

Kátia da Silva Fonseca

Perfis de inflamação e citocinas no esôfago de cães
experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* se
relacionam à fase da infecção e/ou cepa utilizada

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto - 2011

Kátia da Silva Fonseca

Perfis de inflamação e citocinas no esôfago de cães
experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* se
relacionam à fase da infecção e/ou cepa utilizada

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

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto - 2011

F676p

Fonseca, Kátia da Silva.

Perfis de inflamação e citocinas no esôfago de cães experimentalmente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* se relacionam à fase da infecção e/ou cepa utilizada [manuscrito] / Kátia da Silva Fonseca - 2011.

69f.: il. color.; grafs.; tabs.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Cláudia Martins Carneiro.

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

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Chagas, Doença de - Teses. 2. Esôfago - Teses. 3. Citocinas - Teses. 4. *Trypanosoma Cruzi* - Teses. I. Carneiro, Cláudia Martins. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU: 616.937

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



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

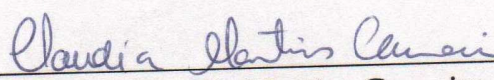


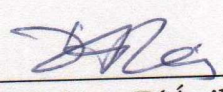
Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

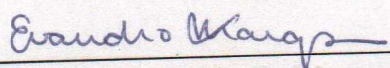
“Perfis distintos de Inflamação e Citocinas no Esôfago de Cães Experimentalmente Infectados pelo *Trypanosoma cruzi* se relacionam à Fase da Infecção e/ou Cepa Utilizada”

Aos 29 dias do mês de agosto de 2011, às 14:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna Kátia da Silva Fonseca. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por *aprovada* 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. Débora D'Ávila Reis
Examinadora (UFMG)


Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 29/08/2011

“No meio da dificuldade encontra-se a oportunidade.”

Albert Einstein

Dedico este trabalho aos meus pais José Fonseca e Maria da Consolação da Silva Fonseca e ao meu irmão Felipe da Silva Fonseca, amores da minha vida, por todo apoio e amor incondicional

À Deus, companheiro desde sempre e para sempre, pela força, coragem e paciência para enfrentar os momentos difíceis.

Aos meus pais José Fonseca e Maria da Consolação da Silva Fonseca por abdicarem de seus sonhos em prol dos meus e pelo amor incondicional. Amo vocês!!

Ao meu irmão Felipe, melhor amigo, por todo apoio, amor e cumplicidade!

À professora Cláudia, a minha eterna gratidão pela oportunidade, confiança, orientação e acima de tudo amizade! Muito obrigada pelo exemplo de profissionalismo e competência!

À Paula, meu anjo da guarda, pela co-orientação, disponibilidade e amizade! Obrigada pelo apoio em todos os momentos, pela ótima convivência e pelos incontáveis ensinamentos.

À Carolzinha, pela disponibilidade, apoio e amizade durante todos estes anos.

À Maria, pelos ensinamentos técnicos histopatológicos e pelo carinho.

À Amandinha, Ju e Nadinha (Flor) pela amizade e apoio em todos os momentos. O trabalho se torna muito mais agradável ao lado de vocês!

À Luiza, pela amizade, ajuda na realização dos experimentos, e por todos os fins de semana no LPC!!

Às professoras Renata, Terezinha e Vanja pela colaboração e apoio.

À Karina e Roberta pela atenção e disponibilidade.

À Thaís, Flávia e Jam pela disponibilidade e amizade durante o desenvolvimento desse trabalho.

À Tânia, pela sensibilidade, carinho e por compreender as minhas mudanças de humor durante os momentos difíceis.

À todos os amigos do LIMP e LPC pela ótima convivência e apoio: Ana, Sheler, Larissa, Lucilene, Phillipe, Samuca e Mi, Bruno, Wendel, Rodrigo, Henrique, Caio, Caroline, Kélvinson, Gleice, Fernando, Levi, Lili, Gisele, Rori, João Paulo, Fábio, Daiane, Lara, Mariana, Edith, Ludmila, Dayane, Marcos, Thalita, Laser, Aline, Natália e Renata.

Aos professores Alexandre Barbosa Reis, Rodolfo Giunchetti e Sandra Moura, pela disponibilidade e amizade.

À Cida pela boa convivência e disponibilidade.

À minha família, por todas as orações e apoio.

À República Hangar, pela união, histórias, irmandade e pelos melhores anos da minha vida.

À República Saideira, pelos ótimos momentos compartilhados e por me permitirem fazer parte desta família!

Aos todos os meus amigos pela torcida e por sempre compreenderem minha ausência.

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, apresenta ampla variabilidade intra-específica e sua interação com o hospedeiro pode resultar no desenvolvimento de diferentes manifestações clínicas, que podem ser relacionadas a determinadas características do parasito e do hospedeiro. Em relação ao hospedeiro, fatores genéticos e imunológicos também podem se relacionar às manifestações patológicas. Dessa maneira a avaliação do perfil de células inflamatórias, bem como de citocinas produzidas por estas, podem permitir uma melhor compreensão da gênese das lesões crônicas, determinando quais fatores direcionam para as distintas formas clínicas da doença. Nesse trabalho, cães da raça *Beagle* foram infectados pelas cepas Y ou Berenice-78 (Be-78), que apresentam tropismo tecidual distinto. Posteriormente estes animais foram necropsiados durante as fases aguda (30 dias após infecção) ou crônica (730 dias após infecção) da doença de Chagas experimental e fragmentos do esôfago foram coletados para quantificação do processo inflamatório, realização de reações imuno-histoquímicas (linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺) e de PCR em tempo real para quantificação das citocinas IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β e iNOS. Na fase aguda o processo inflamatório foi predominantemente mononuclear, significativamente maior nos animais infectados quando comparado aos animais não infectados, com distribuição focal ou difusa nos animais infectados pelas cepas Y e Be-78, respectivamente. Na avaliação imuno-histoquímica, nos cortes histológicos dos animais infectados pelas cepas Y ou Be-78, a maioria das células inflamatórias foram positivas para linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ sendo observados em proporções semelhantes. Entretanto, na fase crônica, o infiltrado inflamatório mostrou-se focal e reduzido em relação à fase aguda, sendo observado apenas nos animais infectados pela cepa Be-78, constituído predominantemente por linfócitos e também com proporções semelhantes das subpopulações de células T. Na fase aguda da infecção também foi observado um aumento na expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ nos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* em relação aos demais grupos. Já na fase crônica houve um aumento na expressão do mRNA das citocinas IL-6, IL-12 e TNF- α e da enzima iNOS nos animais infectados pela cepa Be-78 tanto em relação ao grupo de animais infectados pela cepa Y quanto ao grupo de animais não-infectados. Em relação às citocinas anti-inflamatórias, observou-se um aumento significativo apenas na expressão do mRNA da IL-10 nos animais infectados pela cepa Y em relação ao grupo de animais não-infectados na fase aguda. Na fase crônica da infecção não foi observado aumento de nenhuma das citocinas anti-inflamatórias avaliadas nesse trabalho em ambos os grupos infectados. Portanto, conclui-se que a infecção experimental de cães da raça *Beagle* pelas cepas Y ou Be-78 do *T. cruzi* promove uma resposta inflamatória aguda, predominantemente linfocítica com proporções similares de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ restrita, na fase crônica, à infecção pela cepa Be-78. Além disso, foi observado um perfil distinto de citocinas, sendo que nos animais infectados pela cepa Y a inflamação focal aguda está associada à expressão de citocinas pró-inflamatórias, enquanto que nos animais infectados pela cepa Be-78 a inflamação difusa aguda não está associada à expressão de citocinas pró-inflamatórias, mas evolui para uma inflamação focal crônica associada à expressão destas citocinas, bem como da enzima iNOS.

Trypanosoma cruzi, etiologic agent of Chagas disease, presents a wide intraspecific variability and its interaction with the host may result in the development of clinical manifestations, which may be related to certain characteristics of the parasite and host. In relation to the host, genetic and immunological factors may be related to pathological manifestations. Thus the evaluation of inflammatory cells and cytokines produced by them, may allow a better understanding of the genesis of chronic injuries, determining what factors lead to the different clinical forms of the disease. In this study, Beagle dogs were infected with Y or Berenice-78 (Be-78) strains, which have distinct tissue tropism. Subsequently, these animals were necropsied during the acute phase (30 days after infection) or chronic phase (two years after infection) of experimental Chagas disease and esophagus fragments were collected to perform inflammation quantification, immunohistochemistry to detect T lymphocytes (CD4⁺ and CD8⁺) and real-time PCR for quantification of cytokines IL-6, IL-12, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β , and iNOS. In the acute phase inflammatory process observed was predominantly mononuclear and the quantification of the inflammatory infiltrate demonstrated that it was significantly higher in the infected groups compared to uninfected animals, with focal or diffuse distribution in animals infected by Y and Be-78 strains, respectively. In immunohistochemical analysis tissue sections of animals infected by Y or Be-78 strains, the vast majority of inflammatory cells were positive for CD4⁺ or CD8⁺ and was observed in similar proportions. However, in the chronic phase, the inflammatory infiltrate was focal, showing a reduction when compared to the acute phase and it was observed only in animals infected with Be-78 strain, consisting predominantly of lymphocytes and also with similar proportions of T cells subpopulations. Data analysis revealed that in the acute phase of infection was observed an increase in mRNA expression of proinflammatory cytokines TNF- α and IFN- γ in animals infected with the Y strain of *T. cruzi* compared to the other groups. In the chronic phase there was an increase in mRNA expression of IL-6, IL-12 and TNF- α and iNOS enzyme in animals infected with Be-78 strain in relation to the groups of animals infected with the Y strain and the uninfected animals. Regarding anti-inflammatory cytokines, there was only a significant increase in mRNA expression of IL-10 in animals infected with the Y strain compared to the group of uninfected animals in the acute phase. We did not observe any increase of the anti-inflammatory cytokines evaluated in this work, at the chronic phase of infection, on both infected groups. Thus we may conclude that the experimental infection of Beagle dogs with the Y or Be-78 strains of *T. cruzi* showed that both promote an acute inflammatory response, predominantly lymphocytic with similar proportions of T cells CD4⁺ and CD8⁺, restricted, in the chronic phase of infection, to the Be-78 strain. In addition, there was a distinct profile of cytokines, and the animals infected with the Y strain the focal acute inflammation was associated with expression of proinflammatory cytokines, whereas in animals infected with Be-78 strain the diffuse acute inflammation is not associated with expression of proinflammatory cytokines evolving to chronic focal inflammation associated with expression of these cytokines and iNOS enzyme.

Tabela 1: Sequências dos iniciadores 20

Figura 1: Delineamento experimental das atividades previamente realizadas.....	15
Figura 2: Gel desnaturante de RNA total dos animais na fase aguda.	23
Figura 3: Gel desnaturante de RNA total dos animais na fase crônica.....	23
Figura 4: Delineamento experimental das atividades realizadas neste estudo.....	24
Figura 5: Análise morfométrica do processo inflamatório e semi-quantitativa das subpopulações de linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺) no esôfago de cães <i>Beagle</i> durante as fases aguda ou crônica da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do <i>T. cruzi</i> ..	27
Figura 6: Expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ) no esôfago de cães <i>Beagle</i> durante as fases aguda ou crônica da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do <i>T. cruzi</i> ..	30
Figura 7: Expressão do mRNA da enzima iNOS no esôfago de cães <i>Beagle</i> durante as fases aguda ou crônica da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do <i>T. cruzi</i> ..	31
Figura 8: Expressão do mRNA das citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) no esôfago de cães <i>Beagle</i> durante as fases aguda ou crônica da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do <i>T. cruzi</i> ..	33

Be-78: Berenice-78

Bg: *Beagle*

CD3⁺: Marcador de Superfície Celular de Linfócitos T

CD4⁺: Marcador de Superfície Celular da Subpopulação de Linfócitos T Auxiliares e Monócitos

CD8⁺: Marcador de Superfície Celular da Subpopulação de Linfócitos T Citotóxicos e Células NK

CD20⁺: Marcador de superfície celular de células B

CD68⁺: Marcador de Superfície Celular de Macrófagos

DAB: Diaminobenzidina

DAI: Dias Após a Infecção

DC: Doença de Chagas

DEPC: Dietil-Pirocarbonato

DTU: *Discrete Typing Units*

GFAP: Proteína Acídica Fibrilar da Glia

HE: Hematoxilina-Eosina

ICC: Insuficiência Cardíaca Congestiva

IFN- γ : Interferon Gama

IHQ: Imuno-Histoquímica

IL-10: Interleucina 10

IL-12: Interleucina 12

IL-4: Interleucina 4

IL-6: Interleucina 6

iNOS: Enzima Óxido Nítrico Sintase Induzida

IR: Imunorreativo

KO: Nocaute

MOPS: 3-morfolino-propansulfônico

mRNA: Ácido Ribonucléico Mensageiro

NI: Não-Infectedos

NK: Célula *Natural Killer*

NO: Óxido Nítrico

PCR: Reação em Cadeia da Polimerase

PGP 9.5: Proteína Gene Produzida 9.5

qRT-PCR: Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real

RNA: Ácido Ribonucléico

SMF: Sistema Mononuclear Fagocitário

SNA: Sistema Nervoso Autônomo

TBS-T: Tampão Tris-Salina acrescido de Tween-20

TGF- β : Fator de Crescimento Tumoral Beta

TGI: Trato Gastrointestinal

TIA-1: Antígeno intracitoplasmático de Células T

TNF- α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

1 - Introdução.....	1
1.1 - O <i>Trypanosoma cruzi</i> e a doença de Chagas	2
1.2 - Variabilidade Intraespecífica do <i>Trypanosoma cruzi</i>	3
1.3 - Imunopatologia da doença de Chagas.....	5
1.4 - Envolvimento do Trato Gastrointestinal na doença de Chagas	8
2 - Objetivos	11
2.1 - Objetivo Geral.....	12
2.2 - Objetivos Específicos.....	Erro! Indicador não definido.
3 - Material e Métodos.....	13
3.1 - Atividades previamente realizadas.....	14
3.1.1 - Animais.....	14
3.1.2 - Infecção dos cães	15
3.1.3 - Necropsia, coleta e fixação do material para microscopia óptica	15
3.2 - Atividades realizadas neste estudo.....	16
3.2.1 - Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)	16
3.2.2 - Imuno-histoquímica para detecção das subpopulações de linfócitos T (CD4 ⁺ e CD8 ⁺)	17
3.2.3 - Análise das células TCD4 ⁺ e TCD8 ⁺ no esôfago durante a infecção experimental pelo <i>T. cruzi</i>	19
3.2.4 - Real Time - PCR.....	19
3.2.5 - Análises Estatísticas.....	24
4 - Resultados	25
4.1 - Processo inflamatório e fenótipo celular.....	26
4.2 - Avaliação da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias.....	29
4.3 - Avaliação da expressão de mRNA de iNOS.....	31
4.4 - Avaliação da expressão de mRNA de citocinas anti-inflamatórias	32
5 - Discussão	34
6 - Conclusão	41
7 - Referências Bibliográficas	43

1 - Introdução

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

A doença de Chagas (DC) é causada pelo *Trypanosoma cruzi*, protozoário hemoflagelado pertencente à ordem Kinetoplastida. Esta protozoonose apresenta ampla distribuição nas Américas, que se estende do sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile, e estima-se que 10 milhões de pessoas estejam infectadas (WHO, 2010).

Em relação aos mecanismos de transmissão da DC, destacam-se a via vetorial, a oral, a placentária e a transfusional, sendo que em condições naturais, a primeira representa a mais frequente forma de infecção. Pode-se também observar a transmissão por via congênita e ainda em decorrência de acidentes em laboratórios (Prata, 2001; Cardoso *et al.*, 2006; Coura, 2006).

Após a implantação de medidas para o controle da transmissão vetorial ocorreu um decréscimo significativo na incidência da DC na América Latina (Moncayo & Ortiz Yanine, 2006). Dessa forma, as transmissões alternativas, por transfusão sanguínea e congênita se tornaram mais relevantes na ausência da transmissão vetorial, principalmente nos Estados Unidos e Europa, uma vez que nestes países há um grande número de imigrantes Latino Americanos e o controle dos bancos de sangue, considerando-se a DC, nem sempre é realizado. (Leiby *et al.*, 2002; Young *et al.*, 2007; Gascon *et al.*, 2010).

Os principais hospedeiros invertebrados do *T.cruzi* são insetos hematófagos da subfamília *Triatominae*, conhecidos como “barbeiros”. Estes ingerem a forma tripomastigota sanguínea ao se alimentar com sangue de animais infectados durante seu repasto. No estômago do inseto vetor, estas formas se transformam em epimastigotas (formas não-infectivas) seguindo para o intestino onde se reproduzem por divisão binária. Ao alcançar o reto, as epimastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas metacíclicas que são eliminadas junto às fezes e/ou urina do triatomíneo durante o seu repasto sanguíneo, penetrando pela mucosa lesada e infectando as células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). No hospedeiro vertebrado, as formas metacíclicas se transformam em amastigotas intracelulares, iniciando vários ciclos de multiplicações. Posteriormente, as amastigotas se diferenciam em tripomastigotas, que são liberadas na corrente sanguínea infectando outras células, disseminando a infecção para outros tecidos (Brener, 1987; Andrade & Andrews, 2005).

A infecção pelo *T. cruzi* é caracterizada por duas fases distintas, uma de curta duração, aproximadamente dois a quatro meses, denominada fase aguda, seguida por uma fase de longa duração, a fase crônica, que persiste por toda a vida do hospedeiro.

A fase aguda é caracterizada por elevado parasitismo tecidual, parasitemia patente e processo inflamatório exuberante (Prata, 2001; Franco *et al.*, 2003). Em alguns casos podem ser observados sintomas inespecíficos como febre, mal estar, taquicardia, linfadenopatia, esplenomegalia (Prata, 2001), e crianças e pacientes imunossuprimidos podem apresentar envolvimento cardíaco e encefalomielite durante esta fase, levando a morte do indivíduo (Zhang & Tarleton, 1999).

Já na fase crônica, os níveis de parasitemia tornam-se baixos, uma vez que a multiplicação do parasito é controlada pelo sistema imune do hospedeiro. Nessa fase, três formas clínicas são reconhecidas: assintomática, cardíaca (miocardiopatia chagásica), e digestiva (megacólon e/ou megaesôfago) podendo também ser verificada a forma mista (cardíaca e digestiva). Embora 70% dos indivíduos permaneçam na forma assintomática, cerca de 20 a 35% desenvolvem lesões irreversíveis no sistema nervoso autônomo do coração e sistema digestivo (Moncayo, 2003).

Embora a cardiomiopatia seja a forma clínica sintomática mais comumente observada (Higuchi *et al.*, 2003), manifestações da forma digestiva da DC também podem surgir, sendo que as mais frequentes são o megaesôfago e o megacólon, isoladas ou em associação com a forma cardíaca (Andrade *et al.*, 1999).

1.2 - Variabilidade Intraespecífica do *Trypanosoma cruzi*

Os mecanismos relacionados às manifestações patológicas da DC parecem ser multifatoriais e envolvem tanto características do hospedeiro quanto do parasito (Dutra *et al.*, 2005). Dentre os fatores relacionados ao último pode se destacar a variabilidade das cepas, o tropismo, a antigenicidade e o número de parasitos inoculados (Andrade *et al.*, 1999, Vago, 2000). Já em relação ao hospedeiro destaca-se a faixa etária, o sexo, o estado nutricional, assim como as características genéticas e imunológicas (Pedrosa *et al.*, 1993; Dutra *et al.*, 2005; Brazão *et al.*, 2008).

Sabe-se que o *T. cruzi* pode infectar inúmeras células, como macrófagos, fibroblastos e células musculares (Andrade *et al.*, 2002; Macedo *et al.*, 2004; Andrade & Andrews, 2005). No entanto, a maioria das cepas apresenta preferência por células

musculares (Zhang & Tarleton, 1999) sendo que os órgãos mais afetados são o coração, o esôfago e o cólon, nos quais ocorrem as lesões características das formas cardíaca e/ou digestiva da DC. Brener, em 1965, demonstrou que algumas cepas do parasito, como a cepa Y, possuem predomínio de formas tripomastigotas sanguíneas delgadas e têm tropismo preferencial por células fagocitárias do baço, fígado e medula óssea em camundongos, sendo denominadas de macrofagotrópicas. Entretanto, ele também demonstrou que outras cepas, como a Be-78, possuem prevalência de formas largas e têm tropismo para células musculares lisa, esquelética e cardíaca, denominadas assim de miotrópicas.

Já em 1969, Brener observou que as formas delgadas penetravam nas células mais rapidamente, sendo mais susceptíveis aos mecanismos imunológicos; ao passo que, as formas largas persistiam por um tempo maior no sangue periférico e eram mais resistentes aos mecanismos do sistema imune do hospedeiro, ou seja, as formas largas parecem estar menos adaptadas a penetrar nas células, tendendo a permanecer no sangue, quando comparadas às formas delgadas. Uma vez que apresentam comportamentos biológicos distintos, diferentes cepas têm sido utilizadas em estudos das fases aguda e crônica da doença (Andrade & Magalhães, 1996).

Vários estudos têm sido realizados afim de caracterizar a estrutura populacional do *T. cruzi*, visando definir o número de subgrupos relevantes. Assim, estes subgrupos atualmente são classificados em *Discrete Typing Units* (DTU) onde as cepas do *T. cruzi* são distribuídas em grupos baseados em características moleculares, genéticas e imunológicas: *TcI*, *TcII*, *TcIII*, *TcIV*, *TcV* e *TcVI* (Zingales *et al.*, 2009).

Estudos epidemiológicos demonstram que a distribuição destes grupos do *T. cruzi* varia geograficamente, sendo *TcI* predominante na região norte da América da Sul e na América central, ao passo que *TcII*, *III*, *IV* e *VI* são encontradas principalmente no sul da América do Sul (Zingales *et al.*, 1998; Virreira *et al.*, 2006).

Diferentes populações de parasitos têm sido associadas às diferentes formas clínicas da doença (Vago *et al.*, 2000), indicando que as populações geneticamente distintas possuem diferentes tropismos teciduais que podem ser, em parte, responsáveis pelas distintas formas clínicas (Macedo *et al.*, 2004; Sathler-Avelar *et al.*, 2009). A linhagem *TcI* é associada à cardiomiopatia, enquanto a forma digestiva é principalmente atribuída ao *TcII* (Zingales *et al.*, 1998; Virreira *et al.*, 2006).

No entanto, a presença de parasitos geneticamente semelhantes em indivíduos com diferentes manifestações patológicas da DC, permite sugerir que a resposta

imunológica do hospedeiro tem papel fundamental no desenvolvimento das diferentes formas clínicas (Dutra *et al.*, 2009; Sathler-Avelar *et al.*, 2009).

A autoimunidade e a manutenção do parasitismo tecidual deixaram de ser teorias opostas e se tornaram complementares (Soares *et al.*, 2001). Estudos demonstraram que a persistência do parasito parece ser fundamental para a manutenção de um processo inflamatório capaz de provocar lesões teciduais (Tarleton & Zhang, 1999; Lages-Silva *et al.*, 2001; Da Silveira *et al.*, 2005), no entanto o mimetismo antigênico do *T. cruzi* pode provocar uma resposta imune contra células do próprio hospedeiro, de forma que também parece estar relacionado à patogênese das lesões (Cunha-Neto & Kalil, 1995; Leon *et al.*, 2004).

1.3 - Imunopatologia da doença de Chagas

A resistência do hospedeiro durante a DC experimental depende tanto da imunidade inata quanto da adquirida, sendo necessária a atuação de células de defesa, como as células *Natural Killer* (NK), células T CD4⁺, T CD8⁺ e células B (Rottenberg *et al.*, 1988; Russo *et al.*, 1988; Aliberti *et al.*, 1996; Corbett *et al.*, 2001). Em consequência, o parasito é persistentemente combatido, ocorrendo uma redução na sua multiplicação. No entanto, este pode permanecer por tempo indeterminado no hospedeiro, assim como a atividade imunológica com consequente lesão tecidual e alterações histológicas e/ou funcionais (Tarleton, 2001).

As células NK são importantes na defesa contra a disseminação da infecção pelo *T. cruzi* (Brener & Gazzinelli, 1997), promovendo a imunidade celular inata, com liberação da citocina IFN- γ . No entanto, sua atividade não se restringe à produção de citocinas, uma vez que estas células também apresentam atividade citotóxica podendo variar de acordo com a subpopulação (Sondegard *et al.*, 2000). Rottenberg *et al.* (1988) e Cardillo *et al.* (1996) observaram que a depleção das células NK resultam em parasitemia e mortalidade aumentadas em camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*. Já Lieke *et al.* (2004) demonstraram que a depleção das células NK antes da infecção resulta no aumento da parasitemia, enquanto o parasitismo tecidual não é alterado.

Os macrófagos também apresentam função essencial no controle da infecção. A fagocitose mediada por estas células ativa a produção de citocinas inflamatórias, como

IL-12 e TNF- α , contribuindo para a produção de IFN- γ por células NK. Esta produção permite a redução da parasitemia, favorece a diferenciação de linfócitos T em células Th1, produtoras de IFN- γ e, juntamente com o TNF- α , auxilia a ativação de macrófagos que irão produzir óxido nítrico (NO), molécula microbicida com papel fundamental no controle da replicação do parasito na fase aguda da infecção (Kumar & Tarleton, 2001; Michailowsky *et al.*, 2001).

Em relação às células B, Cardillo *et al.*, em 2007, demonstraram que estas possuem importante papel durante a fase aguda da DC, visto que camundongos deficientes em células B apresentaram menor porcentagem de células T CD8⁺ ativadas e de memória no baço e no infiltrado inflamatório no músculo esquelético. Não obstante, observou-se que em camundongos nocaute (KO) para células B a área do infiltrado inflamatório era menor e o número de ninhos intactos de parasitos, maior.

Os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ estão relacionados tanto aos mecanismos imunorregulatórios quanto à gênese das lesões teciduais durante a infecção experimental ou humana pelo *T. cruzi*. Rottenberg *et al.* (1995) e Gonçalves da Costa *et al.* (2002) confirmaram que na ausência de células CD4⁺ (auxiliares) ocorre uma redução da resposta imunológica do hospedeiro e, conseqüentemente, um aumento do parasitismo tecidual, o que ocorre provavelmente devido a produção de citocinas como o IFN- γ e o TNF- α pelos linfócitos T CD4⁺, promovendo a ativação dos macrófagos e a proliferação dos linfócitos T CD8⁺ e B. Ferraz *et al.* (2009) demonstraram que camundongos nocaute (KO) para linfócitos T CD4⁺ e para linfócitos T CD8⁺, são altamente susceptíveis a infecção pelo *T. cruzi*, permitindo sugerir que a ampliação da resposta imune tem grande importância para o controle da infecção por este parasito.

No infiltrado inflamatório de pacientes com cardiopatia chagásica, as células T CD8⁺ (citotóxicas) são a maioria em relação às células T CD4⁺ (Higuchi *et al.*, 1993). Estas, segundo Muller *et al.* (2003) são responsáveis pela eliminação da célula infectada, através da produção da citocina IFN- γ , granzimas e perforinas. Além disso, contribuem no controle do parasitismo na fase aguda da infecção, uma vez que ativam mecanismos de transdução do sinal em macrófagos, com ativação da enzima iNOS e conseqüente produção de NO (Aliberti *et al.*, 1996; Martin & Tarleton, 2004; Borges *et al.*, 2009).

No entanto, Silvério *et al.* (2010) observaram que camundongos nocautes para linfócitos T CD8⁺, mas expressando perforina, apresentaram lesões e disfunções

cardíacas com menor intensidade, demonstrando que essas células poderiam ser também responsáveis por dano aos cardiomiócitos, favorecendo o desenvolvimento de lesões no tecido muscular cardíaco. Além disso, Caliri *et al.* (2002) e Leavey & Tarleton (2003) também observaram a participação das células T CD8⁺ na gênese das lesões cardíacas de fase crônica.

As citocinas possuem papel fundamental no controle da replicação do parasito e na resposta imune em animais infectados. No entanto, a migração de leucócitos para o local da infecção após a entrada do parasito depende não só da produção destas, mas também de quimiocinas, assim como, aumento da expressão dos seus receptores e das moléculas de adesão.

Acreditava-se que a produção de citocinas pro-inflamatórias era a única responsável pelo controle da infecção e eliminação do parasito (Hoft *et al.*, 2000; Ferraz *et al.*, 2009). Entretanto, Silva *et al.* (1992) e Holscher *et al.* (1998) observaram que por meio da produção de citocinas como a IL-10 e a IL-4, ocorre o controle do processo inflamatório de forma a evitar a exacerbação das lesões teciduais. Dessa forma, o balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é um fator relevante na patogênese da DC (Dutra *et al.*, 1997; Gomes *et al.*, 2003).

Durante a fase aguda da infecção, a produção de citocinas pró-inflamatórias, responsáveis pela ativação de macrófagos e diferenciação e proliferação de linfócitos TCD8⁺, é necessária para limitar a multiplicação do parasito em pacientes chagásicos (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998; 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 (inflamatórias).

Estudos em modelos experimentais têm demonstrado a ocorrência de destruição de células ganglionares adjacentes à ruptura de ninhos de parasitos e a atuação do NO como um importante mediador no dano neuronal durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. A principal fonte de NO durante a resposta inflamatória, é derivada da ativação da iNOS, enzima que tem sua expressão aumentada devido ao estímulo por IFN- γ e TNF- α , e bloqueada pela ação de citocinas como a IL-4 e IL-10 que inibem desta forma a produção de NO (Köberle *et al.*, 1963; Ribeiro *et al.*, 2008).

O TGF- β , importante regulador da inflamação, quando em baixas concentrações, tem efeito pró-inflamatório e, em altas concentrações, efeitos anti-inflamatórios de forma a permitir um equilíbrio entre o controle do parasito e a lesão tecidual exacerbada

(Savino *et al.*, 2007; Araújo-Jorge *et al.*, 2008). Quando produzido durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, em camundongos, inibe os efeitos do IFN- γ sobre os parasitos intracelulares, interferindo no controle natural da infecção (Golgher *et al.*, 2004; Teixeira *et al.*, 2006).

Segundo Truysens *et al.* (1994) e Chandrasekar *et al.* (1996), a IL-6, citocina pro-inflamatória importante na defesa contra patógenos, tem sua expressão aumentada após infecção pelo *T. cruzi*. Gao & Pereira (2002) observaram que camundongos deficientes em IL-6 eram muito mais susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi*, uma vez que apresentaram maiores parasitemias e morreram antes dos camundongos selvagens. De acordo com este trabalho, existem duas possíveis explicações para a alta susceptibilidade dos camundongos deficientes em IL-6 à infecção pelo *T. cruzi*. Na primeira delas, as células T IL-6^{-/-} parecem produzir quantidade significativa de IL-4 após ativação (Ohshima *et al.*, 1998; Samoilova *et al.*, 1998). Além disso, tem sido relatado, que a IL-6 pode ativar células endoteliais permitindo o aumento da migração de linfócitos para outros tecidos além dos linfóides (Watson *et al.*, 1996).

1.4 - Envolvimento do Trato Gastrointestinal na doença de Chagas

A forma digestiva da DC pode ocorrer isolada ou em associação com a forma cardíaca (ANDRADE *et al.*, 1999). Sendo que a incidência desta no Brasil varia entre 2 a 8,8% da população infectada (Coura, 1985; Dias, 1983, Macedo, 1976)

Hipertrofia muscular e aumento do lúmen, caracterizam a lesão chagásica no trato gastrointestinal (TGI), sendo que microscopicamente podem ser observados infiltrados inflamatórios com predomínio de células mononucleares nas camadas musculares, ganglionites e periganglionites. (Köberle, 1968 e 1970; Tafuri, 1971; Nascimento *et al.*, 2010). Estas alterações ocorrem em função das lesões no sistema nervoso autônomo intramural, presença de parasitos e ação do sistema imune (Tafuri, 1970; Tafuri, 1987), e estão presentes em cerca de 15% dos pacientes na fase crônica da doença, em áreas endêmicas (Prata, 2001; Peñaranda-Carrillo *et al.*, 2006; Batista *et al.*, 2010).

Uma redução no número de neurônios, é frequentemente observada em pacientes crônicos com a forma digestiva da doença (Adad *et al.*, 1991 e 2001), sendo o

megaesôfago associado a uma perda de aproximadamente 85% dos neurônios, e o megacólon 50% (Köberle, 1968).

Na fase aguda da DC, o *T. cruzi* pode ser responsável pelas lesões no sistema nervoso uma vez que a carga parasitária é alta. Já na fase crônica da infecção a carga parasitária é baixa e observa-se frequentemente a presença de ganglionites e periganglionites em indivíduos com megas, o que permite sugerir a participação do sistema imune na gênese das lesões chagásicas (da Silveira *et al.*, 2005).

Embora as lesões teciduais observadas na fase crônica da doença tenham relação direta com a resposta inflamatória, pouco se sabe a respeito da resposta imune relacionada ao desenvolvimento do megaesôfago na DC.

Estudos realizados em pacientes com megaesôfago demonstraram a presença de infiltrado inflamatório, composto basicamente de linfócitos, macrófagos e mastócitos associados à fibras musculares e neurônios. A análise imuno-histoquímica demonstrou a presença de linfócitos T CD3⁺ e células T CD68⁺ e T CD4⁺, sendo que as últimas estavam presentes em número maior quando comparadas a subpopulação de CD8⁺. Além disso, todos os pacientes chagásicos com megas apresentaram denervação associada com inflamação, enquanto pacientes sem megas apresentaram ou não denervação, na ausência de inflamação indicando que o processo inflamatório está diretamente relacionado ao desenvolvimento desta patologia (Corrêa-Oliveira *et al.*, 1999).

D'Avila Reis *et al.* (2001) observaram que no megaesôfago chagásico, os infiltrados inflamatórios são compostos de linfócitos T CD3⁺, macrófagos e linfócitos B, sendo que parte das células do infiltrado inflamatório nas camadas musculares expressam TIA-1, proteína encontrada em linfócitos T citotóxicos e células NK. Já no cólon de pacientes portadores de megacólon, estudos demonstraram a presença de células NK, indicando a participação destas no prosseguimento do processo inflamatório da fase crônica (Corbett *et al.*, 2001).

Com relação ao papel do parasito no desenvolvimento dos processos inflamatórios crônicos e/ou na denervação, estudos utilizando a reação em cadeia de polimerase (PCR) demonstraram a presença de kDNA do parasito no esôfago de 100% e 77% dos pacientes com megaesôfago, respectivamente (Vago *et al.*, 1996; Lages-Silva *et al.*, 2001), e em apenas 50% dos pacientes sorologicamente positivos sem megaesôfago (Vago *et al.*, 2003), o que permite sugerir uma associação entre

desenvolvimento do megaesôfago e a persistência do parasito na fase crônica (Da Silveira *et al.*, 2005).

Trabalho realizado pelo nosso grupo em esôfago e cólon de cães *Beagle* infectados pelas cepas Y e Be-78 demonstrou que na fase crônica, apenas o grupo de animais infectados pela cepa Be-78 apresentou parasitismo tecidual e somente nos animais infectados pela cepa Y foi observada fibrose. A denervação dos gânglios mientéricos foi observada na infecção com ambas as cepas durante a fase aguda, entretanto na fase crônica a denervação foi persistente somente nos animais infectados pela cepa Be-78. Com relação às células gliais, o comprometimento das mesmas foi precoce nos animais infectados pela cepa Y enquanto os animais infetados pela cepa Be-78 apresentaram redução de células gliais entéricas apenas na fase crônica (Nogueira, 2011). Visto que as alterações mais significativas foram encontradas no esôfago destes animais e existem poucos trabalhos na literatura sobre o papel da resposta imune no megaesôfago, torna-se importante o estudo das células inflamatórias e as citocinas produzidas pelas mesmas neste órgão ao longo da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

2 - Objetivos

2.1 - Objetivo

Avaliar o perfil do processo inflamatório e de citocinas no esôfago de cães da raça *Beagle* durante as fases aguda e crônica da infecção com formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y ou Berenice-78 do *T. cruzi*.

3 - Material e Métodos

3.1 - Atividades previamente realizadas

Este trabalho utilizou amostras biológicas coletadas durante a execução do projeto “Correlação entre a gênese de lesões cardíacas e a resposta imune em cães da raça *Beagle* infectados experimentalmente com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*”, fruto de uma colaboração entre a Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP) e a Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), coordenado pelos professores Maria Terezinha Bahia e Egler Chiari, respectivamente. A manutenção destes animais no Canil da UFOP, a infecção, eutanásia e coleta das amostras foram executadas no período de 2004 a 2006 pelos doutores Paulo Marcos da Matta Guedes e Vanja Maria Veloso durante o desenvolvimento de suas teses de doutorado e todos os procedimentos das etapas de execução experimental do projeto foram realizados de acordo com o Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA). Este estudo contou com o auxílio fundamental de diversos alunos de iniciação científica, em especial Ivo Santana Caldas, Geovan Crepalde e Lívia Figueiredo. As amostras biológicas coletadas durante a necropsia atualmente pertencem ao arquivo de tecidos do Laboratório de Imunopatologia (NUPEB/UFOP).

3.1.1 - Animais

Vinte e quatro cães da raça *Beagle* foram obtidos e mantidos no canil da UFOP. Esses animais receberam tratamento prévio com anti-helmínticos e imunização com a vacina Vanguard[®] HTLP 5/CV-L Laboratório Pfizer LTDA, contra Parvovirose, Cinomose, Leptospirose canina, Coronavírus, Adenovírus Tipo 2 e Parainfluenza. Todas as atividades realizadas estavam de acordo com o preconizado pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Os animais foram alocados em três grupos experimentais com oito animais em cada: I) grupo não infectado (NI); II) grupo infectado pela cepa Y (Y) e III) grupo infectado pela cepa Berenice-78 (Be-78), cada grupo foi dividido em dois subgrupos com quatro animais para análise nas fases aguda e crônica.

3.1.2 - Infecção dos cães

Aos 120 dias de idade, os cães foram inoculados com 4×10^3 formas tripomastigotas sanguíneas das cepas Y ou Be-78, por kg de massa corporal pela via intraperitoneal. As formas sanguíneas foram obtidas de camundongos *Swiss* infectados com as diferentes cepas e mantidos no Centro de Ciência Animal da UFOP.

3.1.3 - Necropsia, coleta e fixação do material para microscopia óptica

Os animais foram eutanasiados no 30^o e 730^o dia após a infecção (DAI) com 0,5 mL/Kg de massa corporal de tiopental sódico (0,03g/ml de solução salina 0,8%), por via endovenosa. Durante a necropsia foram coletados fragmentos de esôfago que foram fixados em formol a 10% tamponado (pH 7.2).

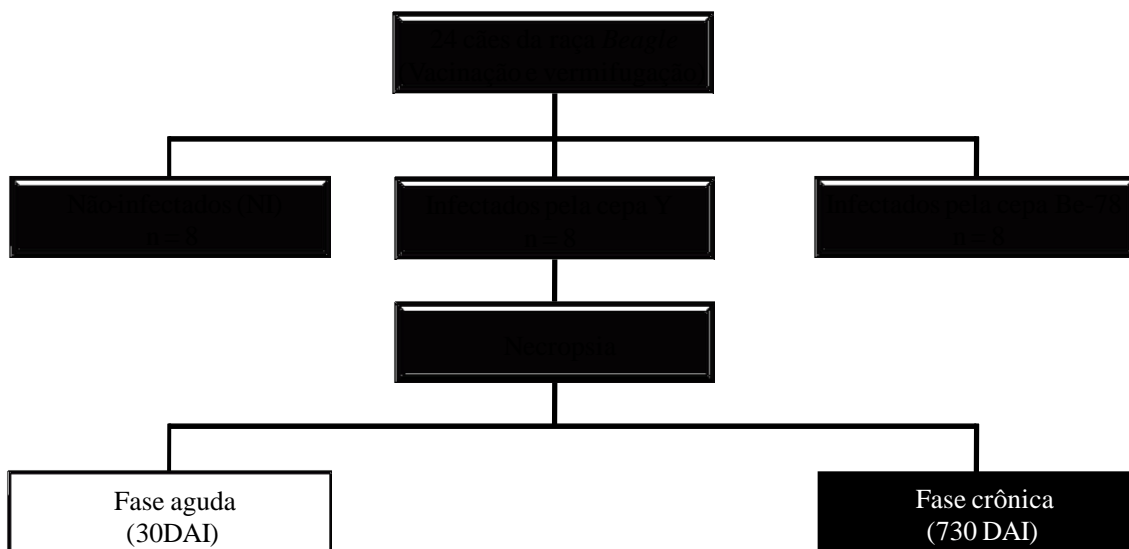


Figura 1: Delineamento experimental das atividades previamente realizadas. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados pela cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados pela cepa Berenice-78; DAI: dias após a infecção.

3.2 - Atividades realizadas neste estudo

Foi retirado um segmento da amostra de esôfago previamente fixada em formol 10% tamponado e processado conforme a técnica descrita a seguir para tecidos em parafina. As amostras de esôfago foram desidratadas em concentrações crescentes de álcool (70, 80, 90 e 100%), diafanizadas em dois banhos de xilol, e embebidas em parafina. Após o processamento, foram incluídas em parafina. Os blocos obtidos foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes histológicos com espessura de quatro μm submetidos à coloração de Hematoxilina e Eosina (HE), para quantificação do processo inflamatório e à reação de imuno-histoquímica para marcação de células TCD4⁺ e CD8⁺.

3.2.1 - Coloração Hematoxilina-Eosina (HE)

Os cortes foram desparafinizados 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, por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (200 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e outra vez lavados em água corrente para evitar excesso de acidificação. Em seguida, foram corados pela Eosina, por 30 segundos. Após a última lavagem em água corrente, foram desidratados, em dois banhos de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e montados com lamínula e Entellan.

Para avaliação do processo inflamatório as células inflamatórias foram quantificadas separadamente na submucosa e muscular, sendo 10 imagens (campos) aleatórias em cada uma das camadas, totalizando uma área percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. As imagens foram visualizadas pela objetiva de 40x e digitalizadas através da microcâmera Leica DFC340FX associada ao microscópio Leica DM5000B e todas as imagens foram analisadas pelo software de análise e processamento de imagem Leica QwinV3 no Laboratório Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto. O processo inflamatório foi determinado pela diferença significativa ($p < 0,05$) entre o número de núcleos celulares presentes nos

animais infectados pelo *T. cruzi* e aquele observado nos animais não-infectados \pm desvio padrão (MALTOS *et al.*, 2004; CALIARI, 1997).

3.2.2 - Imuno-histoquímica para detecção das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺)

A imuno-histoquímica aplicada neste trabalho utilizou o sistema ARK™ (Animal Research Kit, K3954, Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), conjugado com a enzima peroxidase. Este sistema minimiza a reatividade do anticorpo secundário com imunoglobulinas endógenas que podem estar presentes nas amostras.

Foram utilizados anticorpos primários monoclonais anti-cão (VMRD, Inc. PO Box 502, Pullman, WA 99163 USA) produzidos em camundongo, os quais foram diluídos em diluente com componentes redutores de *background* (DakoCytomation, USA), nas seguintes proporções: linfócitos T CD4⁺ (DH29A) 1:500 e linfócitos T CD8⁺ (CADO46A) 1:500. Nas lâminas referentes ao controle negativo, adicionou-se apenas o diluente do anticorpo.

Os cortes histológicos obtidos por microtomia foram estendidos em lâminas de vidro, previamente silanizadas, e permaneceram durante 24 horas em estufa a 56°C, para melhor fixação dos mesmos. Posteriormente, foram imersos em três banhos de xilol (durante 15 minutos/cada) para retirada da parafina. Em seguida, foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 90%, 80% e 70%, durante cinco minutos em cada) e água.

Após hidratação, foram imersos em Tampão Tris-Salina acrescido de Tween-20 (TBS-T, cinco minutos). Procedeu-se então a recuperação dos sítios antigênicos, com imersão dos cortes histológicos em tampão fosfato/citrato pH 6,0 (20 minutos) em panela a vapor. Posteriormente, os cortes foram retirados e deixados à temperatura ambiente (30 minutos), ainda imersos em tampão fosfato/citrato, para que fosse realizado um resfriamento progressivo dos mesmos, evitando assim que ocorresse um choque térmico e eles se soltassem das lâminas. Na sequência, as lâminas foram imersas em três banhos de TBS-T (cinco minutos cada).

Foi realizado, então, o bloqueio da peroxidase endógena com a imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio a 30% em álcool metílico, em temperatura ambiente (30 minutos), seguido de três banhos com TBS-T (cinco minutos cada).

Antes da aplicação do anticorpo primário sobre os cortes, o mesmo é marcado usando o reagente de biotinição, uma versão modificada do anticorpo secundário biotinilado. O anticorpo primário e o reagente de biotinição são misturados em solução, resultando na ligação do anticorpo secundário biotinilado ao anticorpo primário. O reagente de bloqueio, contendo soro normal de camundongo, em seguida, é adicionado a essa mistura.

Os cortes foram então incubados *overnight* com os anticorpos primários ligados à biotina, em câmara úmida (2–8°C) e posteriormente receberam três banhos em TBS-T (cinco minutos cada). Adicionou-se o complexo estreptoavidina-peroxidase, permanecendo as lâminas incubadas neste complexo à temperatura ambiente (15 minutos), sendo em seguida imersas em três banhos de TBS-T (cinco minutos cada).

A marcação celular foi revelada pela ação da enzima peroxidase, agindo sobre o seu substrato 3,3'-diaminobenzidina (DAB), formando um precipitado marrom sobre a célula que contém o epítipo alvo da marcação do anticorpo primário, usado na imunomarcação. Para isso, realizou-se uma mistura de DAB e solução tampão contendo peróxido de hidrogênio e conservante. Os cortes foram imersos nesta solução (cinco minutos) à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas ficaram (cinco minutos) imersas em água corrente com o objetivo de bloquear a ação da enzima peroxidase. Para contraste, utilizou-se Hematoxilina de Harris (oito segundos) e novamente os cortes foram imersos em água corrente (cinco minutos), seguido pela imersão em álcool absoluto, levados a estufa de secagem (56°C) e montados com Entelan entre lâmina e lamínula.

Durante o procedimento da técnica, em cada bateria foram utilizados como controle positivo e negativo dois cortes histológicos do esôfago de *Beagle* infectado pela cepa Y do *T. cruzi* anteriormente utilizado no processo de padronização das reações, no qual se observou marcação positiva para as células em estudo.

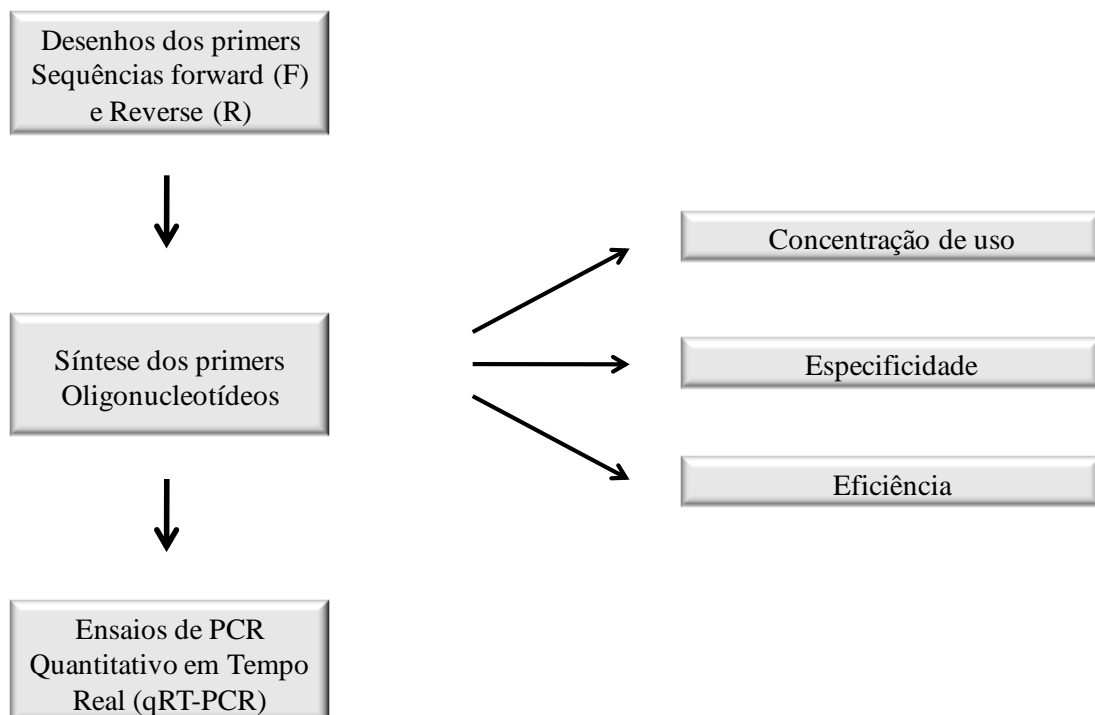
3.2.3 - Análise das células TCD4⁺ e TCD8⁺ no esôfago durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

A análise semi-quantitativa das células TCD4⁺ e TCD8⁺ nos cortes histológicos do esôfago submetidos à imuno-histoquímica foi realizada nas camadas submucosa e muscular por três avaliadores. Os resultados foram expressos de acordo com Wünschmann *et al.* (1999) em: - = ausência de células marcadas, + = discreto número de células marcadas, ++ = moderado número de células marcadas e +++ = acentuado número de células marcadas.

3.2.4 - Real Time - PCR

3.2.4.1 - Sequência dos iniciadores

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



Todas as etapas citadas acima, que antecedem os ensaios de qRT-PCR, são necessárias e foram cuidadosamente seguidas, garantindo a qualidade dos resultados. Segue abaixo, a tabela (Tabela 1) com a sequência dos iniciadores utilizados.

Tabela 1: Sequências dos iniciadores

Gene	Sequência de nucleotídeos (5'-3')	Função
18s	F: GTGGTATTGAGGAAAGCAG R: CAGTCAGGGATCTTATACT	Constitutivo
IFN- γ	F: TCAACCCCTTCTCGCCACT R: GCTGCCTACTTGGTCCCTGA	Citocina
TNF- α	F: CGTCCATTCTTGCCCAAAC R: AGCCCTGAGCCCTTAATTC	Citocina
IL-6	F: CCTGGTGATGGCTACTGCTT R: ACTATTTGAAGTGGCATCATCCT	Citocina
IL-12p40	F: CAGCAGAGAGGGTCAGAGTGG R: ACGACCTCGATGGGTAGGC	Citocina
IL-4	F: CACCTCCCAACTGATTCCAA R: CTCGCTGTGAGGATGTTCAA	Citocina
IL-10	F: AGAACCACGACCCAGACATC R: CCACCGCCTTGCTCTTATTC	Citocina
TGF- β	F: AGGATCTGGGCTGGAAGTG R: CGGGTTGTGCTGGTTGTA	Citocina
iNOS	F: GCCCTGTGCCTCGGATAATC R: CCACGGAAGAAGTTAAAGTTG	Enzima

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

Na etapa de extração do RNA total, foram utilizadas quantidades de tecidos do esôfago com o peso estimado entre 20-40 mg. As amostras após serem retiradas do freezer -80 °C, foram imediatamente imersas em um mL de TRIzol® Reagent (Invitrogen São Paulo, SP, Brasil) contido dentro de um tubo de 1,5 mL 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 tubos de 1,5 mL e incubado por 30 minutos à temperatura ambiente para permitir a completa dissociação dos complexos de nucleoproteínas. Foram então adicionados 0,2 mL de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA) para cada 1,0 mL de TRIzol® Reagent nos tubos contendo o homogeneizado e 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 x g em microcentrífuga (Centrífuga 5418, Eppendorf, Hamburg, Alemanha) à 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 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 12.000 x g 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, foram adicionados 200 µL de “SV DNase Stop Solution” para inibição da atividade enzimática da DNase. O tubo foi então centrifugado a 12.000 x g por 2 minutos e o líquido contido no tubo coletor descartado. Foram adicionados então 600 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) e realizada a centrifugação por 12.000 x g por 2 minutos. Adicionou-se então, 250 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) seguido de centrifugação a 14.000 x g por 3 minutos. Posteriormente, o *spin* foi transferido para um tubo de eluição e adicionou-se 100 µL de água livre de nucleasse, seguido centrifugação a 12.000 x g por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas imediatamente a -80°C até o momento do uso.

3.2.4.3 - Quantificação e avaliação do grau de pureza do RNA total extraído

As amostras de RNA extraídas foram dosadas no equipamento Nanovue® (GE Healthcare, Reino Unido) utilizando 2 µL de RNA e o grau de pureza em relação à

presença de proteínas, foi avaliado utilizando a relação dos valores de absorvância obtidos á 260 e 280 nm. As amostras que apresentaram absorvância 260/280 nm acima de 1,8 foram consideradas com um grau de pureza satisfatório. O grau de contaminação por fenol foi avaliado pela absorvância a 320 nm.

3.2.4.4 - Integridade do RNA extraído

A separação eletroforética das amostras de RNA total foi realizada em gel de agarose em condições desnaturantes e específicas para RNA, seguindo o seguinte protocolo: em um primeiro frasco (frasco 1), 0,6 g de agarose foi fundida em 40 mL de água (tratada com DEPC) utilizando micro-ondas convencional para aquecimento; em um segundo frasco (frasco 2), foi adicionado 12,8 mL de água (tratada com DEPC), 6 mL de tampão MOPS 10X (3-morfolino-propansulfônico) e 1,2 mL de formaldeído (Sigma). Quando a temperatura do frasco 1 atingiu em torno de 45° (palpável), esse foi adicionado ao frasco 2. Após a homogeneização, a solução foi vertida sobre o aparato de eletroforese com pente apropriado e aguardado aproximadamente 40 minutos para completa solidificação. Paralelamente, foi preparado o tampão de amostra contendo 93,75 µL de formamida (Sigma), 13,75 µL de formaldeído, 18,75 µL de MOPS 10X, 21 µL de água (tratada com DEPC), 0,25 µL de azul de bromofenol (100 mg/mL) e 0,25 µL de brometo de etídio (Sigma). Foram utilizados 5 µg das amostras de RNA para 10 µL de tampão de amostra e incubado por 5 minutos a 65°C (desnaturação do RNA) seguido de banho de gelo por três minutos. Posteriormente, as amostras foram aplicadas no gel e corridas a 90 V em tampão MOPS 1X. Todo material foi previamente autoclavado e limpo com RNAaway® (Invitrogen) e a cuba era exclusiva para RNA, evitando contaminação por RNAses que poderiam comprometer a integridade do RNA durante o processo de separação eletroforética. As amostras consideradas adequadas para avaliação dos níveis de transcritos de RNAm foram as que apresentavam bandas íntegras referentes as subunidades 28S e 18S do RNA ribossomal. Os géis desnaturantes referentes às amostras de RNA utilizados nesse estudo estão mostrados nas Figuras 2 e 3.

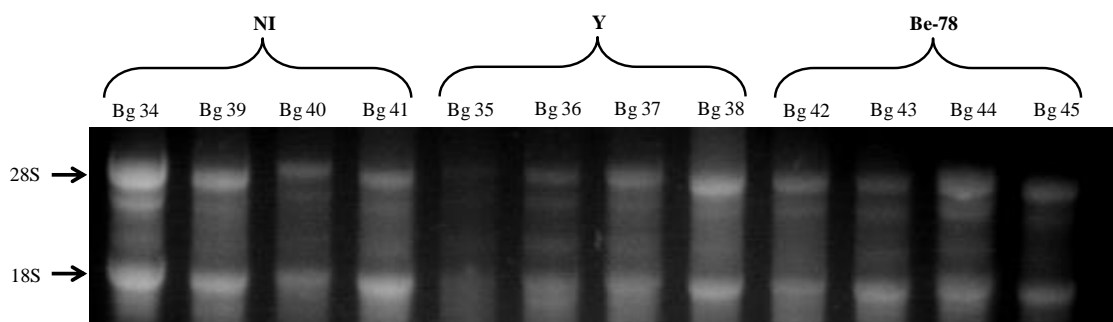


Figura 2: Gel desnatuante de RNA total dos animais na fase aguda. Na figura é possível visualizar bandas íntegras referentes às subunidades ribossômicas 18S e 28S das amostras de RNA total extraídas das amostras de cães na fase aguda utilizados neste estudo.

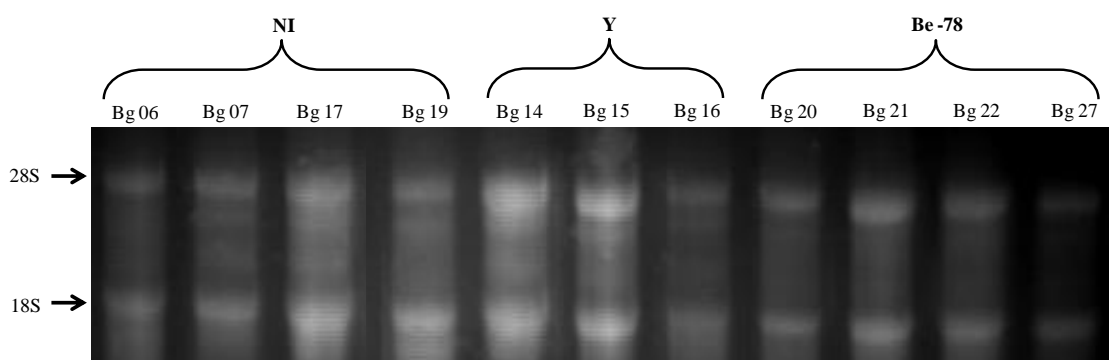


Figura 3: Gel desnatuante de RNA total dos animais na fase crônica. Na figura é possível visualizar bandas íntegras referentes às subunidades ribossômicas 18S e 28S das amostras de RNA total extraídas das amostras de cães na fase crônica utilizados neste estudo.

3.2.4.5 - 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, adicionou-se 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 TC312 Techne (Analítica), 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 desta etapa, 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.

3.2.4.6 - Detecção dos níveis de citocinas e receptores por qRT-PCR

O ensaio para avaliar a expressão gênica de citocinas e receptores nas amostras de esôfago de cão, foi realizado utilizando três μL dos iniciadores (iniciadores) na concentração de 100 nM, cinco μL de SYBR™ Green, dois μL de cDNA diluído 5x com água livre de DNase, perfazendo um volume final de 10 μL de reação.

O ensaio foi realizado em triplicata para todos os genes, com o constitutivo presente na mesma placa que os genes avaliados. Os resultados foram expressos pelo método $2^{-\Delta\text{Ct}} = 2^{-(\text{Ct Gene alvo} - \text{Ct 18s})}$.

3.2.5 - Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 4.03 (Prism Software, Irvine, CA, USA).

Para avaliação estatística da expressão gênica das citocinas entre os grupos foi realizada análise de variância (ANOVA one-way) seguida pelo teste de comparações múltiplas de Tukey. A análise da diferença entre as fases aguda e crônica de um mesmo grupo foi realizada através do *Test T de Student*. Foram consideradas significativas as diferenças entre médias com valores de $p < 0,05$.

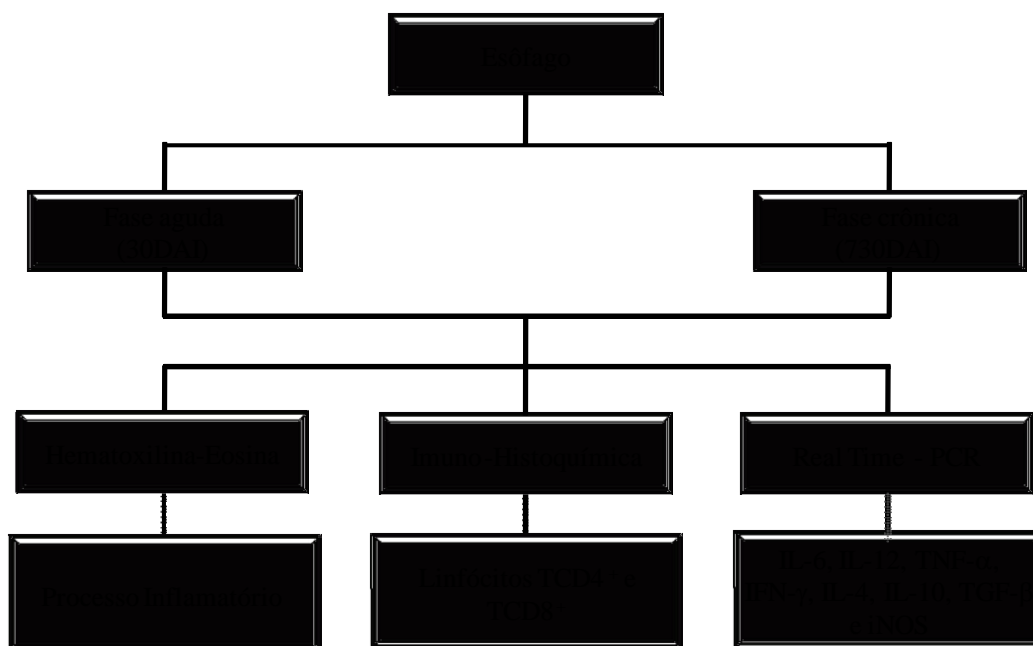


Figura 4: Delineamento experimental das atividades realizadas neste estudo. DAI: dias após infecção.

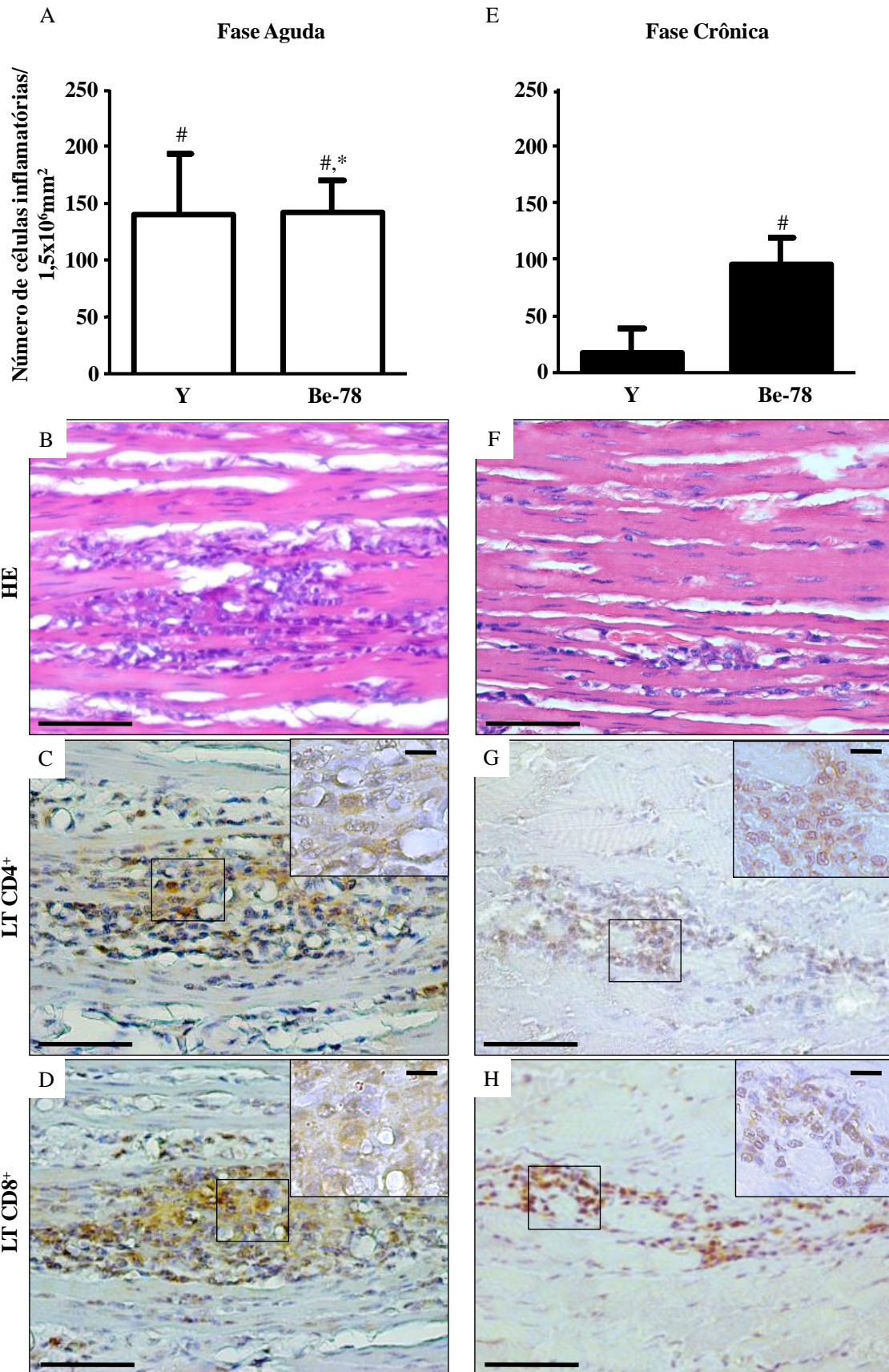
4 - Resultados

4.1 - Processo inflamatório e fenótipo celular

Na fase aguda o processo inflamatório foi quantificado nos cortes histológicos esofágicos corados pela HE sendo observado infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, significativamente maior nos animais infectados (Figura 5A) quando comparado aos animais do grupo NI, com distribuição focal ou difusa nos animais infectados pelas cepas Y (Figura 5B) e Be-78, respectivamente. Na avaliação imunohistoquímica, nos cortes histológicos dos animais do grupo NI não foram identificados linfócitos T ($CD4^+$ ou $CD8^+$) sendo todas as amostras analisadas classificadas como ausência de células marcadas (-). Entretanto, nos grupos infectados pelas cepas Y (Figuras 5C e D) ou Be-78, um moderado número de células, nos focos inflamatórios ou difusamente distribuídas, mostrou-se marcada para CD4 ou para CD8, porém, em proporções semelhantes.

Na fase crônica, o infiltrado inflamatório mostrou-se focal e reduzido em relação à fase aguda, sendo observado apenas nos animais infectados pela cepa Be-78 (Figuras 5E e F) e constituído predominantemente por linfócitos. Em relação às reações imunohistoquímicas, também foi possível observar que um moderado número de células dos focos inflamatórios mostrou-se marcada para CD4 ou para CD8, também em proporções semelhantes (Figuras 5G e H) e representando praticamente a totalidade das células do infiltrado.

Figura 5: Análise morfométrica do processo inflamatório e semi-quantitativa das subpopulações de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺) no esôfago de cães *Beagle* durante as fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do *T. cruzi*. A e E: análise morfométrica do processo inflamatório agudo e crônico, respectivamente. B: cortes histológicos corados por HE, demonstrando o processo inflamatório agudo e focal nos animais do grupo Y. F: cortes histológicos corados por HE, demonstrando a persistência do processo inflamatório na fase crônica nos animais do grupo Be-78. C e G: cortes histológicos corados por imuno-histoquímica para detecção de linfócitos T CD4⁺ em animais infectados pela Cepa Y na fase aguda e Be-78 na fase crônica. D e H: cortes histológicos corados por imuno-histoquímica para detecção de linfócitos T CD8⁺ em animais infectados pela Cepa Y na fase aguda e Be-78 na fase crônica. Y: grupo de animais infectados pela cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados pela cepa Berenice-78. “#” indica diferença significativa entre os grupos infectados e os animais não-infectados durante a fase aguda ou crônica, e o asterisco indica diferença significativa entre as fases aguda e crônica. Barra = 50µm, Insert Barra = 10µm.



4.2 - Avaliação da expressão de mRNA de citocinas pró-inflamatórias

A expressão de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ foi avaliada quantitativamente pela técnica de qRT-PCR e os resultados estão apresentados na Figura 6.

A análise dos dados revelou que na fase aguda da infecção, não houve aumento na expressão do mRNA das citocinas IL-6 e IL-12 em ambos os grupos infectados. Entretanto, foi observado um aumento na expressão do mRNA de TNF- α e IFN- γ nos animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* em relação aos demais grupos.

Já na fase crônica houve um aumento na expressão do mRNA de IL-6, IL-12 e TNF- α nos animais infectados pela cepa Be-78 tanto em relação ao grupo de animais infectados pela cepa Y quanto ao grupo de animais não-infectados.

Além disso, a comparação entre as fases aguda e crônica de um mesmo grupo demonstrou um aumento no mRNA de IL-6 e IL-12 nos animais infectados pela cepa Be-78 na fase crônica em relação a fase aguda. Para os animais do grupo Y foi observado um aumento significativo do mRNA de TNF- α na fase aguda em relação a fase crônica.

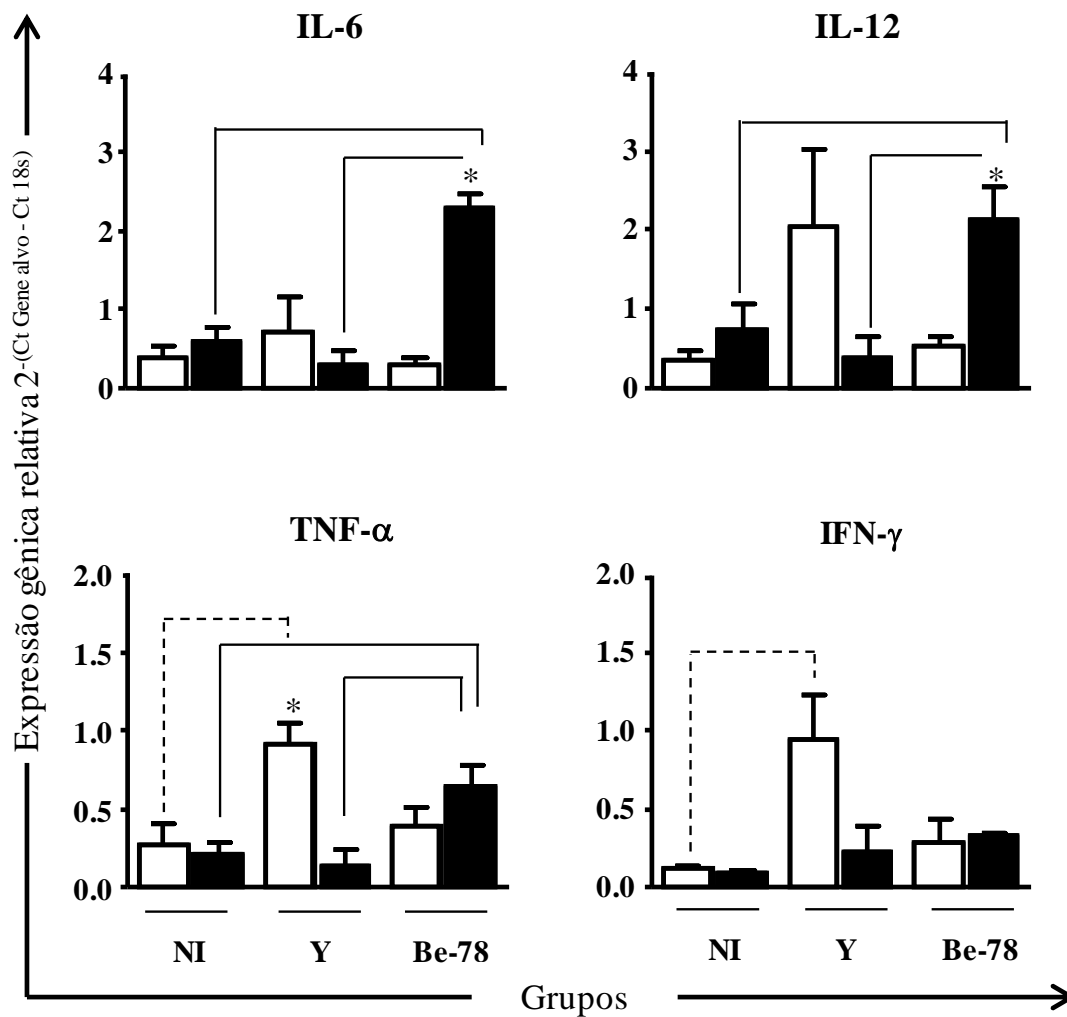


Figura 6: Expressão do mRNA de citocinas pró-inflamatórias (IL-6, IL-12, TNF- α e IFN- γ) no esôfago de cães *Beagle* durante as fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do *T. cruzi*. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados pela cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados pela cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre as fases aguda e crônica.

4.3 - Avaliação da expressão de mRNA de iNOS

A expressão de mRNA da enzima iNOS foi avaliada quantitativamente pela técnica de qRT-PCR e o resultado está apresentado na Figura 7.

Foi observado um aumento na expressão do mRNA da iNOS nos animais infectados pela cepa Be-78 quando comparado aos animais dos grupos NI e Y na fase crônica.

Além disso, observou-se um aumento na expressão gênica desta enzima na fase crônica em relação a fase aguda nos animais infectados pela cepa Be-78.

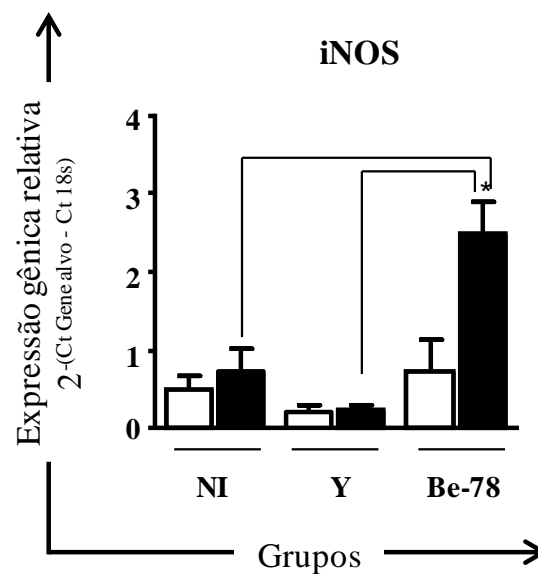


Figura 7: Expressão do mRNA da enzima iNOS no esôfago de cães *Beagle* durante as fases aguda (□) ou crônica (■) da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do *T. cruzi*. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados pela cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados pela cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre as fases aguda e crônica.

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

A expressão de mRNA para as citocinas anti-inflamatórias IL-4, IL-10 e TGF- β foi avaliada quantitativamente pela técnica de qRT-PCR e os resultados estão apresentados na Figura 8.

Na fase aguda não foram observadas diferenças significativas na expressão gênica relativa das citocinas IL-4 e TGF- β . Em relação à citocina IL-10, observou-se um aumento significativo na expressão do seu mRNA nos animais infectados pela cepa Y em relação ao grupo de animais não-infectados.

Na fase crônica não foram encontradas diferenças significativas para a expressão de mRNA das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β .

Somente nos animais infectados pela cepa Y foi observado um aumento na fase aguda para a expressão de mRNA de IL-10 quando comparado a fase crônica.

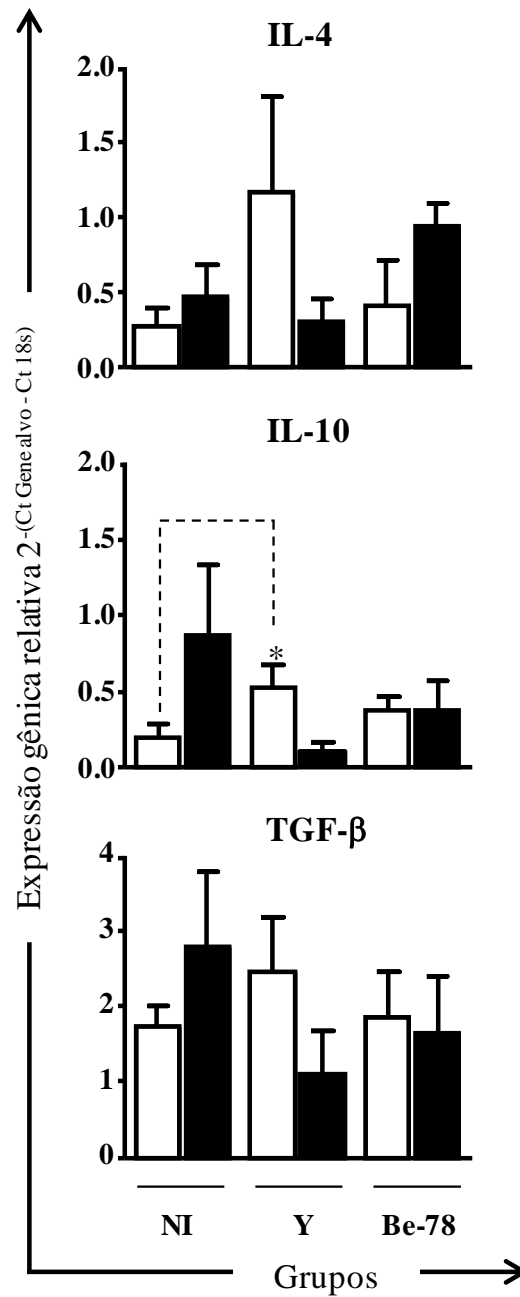


Figura 8: Expressão do mRNA das citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e TGF- β) no esôfago de cães *Beagle* durante as fases aguda (■) ou crônica (□) da infecção experimental pelas cepas Y ou Berenice-78 do *T. cruzi*. NI: grupo de animais não-infectados; Y: grupo de animais infectados pela cepa Y; Be-78: grupo de animais infectados pela cepa Berenice-78. As linhas conectoras tracejadas indicam diferenças significativas entre os grupos durante a fase aguda, as linhas conectoras inteiras indicam diferenças significativas entre os grupos durante fase crônica e o asterisco indica diferença significativa entre as fases aguda e crônica.

Os aspectos clínicos, parasitológicos, imunológicos e histopatológicos observados durante as fases aguda e crônica da DC no modelo cão são muito semelhantes àqueles observadas em humanos, tendo sido demonstrado o desenvolvimento da forma cardíaca fibrosante bem como da insuficiência cardíaca congestiva (Andrade & Andrade, 1980; Tafuri, *et al.*, 1988; Lana *et al.*, 1988; Lana *et al.*, 1992; Andrade *et al.*, 1997), sugerindo que este modelo experimental é o ideal para estudos sobre a imunopatogênese da doença, principalmente em relação às lesões cardíacas (Andrade & Andrade, 1980; Andrade *et al.*, 1984; Tafuri *et al.*, 1988; Lana *et al.*, 1988; Lana *et al.*, 1992; Guedes *et al.*, 2002; Bahia *et al.*, 2002; Guedes *et al.*, 2007). No entanto, estudos sobre o envolvimento do sistema digestório neste modelo são escassos.

Köeberle (1957) observou a forma digestiva da doença em cães naturalmente infectados, mas não relatou se houve apenas dilatação ou realmente hipertrofia. Entretanto, Machado *et al.* (2001) não observaram a presença de infiltrado inflamatório na camada muscular e no plexo nervoso intramural do TGI na infecção experimental crônica em cães. Além disso, a maioria dos trabalhos realizados em cão avaliou apenas a denervação dos gânglios, sendo importante o estudo sobre a participação de fenômenos inflamatórios, bem como células e citocinas produzidas pelas mesmas.

Neste estudo, o envolvimento do esôfago foi analisado ao longo das fases aguda e crônica da DC experimental em cães *Beagle* infectados com duas cepas do *T. cruzi* (Y e Be-78) que apresentam características morfológicas e biológicas distintas. Durante a fase aguda foi observado que ambas as cepas induziram resposta inflamatória moderada, porém significativa em relação aos animais não-infectados, demonstrando assim que ambas as cepas utilizadas nesse trabalho são capazes de causar um processo inflamatório esofágico no modelo cão ao longo da fase aguda. Esses dados corroboram com os resultados obtidos por Santos (1998) que também observou inflamação esofágica durante a fase aguda da infecção de cães pela cepa Be-78 do *T. cruzi*. Além disso, resultado semelhante foi observado por Veloso (2007), que ao avaliar o coração destes mesmos animais, durante a fase aguda, constatou que os cães *Beagle* infectados pelas cepas Y ou Be-78 apresentaram uma resposta inflamatória significativa em relação aos animais não infectados.

Entretanto, durante a fase crônica apenas os animais infectados pela cepa Be-78 apresentaram inflamação no esôfago. Veloso (2007) avaliando cortes histológicos cardíacos desses mesmos animais também observou infiltrado inflamatório crônico

apenas nos animais inoculados pela cepa Be-78, sendo observado um padrão principalmente focal, semelhante ao observado no esôfago.

Além disso, no esôfago destes mesmos cães observou-se uma redução da área PGP 9.5-IR durante a fase aguda, provavelmente devido à inflamação induzida pela infecção com ambas às cepas, no entanto o processo de denervação foi mantido na fase crônica apenas nos animais infectados pela cepa Be-78, o que pode estar associado à manutenção do processo inflamatório apenas nesses animais (Nogueira, 2011).

Muitos autores têm relacionado lesões do SNA a um processo inflamatório adjacente (Andrade & Andrade, 1966; Tafuri & Brenner, 1967; Tafuri, 1970; 1971). Neste trabalho foi observada com frequência a presença de infiltrados linfocitários associados à gânglios, o que corrobora com Caliari *et al.* (1996) que observaram durante a fase aguda, no esôfago de cães experimentalmente infectados pela cepa Be-78 miosite, periganglionite e ganglionite.

Características biológicas como a infectividade *in vitro* e o polimorfismo das formas tripomastigotas sanguíneas do *T. cruzi* parecem influenciar o aparecimento de alterações anatomopatológicas nos hospedeiros.

Estudos realizados por Guedes *et al.* (2007) revelaram que a cepa Y apresenta 91% de formas delgadas, enquanto que a cepa Be-78 é constituída predominantemente por formas largas (90%). Brener (1965) observou que as taxas de mortalidade foram maiores nos animais infectados pelas cepas constituídas predominantemente por formas delgadas quando comparadas àquelas constituídas por formas largas ou muito largas sugerindo que o resultado da infecção pode estar relacionado ao predomínio de uma forma sobre a outra. Não obstante, foi descrita elevada infectividade *in vitro* para a cepa Y, predomínio de formas delgadas e baixa infectividade para a cepa Be-78, com predomínio de formas largas (Brener *et al.*, 1976; Bertelli *et al.*, 1977; Bertelli & Brener, 1980; Guedes, 2007).

Além disso, trabalhos utilizando o cão como modelo experimental mostraram que a cepa Be-78 apresenta pico de parasitemia mais tardio em relação à cepa Y, e ainda, que os animais infectados pela cepa Y são capazes de controlar a parasitemia mais rapidamente que aqueles infectados pela cepa Be-78 (Carneiro *et al.*, 2007; Veloso *et al.*, 2008). Sendo assim, é de se esperar que o processo inflamatório persista por um período maior nos animais infectados pela cepa Be-78, como observado nesse trabalho, onde durante a fase crônica apenas nesses animais ainda foi observado a presença de células inflamatórias, o que poderia estar relacionado ao controle mais tardio da

parasitemia nesses animais. Além disso, o parasitismo tecidual esofágico foi observado apenas nos animais infectados por essa cepa (Nogueira, 2011).

Tendo em vista que ambas as cepas utilizadas neste trabalho induziram processo inflamatório esofágico predominantemente linfocítico, esperava-se que fosse observada uma maior proporção de linfócitos TCD8⁺ em relação aos TCD4⁺. No entanto, a análise do perfil fenotípico dessas células revelou proporções similares entre as duas subpopulações nos animais avaliados durante a fase aguda para ambas as cepas e na fase crônica apenas para os animais infectados pela cepa Be-78, onde ocorreu a persistência do infiltrado inflamatório.

Caliari *et al.* (2002) ao avaliarem o coração de cães infectados pelo *T. cruzi* observaram um predomínio de linfócitos TCD8⁺ (58%) em relação aos TCD4⁺ (42%). Resultado semelhante também foi constatado por Souza (2009) no coração de cães infectados, sendo verificado um percentual de 62% de linfócitos T CD8⁺ e 19% de linfócitos T CD4⁺.

Corbett *et al.* (2001) ao estudarem o cólon de pacientes chagásicos com megacólon, observaram que os linfócitos T são as células mais abundantes na reação inflamatória e que os linfócitos TCD8⁺ representam mais da metade do número total de linfócitos, além de estarem associados à degeneração de células ganglionares. Já em relação ao esôfago, D'Avila Reis *et al.* (2001) observaram que os infiltrados inflamatórios associados à camada muscular apresentavam predominantemente linfócitos CD3⁺ (72-93%), seguido por macrófagos (6-29%) e linfócitos B CD20⁺ (1-4%), sendo que 1-35% das células do infiltrado apresentavam TIA-1 proteína presente em linfócitos citotóxicos e células NK, indicando que estas células poderiam estar envolvidas na patogênese do megaesôfago.

Da Silveira *et al.* (2005) quantificaram células NK CD57⁺, linfócitos citotóxicos TIA-1⁺ no plexo mioentérico do esôfago de pacientes chagásicos com e sem megaesôfago. Células NK e linfócitos citotóxicos foram observados em pacientes com megaesôfago e também, em pequena proporção, em pacientes sem megaesôfago, mas com processo inflamatório e perda neuronal.

Entretanto, vale a pena ressaltar que apesar de proporções semelhantes de células TCD4⁺ e TCD8⁺ terem sido observadas, sabe-se que estas populações celulares em órgãos linfóides de cães normais representam cerca de 30% e 70%, respectivamente, de linfócitos CD8⁺ e CD4⁺ (Caliari *et al.*, 2002). Portanto, a equivalência observada nos

animais infectados sugere um aumento na proliferação de células T CD8⁺. Além disso, estas células funcionalmente podem estar relacionadas à produção de citocinas distintas.

Na resposta inflamatória, o papel das citocinas na susceptibilidade e resistência à infecção pelo *T. cruzi* ainda não foi totalmente elucidado. No entanto, dados da literatura demonstram que na DC citocinas inflamatórias são essenciais durante a fase aguda da infecção (Bahia-Oliveira *et al.*, 1998, 2000; Cunha-Neto *et al.*, 2009) e são produzidas em níveis elevados na fase crônica, possivelmente pela exposição ao parasito por um longo período (Ribeirão *et al.*, 2000; Abel *et al.*, 2001; Ferreira *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004). Neste sentido, torna-se importante o estudo não apenas das células presentes no infiltrado inflamatório, como também das citocinas que as mesmas estariam produzindo.

Neste trabalho foi demonstrado que na fase aguda da infecção, animais infectados pela cepa Y do *T. cruzi* apresentaram um aumento na expressão do mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ em relação aos demais grupos. Guedes *et al.* (2007) observaram que os padrões mais graves de alterações anatomopatológicas cardíacas foram observados nos cães *Beagle* infectados pela cepa Y, que apresentaram alta infectividade *in vitro* e elevados níveis de parasitemia. A ausência ou a presença de discretas alterações anatomopatológicas cardíacas foram observadas nos animais infectados pela cepa Be-78, que apresentou baixa infectividade *in vitro* e baixos níveis de parasitemia. Assim, pode-se inferir que o aumento de citocinas inflamatórias na fase aguda não foi observado nos animais infectados pela cepa Be-78 provavelmente porque esta cepa age de forma silenciosa, apresentando menor parasitemia e, possivelmente, menor parasitismo tecidual, de maneira que o sistema imune não detecta a presença do mesmo imediatamente.

Neste trabalho, observou-se aumento na expressão de IFN- γ nos animais infectados pela cepa Y durante a fase aguda da infecção, mas não foi observado aumento na expressão da enzima iNOS nestes mesmos animais. Sabe-se que o IFN- γ é uma citocina protetora, especialmente na fase aguda da infecção, uma vez que possui capacidade de ativar a expressão da iNOS permitindo a produção do NO (Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Machado *et al.*, 2000), portanto esperava-se que a expressão do mRNA de iNOS também estivesse aumentada. No entanto, este aumento não foi observado provavelmente devido ao aumento na expressão da citocina anti-inflamatória IL-10 que poderia estar inibindo os efeitos do IFN- γ , regulando a atividade dos

macrófagos ao bloquear sua ativação, como observado por Silva *et al.* (1992), que mostraram a produção de IL-10 por camundongos geneticamente susceptíveis e que a mesma pode impedir a função antiparasitária dos IFN- γ (Gazzinelli *et al.*, 1992).

Na fase crônica, observou-se no presente trabalho aumento na expressão de mRNA das citocinas IL-6, IL-12 e TNF- α nos animais infectados pela cepa Be-78 em relação aos demais grupos. Sabe-se que a IL-12, assim como o TNF- α são importantes na ativação de macrófagos e conseqüente aumento na expressão de iNOS e produção de NO (Vespa *et al.*, 1994; Alibert *et al.*, 1996; Bahia-Oliveira *et al.*, 2000; Borges *et al.*, 2009). Neste sentido, os dados deste trabalho estão em concordância com a literatura, uma vez que houve também um aumento na expressão do mRNA da iNOS nos animais infectados pela cepa Be-78 quando comparado aos animais dos grupos NI e Y.

Esperava-se que o IFN- γ também estivesse aumentado, uma vez que este é fundamental na ativação de macrófagos e aumento da expressão de iNOS, entretanto este aumento não foi observado. Segundo Rottenberg *et al.* (1996), foi observado iNOS co-localizado com parasitos em tecidos infectados pelo *T. cruzi* e KO para o receptor de IFN- γ , sugerindo uma via de indução de iNOS independente do IFN- γ , podendo ser esta a explicação para um aumento de iNOS não relacionado ao aumento desta citocina.

Considerando que o NO está envolvido no processo de denervação, uma vez que a inibição da síntese deste radical livre está diretamente relacionada à redução da lesão neuronal (Garcia *et al.*, 1999; Arantes *et al.*, 2004) e ainda que nos animais avaliados nesse trabalho (Nogueira, 2011) a denervação durante a fase crônica foi persistente apenas no grupo de animais infectados pela cepa Be-78 quando comparado ao grupo de animais infectados pela cepa Y pode-se sugerir que, o aumento de iNOS está também diretamente relacionado ao processo de denervação observado nestes mesmos animais.

A citocina TGF- β é produzida durante a primeira semana após a infecção e constantemente ao longo das fases aguda e crônica (Zhang & Tarleton, 1996). Nos locais de inóculo do *T. cruzi* o TGF- β é produzido por macrófagos e fibroblastos infectados e ainda liberado pelas plaquetas recrutadas para o local da infecção (Araujo-Jorge *et al.*, 2008). Uma vez que os animais infectados pela cepa Y utilizados neste estudo apresentaram neoformação de colágeno durante a fase crônica da doença (Nogueira 2011), esperava-se aumento na expressão do mRNA desta citocina nos animais infectados por esta cepa. No entanto, não foram encontradas diferenças

significativas para a expressão do TGF- β entre os grupos estudados, tanto na fase aguda quanto na crônica.

Portanto, comparando o perfil patogênico das duas cepas utilizadas nesse estudo, observa-se resposta inflamatória limitada à fase aguda da infecção pela cepa Y, com produção de citocinas pró-inflamatórias e de IL-10, provavelmente relacionadas ao controle da infecção e regulação da ativação de macrófagos, respectivamente, reduzindo a lesão tecidual. Dessa forma, conclui-se que a infecção pela cepa Y leva ao controle precoce da lesão, o que está de acordo com dados obtidos por Nogueira (2011) nestes mesmos animais que relataram na infecção por esta cepa o desenvolvimento precoce de alterações e um processo de cicatrização com neorformação de colágeno já aos dois anos de infecção. Além disso, o processo de denervação e a redução dos componentes enterogliais GFAP-IR causado por esta cepa são significativos apenas na fase aguda. Estes dados são consistentes também com o controle mais precoce da parasitemia (Veloso *et al.*, 2008) e do parasitismo tecidual (Nogueira, 2011).

Já no esôfago dos animais infectados pela cepa Be-78, observa-se um padrão diferente de resposta inflamatória, uma vez que esta se iniciou na fase aguda e persistiu até a fase crônica, na qual havia presença de um processo inflamatório focal, com produção de citocinas pró-inflamatórias e da enzima iNOS o que resulta em lesões progressivas do TGI ao longo da DC. Além disso, as alterações consequentes da infecção pela cepa Be-78 foram mantidas ao longo da infecção experimental, sendo o parasitismo esofágico e a inflamação ainda observados nesta fase (Nogueira, 2011).

6 - Conclusão

A infecção experimental de cães da raça *Beagle* pelas cepas Y ou Be-78 do *T. cruzi* mostrou que ambas promovem uma resposta inflamatória aguda, predominantemente linfocítica com proporções similares de linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ restrita, na fase crônica, à infecção pela cepa Be-78.

Verificou-se um perfil distinto de inflamação e citocinas:

- inflamação focal aguda acompanhada pelo aumento na expressão de citocinas pró-inflamatórias e ausência de inflamação na fase crônica, associada à ausência de alteração da expressão de citocinas nos animais infectados pela cepa Y.

- inflamação difusa aguda sem alteração na expressão de citocinas pró-inflamatórias que evoluiu para inflamação focal crônica acompanhada pelo aumento na expressão destas citocinas, bem como da enzima iNOS nos animais infectados pela cepa Be-78.

7 - Referências Bibliográficas

ABEL, L.C.; RIZZO, L.V.; IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E.A.; TEIXEIRA, H.C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHANETO, E. **Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection.** Journal of Autoimmunity, 17(1):99-107, 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, 33:443-50, 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, 438:254-58, 2001.

ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.A.G.; MARTINS, G.A.; GAZZINELI, 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.

ANDRADE, L.O. & ANDREWS, N.W. **The *Trypanosoma cruzi*-host cell interplay: location, invasion, retention.** Nature Reviews. Microbiology, 3:819-23, 2005.

ANDRADE, L.O.; MACHADO, C.R.S.; CHIARI, E.; PENA, S.D.J.; MACEDO, A.M. **Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice.** Molecular and Biochemical Parasitology, 100:163-72, 1999.

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

ANDRADE, S.G. & ANDRADE, Z.A. **Doença de Chagas e alterações neuronais no plexo de Auerbach. Estudo experimental em camundongos.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 8:219-24, 1966.

ANDRADE, S.G & MAGALHÃES, J.B. **Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 30:27-35, 1996.

ANDRADE, Z.A. & ANDRADE, S.G. **A patologia da doença de Chagas experimental no cão.** Memórias Instituto Oswaldo Cruz, 75:77-95, 1980.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. **Damage and healing in the conduction tissue of the heart (an experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*).** The journal of pathology, 143:93-101, 1984.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, G.; WENTHOLD-JR, R.J.; HILBERT, S.L.; FERRANS, V.J. **The indeterminate phase of Chagas' Disease:**

ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 57:328-36, 1997.

ANDRADE, L. O., MACHADO, C. R. S., CHIARI, E., PENA, S. D. J., MACEDO, A. M. **Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice.** Molecular and Biochemical Parasitology, 100:163–172, 1999.

ARANTES, R.M.; MARCHE, H.H.; BAHIA, M.T.; CUNHA, F.Q.; ROSSI, M.A.; SILVA, J.S. **Interferon-gama induced nitric oxide causes intrisec intestinal denervation in *Trypanosoma cruzi*-infected mice.** The American Journal of Pathology, 164(4): 1361-8, 2004.

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

BAHIA, M.T.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V.; VELOSO, V.M.; CARNEIRO, C.M.; GEORGE, L.L.M.C.; LANA, M. **Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes.** Revista da Sociedade de Medicina tropical, 35(4):339-45, 2002.

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

BAHIA-OLIVEIRA, L.M.G.; GOMES, J.A.S.; CANÇADO, J.R.; FERRARI, T.C.; LEMOS, E.M.; LUZ, Z.M.P.; MOREIRA, M.C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. **Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.** The Journal of Infectious Diseases, 182:634- 38, 2000.

BATISTA, A.M.; AGUIAR, C.; ALMEIDA, E.A.; GUARIENTO, M.E.; WANDERLEY, S.J.; COSTA, S.C. **Evidence of Chagas disease in seronegative Brazilian patients with Megaesophagus.** International Journal of Infectious Diseases, 14(11):974-77, 2010.

BERTELLI, M.S.; GOLGHER, R.R.; BRENER, Z. **Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture.** The Journal of Parasitology, 63, 434-37, 1977.

BERTELLI, M.S. & BRENER, Z. **Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*.** The Journal of Parasitology, 66(6):992-97, 1980.

BORGES, C.R.B.; JUNIOR, V.R.; REIS, M.A.; CASTELLANO, L.R.; JAVIER, E.L.C.; PEREIRA, S.A.L.; SANTOS, E.S.; RODRIGUES, D.B.R. **Papel do óxido**

nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 42(2):170-74, 2009.

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. **Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 59:19-26, 1965.

BRENER, Z. **The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, 63:215-20, 1969.

BRENER, Z.; GOLGHER, R.; BERTELLI, M.S.; TEIXERA, J.A. **Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture.** The Journal of Parasitology, 23(1):147-50, 1976.

BRENER, Z. **Pathogenesis and immunopathology of chronic Chagas' Disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 82:205-13, 1987.

BRENER, Z. & GAZZINELLI, R.T. **Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease.** International Archives of Allergy and Immunology, 114:103-10, 1997.

CALIARI, E.R.; CALIARI, M.V.; DE LANA, M.; TAFURI, W.L. **Quantitative and qualitative studies of the Auerbach and Meissner plexuses of the esophagus in dogs inoculated with *Trypanosoma cruzi*.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 29(1):17-20, 1996.

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

CALIARI, M.V.; PILAR MACHADO, R.; DE LANA, M.; CAJA, R.A.; CARNEIRO, C.M.; BAHIA, M.T.; DOS SANTOS, C.A.; MAGALHAES, G.A.; SAMPAIO, I.B.; TAFURI, W.L. **Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 44(5): 273-78, 2002.

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. **Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin-10: role of NK cells.** Infection and Immunity, 64:128-34, 1996.

CARDILLO, F.; POSTOL, E.; NIHEI, J.; AROEIRA, L.S.; NOMIZO, A.; MENGEL, J. **B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8⁺ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection.** Immunology, 122: 584-95, 2007.

CARDOSO, A.V.; LESCANO, S.A.; AMATO NETO, V.; GAKIYA, E.E.; SANTOS, S.V. **Survival of *Trypanosoma cruzi* in sugar cane used to prepare juice.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 48(5):287-89, 2006.

CARNEIRO, C.M.; MARTINS-FILHO, O.A.; REIS, A.B.; VELOSO, V.M.; ARAUJO, F.M.; BAHIA, M.T.; LANA, M.; MACHADO-COELHO, G.L.L.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R.E 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(2):120-29, 2007.

CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P.C.; TROYER, D.A.; FREEMAN, G.L. **Induction of Proinflammatory Cytokine Expression in Experimental Acute Chagasic Cardiomyopathy.** Biochemical and Biophysical Research Communications, 223:365-71, 1996.

CORBETT, C.E.; RIBEIRO, U.JR.; PRIANTI, M.G.; HABR-GAMA, A.; OKUMURA, M.; GAMA-RODRIGUES, J. **Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease.** Diseases of the Colon and Rectum, 44:993-98, 2001.

CORRÊA-OLIVEIRA, R.; GOMES, J.; LEMOS, E.M.; CARDOSO, G.M.; REIS, D.D.; ADAD, S.; CREMA, E.; MARTINS-FILHO, O.A.; COSTA, M.O.; GAZZINELLI, G.; BAHIA-OLIVEIRA, L.M. **The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 1:253-55, 1999.

COURA, J.R. **Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39(3):113-17, 2006.

COURA, J.R. & DIAS, J.C. **Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104:31-40, 2009.

CUNHA-NETO, E. & KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas' heart disease.** Revista Paulista de Medicina, 113:757-66, 1995.

CUNHA-NETO, E.; NOGUEIRA, L.G.; TEIXEIRA, P.C.; RAMASAWMY, R.; DRIGO, S.A.; GOLDBERG, A.C.; FONSECA, S.G.; BILATE, A.M.; KALIL, J. **Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104:252-8, 2009.

DA SILVEIRA, A.B.; ARANTES, R.M.; VAGO, A.R.; LEMOS, E.M.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'AVILA REIS, D. **Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus.** Parasitology, 131:627-34, 2005.

D'AVILA REIS, D.; LEMOS, E.M.; SILVA G.C.; ADAD, S.J.; McCURLEY T.; CORRÊA-OLIVEIRA R.; MACHADO C.R.S. **Phenotypic characterization of the inflammatory cells in chagasic megaesophagus.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 95:177- 178, 2001.

DIAS, E., LARANJA, F.S., MIRANDA, A., NOBREGA, G. **Chagas' disease: a clinical, epidemiologic, and pathologic study.** Circulation, 14:1035-1060, 1956.

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, 45(1):74-80, 1997.

DUTRA, W.O.; ROCHA, M.O.C.; TEIXEIRA, M.M. **The clinical immunology of human Chagas disease.** Trends in Parasitology, 21:581-87, 2005.

DUTRA, W.O.; MENEZES, C.A.; VILLANI, F.N.; DA COSTA, G.C.; DA SILVEIRA, A.B.; REIS, D.D.; GOLLOB, K.J. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104 (1):208-18, 2009.

FERRAZ, M.L.; GAZZINELLI, R.T.; ALVES, R.O.; URBINA, J.A.E 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.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, 53(1):174-79, 2009.

FERREIRA, R.C.; IANNI, B.M.; ABEL, L.C.; BUCK, P.; MADY, C.; KALIL, J. **Increase plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic "indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98(3):407-11, 2003.

FRANCO, D.J.; VAGO, A.R.; CHIARI, E.; MEIRA, F.C.A.; GALVÃO, L.M.C.; MACHADO, C.R.S. ***Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat.** Experimental Parasitology, 104:54-61, 2003.

GAO, W. & PEREIRA, M.A. **Interleukin-6 is required for parasite specific response and host resistance to *Trypanosoma cruzi*.** International Journal for Parasitology, 32:167-70, 2002.

GARCIA, S.B.; PAULA, J.S.; GIOVANNETTI, G.S.; ZENHA, F.; RAMALHO, E.M.; ZUCOLOTO, S.; SILVA, J.S.; CUNHA, F.Q. **Nitric oxide is involved in the lesions of the peripheral autonomic neurons observed in the acute phase of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** Experimental Parasitology, 93(4):191-7, 1999.

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

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

GOLGHER, D. & GAZZINELLI, R.T. **Innate and acquired immunity in the pathogenesis of Chagas disease.** Autoimmunity, 37:399-409, 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 immune response.** Infection and Immunity, 71(3):1185-93, 2003.

GONÇALVES DA COSTA, S.C.; CALABRESE, K.S.; ZAVERUCHA DO VALLE, T.; LAGRANGE, P.H. ***Trypanosoma cruzi*: infection patterns in intact and athymic mice of susceptible and resistant genotypes.** Histology Histopathology, 17(3):837-44, 2002.

GUEDES, P.M.; VELOSO, V.M.; TAFURI, W.L.; GALVÃO, L.M.; CARNEIRO, C.M.; CHIARI, E.; ATAIDE SOARES, K.; BAHIA, M.T. **The dog as model for chemotherapy of Chagas' disease.** Acta Tropica, 84 (1): 9-17, 2002.

GUEDES, P.M.; VELOSO, V.M.; CALIARI, M.V.; CARNEIRO, C.M.; SOUZA, S.M.; DE LANA, M.; CHIARI E.; BAHIA M.T.; GALVÃO, L.M. ***Trypanosoma cruzi* high infectivity *in vitro* is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 102(2):141-7, 2007.

HIGUCHI, M.L.; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A. **Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: light microscopy and immunohistochemical findings.** Cardiovascular Pathology, 2:101-6, 1993.

HIGUCHI, M.L.; BENVENUTI, L.A.; REIS, M.M.; METZGER, M. **Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments.** Cardiovascular Research, 60:96-107, 2003.

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

HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G.A., BRONBACHER, F., 1998. **Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase.** Infection and Immunity, 66:1208-15, 1998.

KÖEBERLE, F. **Patogenia da moléstia de Chagas. Estudos dos órgãos musculares ocos.** Revista Goiana de Medicina, 3:155-80, 1957.

KÖBERLE, F. **Enteromegalia and cardiomegaly in Chagas Disease.** Gut, 41:399-405, 1963.

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

KÖBERLE, F. **The causation and importance of nervous lesions in American trypanosomiasis.** Bulletin of the World Health Organization, 42: 739-43, 1970.

KUMAR, S. & TARLETON, R.L. **Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice.** Journal of Immunology, 166:4596-603, 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.

LAGES-SILVA, E.; CREMA, E.; RAMIREZ, L.E.; MACEDO, A.M.; PENA, S.D.; CHIARI, E. **Relationship between *Trypanosoma cruzi* and human chagasic megaesophagus: blood and tissue parasitism.** The American Society of Tropical Medicine and Hygiene, 65:435-41, 2001.

LANA, M.; TAFURI, W.L.; CALIARI, M.V.; BAMBIRRA, E.A.; CHIARI, C.A.; RIOS LEITE, V.H.; BARBOSA, A.J.A.; TOLEDO, M.J.O.; CHIARI, E. **Fase crônica cardíaca fibrosante da tripanossomíase cruzi experimental no cão.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 21:113-21, 1988.

LANA, M.; CHIARI, E.; TAFURI, W.L. **Experimental Chagas disease in dogs.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 87:59-71, 1992.

LEAVEY, J.K. & TARLETON, R.L. **Cutting Edge: Dysfunctional CD8⁺ T Cells Reside in Nonlymphoid Tissues During Chronic *Trypanosoma cruzi* Infection.** The Journal of Immunology, 170:2264-68, 2003.

LEIBY, D.A.; HERRON, R.M.; READ, E.J. ***Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission.** Transfusion, 42:549-55, 2002.

LEON, J.S.; DANIELS, M.D.; TORIELLO, K.M.; WANG, K.; ENGMAN, D. **Cardiac myosin-specific autoimmune response is induced by immunization with *Trypanosoma cruzi* proteins.** Infection and Immunity, 72(6): 3410-17, 2004.

LIEKE, T.; GRAEFE, S.E.; KLAUENBERG, U.; FLEISCHER, B.; JACOBS, T. **NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms.** Infection and immunity, 72(12):6817-25, 2004.

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

MACHADO, E.M.; FERNANDES, A.J.; MURTA, S.M.; VITOR, R.W.; CAMILO, D.J.JR.; PINHEIRO, S.W.; LOPES, E.R.; ADAD, S.J.; ROMANHA, A.J.; PINTO DIAS, J.C. **A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs.** American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 65(6):958-65, 2001.

MACHADO, F.S.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.; MESTRINER, F.L.; CUNHA, F.Q.; SILVA, J.S.; ***Trypanosoma cruzi*-infected cardiomyocytes produce chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity.** Circulation, 102(24):3003-8, 2000.

MALTOS, K.L.; MENEZES, G.B.; CALIARI, M.V.; ROCHA, O.A.; SANTOS, J.M.; ALVES, D.L.; DUARTE, I.D.; FRANCISCHI, J.N. **Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp.** Archive of Oral Biology, 49:443-50, 2004.

MARTIN, D. & TARLETON, R.L. **Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection.** Immunological Reviews, 201:304-17, 2004.

MICHAILLOWSKY, 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, 159:1723-33, 2001.

MONCAYO, A. **Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 98:577-91, 2003.

MONCAYO, A. & ORTIZ YANINE, M.L. **An update on Chagas disease (Human American trypanosomiasis).** Annals of Tropical Medicine Parasitology, 100(8):663-77, 2006.

MULLER, U.; SOBEK, V.; BALKOW, S.; HOLSCHEER, C.; MULLBACHER, A.; MUSETEANU, C.; MOSSMANN, H.; SIMON, M.M. **Concerted action of perforin and granzymes is critical for the elimination of *Trypanosoma cruzi* from mouse tissues, but prevention of early host death is in addition dependent on the FasL/Fas pathway.** European Journal of Immunology, 33(1):70-78, 2003.

NASCIMENTO, R.D.; LISBOA, A.S.; FUJIWARA, R.T.; FREITAS, M.A.R.; ADAD, S.J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'ÁVILA-REIS, D.; DA-SILVEIRA, A.B.M. **Characterization of enterogial cells and denervation process in chagasic patients with and without megaesophagus.** Human Pathology, 41:528-54, 2010.

NOGUEIRA C. **Avaliação do Trato Digestório de Cães *Beagle* Infectados pelas cepas Y ou Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* nas Fases Aguda ou Crônica da**

Doença de Chagas Experimental. Tese, Universidade Federal de Ouro Preto, 75, 2011.

OHSHIMA, S.; YUKIHIKO, S.; MIMA, T.; SASAI, M., NISHIOKA, K., NOMURA, S.; KOPF, M.; KATADA, Y.; TANAKA, T.; SUEMURA, M.; KISHIMOTO, T. **Interleukin 6 plays a key role in the development of antigen-induced arthritis.** Proceedings of the National Academic of Sciences of the United States of America, 95:8222-26, 1998.

PEDROSA, M.L.; NICOLI, J.R.; SILVA, M.E.; VIEIRA, L.Q.; BAMBIRRA, E.A.; VIEIRA, E.C. **The effect of iron nutritional status on *Trypanosoma cruzi* infection in germ free and conventional mice.** Comparative Biochemistry en Physiology, 106(4):813-21, 1993.

PEÑARANDA-CARRILLO, R.; CASTRO, C.; REZENDE, J.; PRATA, A.; MACÊDO, V. **Radiographic study of the oesophagus of chagasic patients in 25 years of the Mambáí Project.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 39:152-52, 2006.

PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** The Lancet Infection Diseases, 1:92-100, 2001.

RIBEIRÃO, M.; PEREIRA-CHIOCCOLA, V.L.; RÉNIA, L.; AUGUSTO FRAGATA FILHO, A.; SCHENKMAN, S.; RODRIGUES, M.M. **Chagasic patients develop a type 1 immune response to *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase.** Parasite Immunology, 22(1):49-53, 2000.

RIBEIRO, B.M.; CREMA, E.; RODRIGUES, V.JR. **Analysis of the cellular immune response in patients with the digestive and indeterminate forms of Chagas' disease.** Human Immunology, 69(8):484-9, 2008.

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.

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

ROTTENBERG, M.E.; CASTAÑOS-VELEZ, E.; DE MESQUITA, R.; LAGUARDIA, O.G.; BIBERFELD, P.; ORN, A. **Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction.** European Journal of Immunology, 26(12):3203-13, 1996.

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.

SAMOILOVA, E.B.; HORTON, J.L.; HILLIARD, B.; LIU T.S.; CHEN, Y. **IL-6-deficient mice are resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis: roles of IL-6 in the activation and differentiation of autoreactive T cells.** Journal of Immunology, 161(12):6480-6, 1998.

SANTOS, C.A.B. **Estudo Morfológico e Morfométrico do Esôfago do Cão Normal e na Fase Aguda da Tripanosomíase Cruzi Experimental, com Referência Especial ao Plexo Mientérico.** Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, 74, 1998.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D.M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O.A. **Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood?** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104(I):246-51, 2009.

SAVINO, W.; VILLA-VERDE, D.M.; MENDES-DA-CRUZ, D.A.; SILVA-MONTEIRO, E.; PEREZ, A.R.; AOKI MDEL, P.; BOTTASSO, O.; GUIÑAZÚ, N.; SILVA-BARBOSA, S.D.; GEA, S. **Cytokines and cell adhesion receptors in the regulation of immunity to *Trypanosoma cruzi*.** Cytokine and Growth Factor Reviews, 18:107-24, 2007

SILVA, J.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. **Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection.** The Journal of Experimental Medicine, 175, 169-74, 1992.

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.** International Journal of Experimental Pathology, 91(1):72-86, 2010.

SOARES, M.B.; SILVA-MOTA, K.N.; LIMA, R.S.; BELLINTANI, M.C.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. **Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism.** The American Journal of Pathology, 159:703-9, 2001.

SONDERGAARD, S.R.; ULLUM, H.; PEDERSEN, B.K. **Proliferative and cytotoxic capabilities of CD16⁺CD56⁻ and CD16⁺/-CD56⁺ natural killer cells.** Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica Scandinavica, 108(12):831-7, 2000.

SOUZA, S.M. **Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado inflamatório cardíaco durante a fase aguda da infecção experimental de cães por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.** Tese, Universidade Federal de Ouro Preto, 77, 2009.

TAFURI, W.L. & BRENER, Z. **Lesões dos plexos de Meissner e de Auerbach do intestino do camundongo albino na fase crônica da Tripanosomíase cruzi experimental.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 9:149-154, 1967.

TAFURI, W.L. **Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease: light and electron microscope studies.** The American Journal of Tropical of Medicine and Hygiene, 19:405-17,1970.

TAFURI, W.L. **Light and electron microscopy studies of the autonomic nervous system in experimental and human American trypanosomiasis.** Virchows Archiv: an International Journal of Pathology, 354:36-49, 1971.

TAFURI, W.L. **Patogenia da doença de chagas.** Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, 29(4):194-99, 1987.

TAFURI, W.L.; LANA, M.; CHIARI, E.; CALIARI, M.V.; BAMBIRRA, E.A.; RIOS-LEITE, V.H.; BARBOSA, A.J. **O cão como modelo experimental para o estudo da história natural da doença de Chagas.** Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, 21:82-83, 1988.

TALVANI, A.; ROCHA, M.O.; COGAN, J.; MAEWAL, P.; DE LEMOS, J.; RIBEIRO, A.L.; TEIXEIRA, M.M. **Brain natriuretic peptide and left ventricular dysfunction in chagasic cardiomyopathy.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 99(6):645-49, 2004.

TARLETON, R.L & ZHANG, L. **Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence?** Parasitology Today, 15:94-99, 1999.

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

TEIXEIRA, A.R.; NASCIMENTO, R.J.; STURM, N.R. **Evolution and pathology in Chagas disease- A Review.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 101(5):463-91, 2006.

TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H.; CARLIER, Y. **Interleukin-6 (IL-6) production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral immune responses.** Infection and Immunity, 62(2):692-96, 1994.

VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; ADAD, S. J.; REIS, D. D., CORRÊA-OLIVEIRA, R. **PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in esophagus tissue of patients with chronic digestive Chagas disease.** Lancet, 348:891-92, 1996.

VAGO, A.R.; ANDRADE, L.O.; LEITE, A.A.; D'AVILA REIS, D.; MACEDO, A.M.; ADAD, S.J.; TOSTES JR.; S., 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, 156:1805-09, 2000.

VAGO, A. R.; SILVA, D. M.; ADAD, S. J.; CORREA-OLIVEIRA, R.; D'ÁVILA REIS, D. **Chronic Chagas disease: presence of parasite DNA in esophagus without**

megaesophagus. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, 97:308-09, 2003.

VELOSO, V. M. **Doença de Chagas experimental em cães da raça *Beagle*: avaliação clínica, parasitológica, histopatológica e molecular.** Tese, Universidade Federal de Minas Gerais, 125, 2007.

VELOSO, V. M.; GUEDES, P. M.; ANDRADE, I. M.; CALDAS, I. S.; MARTINS, H. R.; CARNEIRO, C. M.; MACHADO-COELHO, G. L. L.; LANA, M.; GALVÃO, L. M. C.; BAHIA, M. T.; CHIARI, E. ***Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of *Beagle* dogs.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 103:528-34, 2008.

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*.** Infection and Immunity, 62 (11):5177-82, 1994.

VIRREIRA, M.; SERRANO, G.; MALDONADO, L.; SVOBODA, M. ***Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub) lineages in megacolon samples from bolivian patients.** Acta Tropica, 100:252-55, 2006.

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

WATSON, C.; WHITTAKER, S.; SMITH, N.; VORA, A.J.; DUMONDE, D.C.; BROWN, K.A. **IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes.** Clinical and Experimental Immunology, 105(1):112-9, 1996.

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

WÜNSCHMANN, A.; ALLDINGER, S.; KREMMER, E.; BAUMGÄRTNER, W. **Identification of CD4+ and CD8+ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute, and chronic-demyelinating distemper encephalitis.** Veterinary immunology and immunopathology, 67: 101-16, 1999.

ZHANG, L, & TARLETON, RL. **Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections.** Experimental Parasitology, 84(2):203-13, 1996.

ZHANG, L. & TARLETON, R.L. **Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease.** The Journal of Infectious Diseases, 180:480-86, 1999.

ZINGALES, B.; SOUTO, R.P.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; CAMPBELL, D.A.; COURA, J.R.; JANSEN, A.; FERNANDES, O. **Molecular epidemiology of American**

trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. International Journal for Parasitology, 28:105-12, 1998.

ZINGALES, B.; ANDRADE, S. G.; BRIONES, M. R. S.; CAMPBELL, D. A.; CHIARI, E.; FERNANDES, O.; GUHL, F.; LAGES-SILVA, E.; MACEDO, A. M.; MACHADO, C. R.; MILES, M. A.; ROMANHA, A. J.; STURM, N. R.; TIBAYRENC, M.; SCHIJMAN, A. G. **A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcIV.** Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, 104:1051-54, 2009.