores mostraram que a produção de TGF- β em áreas próximas a lesão tissular pode contribuir para a hipertrofia de miócitos e para o processo de deposição de matriz (revisto em LIJNEN *et al.* 2000). O que confirma os resultados encontrados nesse trabalho, pois na infecção por formas TS foi observado um quadro de fibrose cardíaca em ascensão, corroborado pela presença de TGF- β .

7 - CONCLUSÕES

A infecção por formas TM apresenta um perfil de citocinas anti-inflamatório e um quadro de fibrose expressivo, sugerindo resolução do processo inflamatório. Por outro lado, a infecção por formas TS apresenta um perfil de citocinas ainda pró-inflamatório, com um quadro de fibrose cardíaca em ascensão, corroborado pela presença de TGF- β , sugerindo que a infecção por TS evolui para um quadro resolutivo mais tardio e grave.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ACOSTA A.M.; SANTOS-BUCH C.A. **Autoimmune myocarditis induced by *Trypanosoma cruzi*.** Circulation. 71(6):1255-61,1985.

ACOSTA-SERRANO A.; ALMEIDA I.C.; FREITAS-JUNIOR L.H.; YOSHIDA N.; SCHENKMAN S. **The mucin-like glycoprotein super-family of *Trypanosoma cruzi*: structure and biological roles.** Mol Biochem Parasitol. 114(2):143-50, 2001.

ADAD, S. J.; ANDRADE, D. C. S.; LOPES, E. R. CHAPADEIRO, E. **Contribuição ao estudo da anatomia patológica do megaesôfago chagásico.** Revista do Instituto Nacional de Medicina Tropical de São Paulo, 33:443-450, 1991.

ADAD, S. J.; CANÇADO, C. G.; ETCHEBEHERE, R. M.; TEIXEIRA, V. P. A.; GOMES, U. A.; CHAPADEIRO, E.; LOPES, E. R. **Neuron count reevaluation in the myenteric plexus of chagasic megacolon after morphometric neuron analysis.** Virchows Archiv: an International Journal of Pathology, 438:254–258, 2001.

ALBAREDA, M. C., S. A. LAUCELLA, M. G. ALVAREZ, A. H. ARMENTI, G. BERTOCHI, R. L. TARLETON, AND M. POSTAN. ***Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory T CD8 cells in chronic Chagas disease patients.** Int. Immunol. 18:465– 471, 2006.

ALIBERTI J.C.; SOUTO J.T.; MARINO A.P.; LANNES-VIEIRA J.; TEIXEIRA M.M.; FARBER J.; GAZZINELLI R.T.; SILVA J.S. **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(4):1433-40, 2001.

ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M. A. A. G.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R.T.; VIEIRA, L. Q.; SILVA, J. S. **Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes.** Infection and Immunity, 64:1961-67, 1996.

ALMEIDA, I. C.; CAMARGO, M. M.; PROCÓPIO, D. O.; SILVA, L. S.; MEHLERT, A.; TRAVASSOS, L. R., GAZZINELLI, R. T.; FERGUSON, M. A. **Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents.** EMBO J. 19(7): 1476-1485, 2000.

AL-SABBAGH A.; GARCIA C.A.; DIAZ-BARDALES B.M.; ZACCARIAS C.; SAKURADA J.K.; SANTOS L.M. **Evidence for cross-reactivity between antigen derived from *Trypanosoma cruzi* and myelin basic protein in experimental Chagas disease.** Exp Parasitol. 89(3):304-11,1998.

ANDRADE, Z. A. **A Patologia da doença de Chagas no homem.** Ann. Soc. Belge. Med. Trop, 65, Suppl. 1, 15:30, 1985.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. **Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy.** Am J Pathol, v.144, n.6, Jun, p.1403-11, 1994.

ANDRADE L.O., ANDREWS N.W. **The *Trypanosoma cruzi*-host-cell interplay: location, invasion, retention.** Nat Rev Microbiol. 3(10):819-23, 2005.

ANDRADE, Z.A. **Pathogenesis of Chagas' disease.** Res Immunol.142(2):129-129, 1991.

ARAÚJO-JORGE, T. C.; WAGHABI, M. C.; SOEIRO, M. N.; KERAMIDAS, M.; BAILLY, S.; FEIGE, J.J. **Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardiopathy** Cytokine Growth Factor Rev. Oct- Dec;19(5-6):405-13, 2008.

ARAÚJO-JORGE, T.C.; WAGHABI, M.C.; HASSLOCHER-MORENO, A.M.; XAVIER, S.S.; HIGUCHI, M.D.E L.; KERAMIDAS, M., BAILLY, S., FEIGE, J.J. **Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardiopathy.** J Infect Dis. 15;186(12):1823-8, 2002.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; GOMES, J. A.; CANÇADO, J. R.; FERRARI, T. C.; LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M.; MOREIRA, M. C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. **Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago.** J Infect Dis. 182(2):634-8, 2000.

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; GOMES, J.A.S.; ROCHA, M.O.C.; MOREIRA, M.C.V.; LEMOS, E.M.; LUZ, Z.M.P.; PEREIRA, M.E.S.; COFFMAN, R.L.; DIAS, J.C.P.; CANÇADO, J.R.; GAZZINELLI, G.; CORRÊA-OLIVEIRA R. **IFN- γ in human Chagas. disease: protection or pathology?.** Brazilian Journal of Medical and Biological Research. 31: 127-131, 1998.

BELKAID Y.; ROUSE B.T. **Natural regulatory T cells in infectious disease.** Nat Immunol. 6(4):353-60, 2005.

BEN YOUNÉS-CHENNOUFI, A; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M; TRICOTTET, V; EISEN, H; REYNES, M; SAID, G. **Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infect mice.** Trans R Soc Trop Med Hyg 82: 77-83, 1998.

BERN, C., MONTGOMERY, S. P., HERWALDT, B. L., RASSI JR., A., MARINETO, J. A., DANTAS, R. O.; MAGUIRE, J. H., ACQUATELLA, H., MORILLO, C., KIRCHHOFF, L. V., GILMAN, R. H., REYES, P. A., SALVATELLA, R., MOORE, A. C. **Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review.** JAMA 298, 2171–2181, 2007.

BLUESTONE J.A.; ABBAS A.K. **Natural versus adaptive regulatory T cells.** Nat Rev Immunol. 3(3):253-7, 2003.

BRAZÃO, V.; FILIPIN, M. D. V.; CAETANO, L. C.; TOLDO, M. P. A.; CAETANO, L. N.; PRADO, J. C. D. **Trypanosoma cruzi: the effects of Zinc supplementation during experimental infection.** Experimental Parasitology, 118(4):549-54, 2008.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. **Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas' disease.** Int Arch Allergy Immunol. 114(2):103-10, 1997.

BRODSKYN, C. I.; BARRAL-NETTO, M. **Resposta Imune Humana na Doença de Chagas. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.** 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan,. p.170-176.2000.

BURLEIGH, B. A.; ANDREWS, N. W. **A 120-kDa alkaline peptidase from Trypanosoma cruzi is involved in the generation of a novel Ca²⁺- signaling factor for mammalian cells.** J Biol Chem. 270(10): 5172-5180, 1995.

BURLEIGH, B. A.; CALER, E. V.; WEBSTER, P.; ANDREWS, N. W. **A cytosolic serine endopeptidase from Trypanosoma cruzi is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells.** J Cell Biol. 136(3): 609-620, 1997.

CABRAL H.R.; NOVAK I.T.; GLOCKER T.M.; CASTRO VIERA G.A. **Chagas cardiopathy: identification and quantification of infiltrating cells in the hearts of cardiac death patients of different ages].** Rev Fac Cien Med Univ Nac Cordoba. 59(1):83-9, 2002.

CALIARI M.V.; DO PILAR MACHADO R.; DE LANA M.; CAJA R.A.; CARNEIRO C.M.; BAHIA M.T.; DOS SANTOS C.A.; MAGALHAES G.A.; SAMPAIO I.B.; TAFURI W.L. **Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy.** Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 44(5):273-8, 2002.

CAMARGO, M. M.; ALMEIDA, I. C.; PEREIRA M. E.; FERGUNSON, M. A.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. **Glycosylphosphatidylinositol anchored mucin-like glycoproteins isolated from Trypanosoma cruzi trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages.** J. Immunol. 158 (12): 5890-5901, 1997a.

CAMARGO, M. M.; ANDRADE, A. C.; ALMEIDA, I. C.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. **Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma – primed macrophages.** J. Immunol. 159: 6131-6139, 1997b.

CARNEIRO, C. M.; MARTINS-FILHO, O. A. M.; REIS, A. B.; VELOSO, V. M.; ARAÚJO, F. M. G.; BAHIA, M. T.; LANA, M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.; TAFURI, W. L. **Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute Trypanosoma cruzi infection in dogs.** Acta Tropica. 101: 120-129, 2007.

CASSIS L.; AIELLO S.; NORIS M. **Natural versus adaptive regulatory T cells.** *Contrib Nephrol.*146:121-31, 2005.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION (CDC). **Chagas disease after organ transplantation-Los Angeles, California.** *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 55(29):798-800, 2006.

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

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

COURA, J. R. **Chagas disease: what is known and what is needed a background article.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* v. 102, n. 1, p. 113-122, 2007.

CUÑA, W. R.; CUÑA, C. R. **Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology.** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz .* v. 90(4), p. 503-506, 1995.

CUNHA-NETO E.; COELHO V.; GUILHERME L.; FIORELLI A.; STOLF N.; KALIL J. **Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient.** *J Clin Invest.* 15;98(8):1709-12, 1996.

CUNHA-NETO, E.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; KALIL, J. **Estudo da doença de Chagas: abordagem molecular.** *Revista da Sociedade de Cardiologia do Estado de São Paulo* 5:217-229, 1995.

D'AVILA, D.A.; GUEDES, P.M.; CASTRO, A.M.; GONTIJO, E.D.; CHIARI, E.; GALVÃO, L.M. **Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz* 104: 100-105, 2009.

DA SILVA VALENTE, S. A.; VALENTE, V. C.; FRAIHA NETO, H. **Considerations on the epidemiology and transmission of Chagas disease in the Brazilian Amazon.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 94 (Suppl. 1):S395–S398, 1999.

DE CARVALHO, T. U. **Adesão, reconhecimento, sinalização e invasão.** Programa de Biofísica, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ, Brasil. 2008.

DIAS, J. C. **The indeterminate form of human chronic Chagas' disease A clinical epidemiological review.** *Rev Soc Bras Med Trop,* v.22, n.3, Jul-Sep, p.147-56, 1989.

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

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. **The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 97(5): 603-612, July 2002.

DIAS, J. P.; BASTOS, C.; ARAUJO, E.; MASCARENHAS; A. V., MARTINS NETTO; E., GRASSI, F.; SILVA, M.; TATTO, E., MENDONCA; J., ARAUJO, R. F.; SHIKANAI-YASUDA, M. A.; ARAS, R. **Acute Chagas disease outbreak associated with oral transmission.** Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 41, 296–300, 2008.

DORN, P.L.; PERNICIARO, L.; YABSLEY, M.J.; ROELLIG, D.M.; BALSAMO, G.; DIAZ, J.; WESSON, D. **Autochthonous transmission of *Trypanosoma cruzi*, Louisiana.** Emerg Infect Dis. 13(4):605-7, 2007.

DOS SANTOS P.V.; ROFFÊ E.; SANTIAGO H.C.; TORRES R.A.; MARINO A.P.; PAIVA C.N.; SILVA A.A.; GAZZINELLI R.T.; LANNES-VIEIRA J. **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(12):971-84, 2001.

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

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O.; TEIXEIRA M. M. **The clinical immunology of human Chagas disease.** Trends Parasitol. Dec;21(12):581-7, 2005.

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. **Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity.** Acta Trop., v.81, p.123-32, 2002.

FACTOR, S. M.; SONNENBLICK, E. H. **The pathogenesis of clinical and experimental congestive cardiomyopathies: recent concepts.** Prog. Cardiovasc. Dis., v.27, p.395-420. 1985.

FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J. **Absence of CD4⁺T lymphocytes, CD8⁺T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection.** Antimicrob Agents Chemother. v. 53(1), p. 174-179, 2009.

FERREIRA, V. F.; JORQUEIRA, A.; SOUZA, A. M.; DA SILVA, M. N.; DE SOUZA, M. C.; GOUVÊA, R. M.; RODRIGUES, C. R.; PINTO, A. V.; CASTRO, H. C.; SANTOS, D. O.; ARAÚJO, H. P.; BOURGUIGNON, S. C. **Trypanocidal agents with low cytotoxicity to mammalian cell line: a comparison the theoretical and biological features of lapachone derivatives.** Bioorg Med Chem. 14(16): 5459-5466, 2006.

FRESNO M.; KOPF M.; RIVAS L. **Cytokines and infectious diseases.** Immunol Today. 18(2):56-8,1997.

FUENMAYOR C.; HIGUCHI M.L.; CARRASCO H.; PARADA H.; GUTIERREZ P.; AIELLO V.; PALOMINO S. **Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens.** Acta Cardiol. 60(1):33-7, 2005.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. **Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries.** Acta Tropica 115:22–27, 2010.

GOLGHER, D. & GAZZINELLI, R.T. **Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease.** Autoimmunity.37(5):399-409, 2004.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. **Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immun response.** Infect Immun. 71(3):1185-93, 2003.

GRISOTTO M.G.; D'IMPÉRIO LIMA M.R.; MARINHO C.R.; TADOKORO C.E.; ABRAHAMSOHN I.A.; ALVAREZ J.M. **Most parasite-specific CD8⁺ cells in *Trypanosoma cruzi*-infected chronic mice are down-regulated for T-cell receptor-alpha and CD8 molecules.** Immunology. 102(2):209-17, 2001.

GUEDES, P. M.; VELOSO, V. M.; AFONSO, L. C.; CALIARI, M. V.; CARNEIRO, C. M.; DINIZ, L. F.; MARQUES-DA-SILVA, E. A.; CALDAS, I. S.; DO VALLE MATTA, M. A. SOUZA, S. M.; LANA, M.; CHIARI, E.; GALVAO, L. M.; BAHIA, M. T. **Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase.** Veterinary immunology and immunopathology. v. 130(1-2), p. 43-52, 2009.

GUEDES, P. M.; VELOSO, V. M.; CALIARI, M. V.; CARNEIRO, C. M.; SOUZA, S. M.; LANA, M.; CHIARI, E.; BAHIA, M. T.; GALVÃO, L. M. C. ***Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs.** Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 102(2), p. 141-147, 2007.

GÜRTLER, R.E.; SEGURA, E.L.; COHEN, J. E. **Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* infection in Argentina.** Emerg Infect Dis. 9(1):29-32, 2003.

HARDISON, J.L.; WRIGHTSMAN, R.A.; CARPENTER, P.M.; KUZIEL, W.A.; LANE, T.E.; MANNING, J.E.; **The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*.** Infect Immun. Jan;74 (1):135-43, 2006.

HIGUCHI, M. D.; RIES, M. M.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A.; GUTIERREZ, P. S.; BELLOTTI, G.; PILEGGI, F. **Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis.** Am J Trop Med Hyg. 56(5):485-489, 1997.

HOFT, D. F.; SCHNAPP, A. R.; EICKHOFF, C. S.; ROODMAN, S. T. **Involvement of CD4⁺ Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*.** Infection and immunity. v. 68(1), p. 197-204, 2000.

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.; BROMBACHER, F. **Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase.** Infect.Immun. 66 (3):1208-1215, 1998.

KIERSZENBAUM F. **Autoimmunity in Chagas' disease.** J Parasitol. 72(2):201-11, 1986.

KÖBERLE, F. **Chagas disease and Chagas syndromes: the pathology of American trypanosomiasis.** Advances in Parasitology, 6: 63-116, 1968.

KROLL-PALHARES K.; SILVÉRIO J.C.; SILVA A.A.; MICHAILOWSKY V.; MARINO A.P.; SILVA N.M.; CARVALHO C.M.; PINTO L.M.; GAZZINELLI R.T. LANNES-VIEIRA J. **TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8⁺ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade.** Mem Inst Oswaldo Cruz. 103(4):375-85, 2008.

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

KUMAR, S.; TARLETON, R. L. **Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** Journal of Immunology. 166:4596-4603, 2001.

LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L. E.; PEDROSA, A. L.; CREMA, E.; GALVÃO, L. M. C.; PENA, S. D. J.; MACEDO, A. M.; CHIARI, E. **Variability of Kinetoplast DNA Gene Signatures of *Trypanosoma cruzi* II Strains from Patients with Different Clinical Forms of Chagas' Disease in Brazil.** Journal of Clinical Microbiology, 44:2167-71, 2006.

LAGUENS, R.P.; CABEZA MECKERT, P.; CHAMBO, G.J. E GELPHI, R.J. **Chronic Chagas' disease in the mouse. II. Transfer of the heart disease by means of immunocompetent cells.** Medicina 41: 40-43, 1981b.

LAUCELLA, S. A., M. POSTAN, D. MARTIN, B. HUBBY FRALISH, M. C. ALBAREDA, M. G. ALVAREZ, B. LOCOCO, G. BARBIERI, R. J. VIOTTI, AND R. L. TARLETON. **The frequency of IFN- γ T cells specific for *Trypanosoma cruzi* inversely correlates with disease severity in chronic human Chagas disease.** J. Infect. Dis. 189:909–918, 2004.

LEAVEY J.K; TARLETON R.L. **Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection.** J Immunol. 1;170(5):2264-8, 2003.

LEIBY, D. A.; HERRON, R. M.; READ, E. J. **Trypanosoma cruzi in Los Angeles and Miami blood donors: impact of envolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission.** Transfusion. 42:549-555, 2002.

LEITE M.F.; MOYER, M.S.; ANDREWS, N.W. **Expression of the mammalian calcium signaling response to *Trypanosoma cruzi* in *Xenopus laevis* oocytes.** Mol Biochem Parasitol 92: 1-13, 1998.

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

Lieberman J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. Nat. Rev. Immunol, v. 3, n. 5, p. 361–370.

LIJNEN P.J.; PETROV V.V.; FAGARD R.H. **Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor-beta(1).** Mol Genet Metab. 71(1-2):418-35, 2000.

MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; OLIVEIRA, R. P.; PENA, S. D. J. ***Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the pathogenesis of Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99:1:12, 2004.

MACHADO, A.B.M.; MACHADO, C.R.S.; GOMES, C.G. **Depletion of heart norepinephrine in experimental acute myocarditis caused by *Trypanosoma cruzi*.** Experientia 31: 1202-1203, 1975.

MARINHO, C. R. F.; DIMPERIO LIMA, M. R.; GRISOTO, M. G.; ALVAREZ, J. M. **Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas disease.** Infection and Immunity 67, 308–318, 1998.

MICHAJLOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA L. Q.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. **Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection.** American Journal of Pathology. 159: 1723-1733, 2001.

MINOPRIO, P. **Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches.** Int J Parasitol 31: 588-591, 2001.

MIRKIN G.A; JONES M.; SANZ O.P.; REY R.; SICA R.E.; GONZÁLEZ CAPPA S.M. **Experimental Chagas' disease: electrophysiology and cell composition of the neuromyopathic inflammatory lesions in mice infected with a myotropic and a**

pantropic strain of *Trypanosoma cruzi*. Clin Immunol Immunopathol. 73(1):69-79, 1994.

MIZOGUCHI A.; BHAN A.K. **A case for regulatory B cells.** J Immunol. 15;176(2):705-10, 2006.

MONCAYO, A. **Progress towards Interruption of Transmission of Chagas Disease.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I: 401-404, 1999.

MONCAYO, A., ORTIZ YANINE, M.I. **An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis).** Ann Trop Med Parasitol 100 : 663-67, 2006.

MONCAYO, A.; SILVEIRA, A.C. **Current epidemiological trends for Chagas disease in Latin America and future challenges in epidemiology, surveillance and health policy.** Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Vol. 104 (Suppl. I): 17-30, 2009.

MONTRAN, C. C.; FRETES, R.E.; CERBAN, F.M.; RIVAROLA, H.W.; VOTTERO DE CIMA, E. **Immunization with the C-terminal region of *Trypanosoma cruzi* Ribosomal P1 and P2 proteins induces long-term duration cross-reactive antibodies with heart functional and structural alterations in young and aged mice.** Clin. Immunol. 97:89-94, 2000.

MORRIS, S. A.; TANOWITZ,, H. B. **Pathophysiological insights into the cardiomyopathy of Chagas' disease.** Circulation, v.82, p.1900-9. 1990.

O' GARRA A. **Checkpoints for regulation of development and interferon gamma production by Th1 cells in TCR-transgenic models.** Eur Cytokine Netw, v. 9, n. 3 p. 41-42, 1998.

O'GARRA A, VIEIRA P. **Regulatory T cells and mechanisms of immune system control.** Nat Med. Aug;10(8):801-5, 2004.

PARADA, H.; CARRASCO, H.A.; ANEZ, N.; FUENMAYOR, C.; INGLESSIS, I. **Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study.** Int J Cardiol. 60 (1): 49-54, 1997.

PÉREZ-FUENTES, R.; LÓPEZ-COLOMBO, A.; ORDÓÑEZ-TOQUERO, G.; GOMEZ-ALBINO, I.; RAMOS, J.; TORRES-RASGADO, E.; SALGADO-ROSAS, H.; ROMERO-DÍAZ, M.; PULIDO-PÉREZ, P.; SÁNCHEZ-GUILLÉN, M.C. **Correlation of the serum concentrations of tumour necrosis factor and nitric oxide with disease severity in chronic Chagas disease (American trypanosomiasis).** Annals of Tropical Medicine and Parasitology 101: 123-132, 2007

PETKOVA, S. B.; HUANG, H. **The role of endothelin in the pathogenesis of Chagas' disease.** Int. J. Parasitol., v.31, p.499-511, 2001.

PICCIRILLO C.A.; SHEVACH E.M. **Naturally-occurring CD4⁺CD25⁺ immunoregulatory T cells: central players in the arena of peripheral tolerance.** Semin Immunol. 16(2):81-8, 2004.

PINHO R.T.; VANNIER-SANTOS M.A.; ALVES C.R.; MARINO A.P.; CASTELLO BRANCO L.R.; LANNES-VIEIRA J. **Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infected cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components.** *Acta Trop.* 83(2):103-15, 2002.

PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** *Lancet Infect Dis*, v.1, n.2, Sep, p.92-100, 2001.

PREVIATO J.O.; ANDRADE A.F.; PESSOLANI M.C.; MENDONÇA-PREVIATO L. **Incorporation of sialic acid into *Trypanosoma cruzi* macromolecules. A proposal for a new metabolic route.** *Mol Biochem Parasitol.* 16(1):85-96, 1985.

RAMIREZ, M. I.; RUIZ, M. C.; ARAYA, J. E.; FRANCO DA SILVEIRA, J.; YOSHIDA, N. **Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion.** *Infect. Immun.* 61: 3636-3641, 1993.

RASSI, A. JR.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. **Chagas' Heart Disease.** *Clin. Cardiol.* 23, 883-889, 2000.

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

REIS, D. D.; JONES, E. M. **Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes.** *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v.48, p.637-44, 1993.

REIS, M. M.; HIGUCHI, M. L.; AIELLO, V. D.; BENVENUTI, L. A. **Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy.** *Revista da Soci Bras Med Trop.* 33 (6): 509-18, 2000.

RODRIGUES, C.M.; VALADARES, H. M. S.; FRANCISCO, A. F.; ARANTES, J, M.; CAMPOS, C. F.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.; ARAÚJO, M. S. S.; ARANTES, R. M. E.; CHIARI, E.; FRANCO, G. R.; MACHADO, C. R.; PENA, S. D. J.; FARIA, A. M. C.; MACEDO, A. M. **Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection.** *PLoS Negl Trop Dis.* v. 4, n. 10, p. 1-15.

RODRÍGUEZ A, MARTINEZ I, CHUNG A, BERLOT CH, ANDREWS NW. **cAMP regulates Ca²⁺-dependent exocytosis of lysosomes and lysosome-mediated cell invasion by trypanosomes.** *J Biol Chem.* 11;274(24):16754-9, 1999.

ROPERT, C.; FERREIRA, L.R.; CAMPOS, M. A.; PROCOPIO, D. O.; TRAVASSOS, L. R.; FERGUSON, M.A.; REIS, L.F.; TEIXEIRA, M. M.; ALMEIDA, I. C.; GAZZINELLI, R.T. **Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-**

anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes and infection / Institut Pasteur* v. 4(9), p. 1015-1025, 2002.

ROSSI, M. A. **The pattern of myocardial fibrosis in chronic Chagas' heart disease.** *Int J Cardiol.* 30 (3) :335-40, 1991.

ROTTENBERG M.E.; BAKHIET M.; OLSSON T.; KRISTENSSON K.; MAK T.; WIGZELL H.; ORN A. **Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*.** *Infect Immun.* 61(12):5129-33,1993.

ROTTENBERG, M. E.; RIARTE, A.; SPORRONG, L. **Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8.** *Immunol. Lett.* 45: 53-60, 1995.

ROTTENBERG, M.; CARDONI, R. L.; ANDERSSON, R.; SEGURA, E. L.; ORN, A. **Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection.** *Scandinavian Journal of Immunology*, 28:573-82, 1988.

RUSSO, M.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. **Depletion of L3T4⁺ T lymphocytes during acute *Trypanosoma cruzi* infection abolish macrophage and B lymphocyte activation but not tissue inflammatory reaction.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83:527-538, 1988.

SALES, P. A. JR.; GOLGHER, D.; OLIVEIRA, R. V.; VIEIRA, V.; ARANTES, R. M.; LANNES-VIEIRA, J.; GAZZINELLI, R. T. **The regulatory CD4⁺ CD25⁺ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*.** *Microbes and infection / Institut Pasteur.* v. 10(6), p. 680-688, 2008.

SATHLER-AVELAR R.; LEMOS E.M.; REIS D.D.; MEDRANO-MERCADO N.; ARAÚJO-JORGE T.C.; ANTAS P.R.; CORRÊA-OLIVEIRA R.; TEIXEIRA-CARVALHO A.; ELÓI-SANTOS S.M.; FAVATO D.; MARTINS-FILHO O.A. **Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*.** *Scand J Immunol.* 58(6):655-63, 2003.

SCHAUER R.; REUTER G.; MÜHLPFORDT H.; ANDRADE A.F.; PEREIRA M.E. **The occurrence of N-acetyl- and N-glycoloylneuraminic acid in *Trypanosoma cruzi*.** *Hoppe Seylers Z Physiol Chem.* 364(8):1053-7, 1983.

SCHENKMAN R.P; VANDEKERCKHOVE F; SCHENKMAN S. **Mammalian cell sialic acid enhances invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *Infect Immun.* 61(3):898-902, 1993.

SCHMUNIS, G. A. **Epidemiology of Chagas disease in non-endemic countries: The role of international migration.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.* Oct 30;102 Suppl 1:75-85, 2007.

SCHMUNIS, G. A.; YADON, Z. E. **Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problem.** *Acta Tropica* 115: 14–21, 2010.

SILVERIO J.C.; DE-OLIVEIRA-PINTO L.M.; DA SILVA A.A.; DE OLIVEIRA G.M.; LANNES-VIEIRA J. **Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection.** Int J Exp Pathol. 91(1):72-86, 2010.

SOARES, M.B.P.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. **The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune response meet.** Anais da Academia Brasileira de Ciências 73: 547-559, 2001.

TAFURI, W. L., MARIA, T. A. AND LOPES, E. R. **Myenteric plexus lesions in the esophagus, jejunum and colon of chronic chagasic patients. Electron microscopy study.** Revista do Instituto de Medicina Tropical, 13:76-91, 1971.

TAFURI, W.L. **Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas's disease: light and electron microscopic studies.** Am J Trop Med Hyg 19: 405-417, 1970.

TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L.V. **Chagas' disease.** Clin Microbiol Rev, v.5, n.4, Oct, p.400-19, 1992.

TARLETON, R. L. **Chagas disease: a role for autoimmunity?** Trends Parasitol Oct;19(10):447-51, 2003.

TARLETON, R. L. **Parasite persistence in the etiology of Chagas disease.** International Journal for Parasitology, 31:550-54, 2001.

TARLETON, R. L. **The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections.** Parasitol Today. v. 11(1), p. 7-9, 1995.

TARLETON, R. L. **The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease.** Res Immunol. v. 142(2), p. 130-133, 1991.

TARLETON, R. L.; SUN, J.; ZHANG, L.; POSTAN, M. **Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease.** Infect Immun. 62(5):1820-1829, 1994.

TAYLOR M.J.; HUGHES B.J.; SHARMA R.P. **Dose and time related effects of T-2 toxin on mitogenic response of murine splenic cells in vitro.** Int J Immunopharmacol. 9(1):107-13, 1987.

TODOROV, A. G.; EINICKER-LAMAS, M.; DE CASTRO, S. L.; OLIVEIRA, M. M.; GUILHERME, A. **Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection.** J Biol Chem. 275(41): 32182-32186, 2000.

TOSTES JUNIOR, S.; LOPES, E.R.; PEREIRA, F.E.L.; CHAPADEIRO, E. **Miocardite chagásica crônica humana: estudo quantitativo dos linfócitos T CD4⁺ e dos CD8⁺ no exsudato inflamatório.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 27, p. 127-134, 1994.

TRINCHIERI G. **Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma).** *Curr Opin Immunol.* 9(1):17-23, 1997.

TRZONKOWSKI P.; SZMIT E.; MYŚLIWSKA J.; DOBYSZUK A.; MYŚLIWSKI A. **CD4⁺CD25⁺ T regulatory cells inhibit cytotoxic activity of T CD8⁺ and NK lymphocytes in the direct cell-to-cell interaction.** *Clin Immunol.* 112(3):258-67, 2004.

TYLER, K. M.; ENGMAN, D. M. **The life cycle of *Trypanosoma cruzi* revisited.** *International Journal for Parasitology* 31-472-481, 2002.

VAGO, A. R.; ANDRADE, L. O.; LEITE, A. A.; D'AVILA, R. D.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; TOSTES, J. R.; MOREIRA, M. C.; FILHO, G. B.; PENNA, S. D. **Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs.** *The American Journal of Pathology*, 156:1805–1809, 2000.

VAN VOORHIS W.C.; EISEN H. **FL-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue.** *J Exp Med.* 1;169(3):641-52,1989.

VESPA, G. N.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. **Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro.** *Infect.Immun.* 62 (11):5177-5182, 1994.

VIEIRA, P. M. A.; FRANCISCO, A. F.; MACHADO, E. M. M.; NOGUEIRA, C.; FONSECA, K. S.; REIS, A. B., CARVALHO, A. T.; MARTINS-FILHO, O. A.; TAFURI, W. L.; CARNEIRO, C. M. **Different infective forms trigger distinct immune response in experimental chagas disease.** *PLOS ONE.* 7(3):e32912, 2012.

VIEIRA, P. M. A.; FRANCISCO. A. F.; SOUZA, S. M.; MALAQUIAS, L. C. C.; REIS, A. B.; GIUNCHETTI, R. C.; VELOSO, V. M.; LANA, M.; TAFURII, W. L.; CARNEIRO, C. M. ***Trypanosoma cruzi*: serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in myocardium and spleen of dogs in the acute phase of infection with metacyclic or blood trypomastigotes.** *Experimental Parasitology.* Jan;121(1):76-82, 2009.

VILLALTA, F.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E; KAPPES J. C.; LIMA, M. F. **The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP- α and MIP- β induce trypanocidal activity in human activity in human macrophages via nitric oxide.** *Infect Immunol* 66: 4690-4695, 1998.

WAGHABI, M. C.; COUTINHO, C. M.; SOEIRO, M. N.; PEREIRA, M. C.; FEIGE, J. J.; KERAMIDAS, M.; COSSON, A.; MINOPRIO, P.; VAN-LEUVEN, F.; ARAÚJO-JORGE, T. C. **Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin.** *Infect Immun.* Sep; 70(9):5115-23, 2002.

WOOD J.N.; HUDSON L; JESSELL T.M.; YAMAMOTO M. **A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurones and *Trypanosoma cruzi* parasites.** *Nature*. 296(5852):34-8, 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases,** 2010.

YOSHIDA N.; MORTARA R.A; ARAGUTH M.F; GONZALEZ J.C; RUSSO M. **Metacyclic neutralizing effect of monoclonal antibody 10D8 directed to the 35- and 50-kilodalton surface glycoconjugates of *Trypanosoma cruzi*.** *Infect Immun*. 57(6):1663-7, 1989.

YOSHIDA, N. **Molecular Basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*.** *An Acad Bras Cienc*. 78(1): 87-111, 2006.

YOUNG, C.; LOSIKOFF, P.; CHAWLA, A.; GLASSER, L.; FORMAN, E. **Transfusion-acquired *Trypanosoma cruzi* infection.** *Transfusion*. 47(3):540-4, 2007.

ZAMBRANO-VILLA, S.; ROSALES-BORJAS, D.; CARRERO, J. C.; ORTIZ-ORTIZ, L. **How protozoan parasites evade the immune response.** *Trends in Parasitology*. 18(6): 272-278, 2002.

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