

Sheler Martins de Souza

Avaliação imunopatológica do tecido muscular cardíaco canino,
submetido ao efeito da Azatioprina e infecção por diferentes formas
da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda

Universidade Federal de Ouro Preto
Ouro Preto, MG – 2014

Sheler Martins de Souza

Avaliação imunopatológica do tecido muscular cardíaco canino, submetido ao efeito da Azatioprina e infecção por diferentes formas da cepa Be-78 do *Trypanosoma cruzi*, durante a fase aguda

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas como exigência parcial para obtenção do grau de Doutor em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Ouro Preto na área de concentração de Imunobiologia de Protozoários.

Orientadora: Prof^a. Cláudia Martins Carneiro

Co-orientadora: Prof^a. Paula Melo de Abreu Vieira

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto, MG – 2014

5729a Souza, Sheler Martins.
Avaliação imunopatológica do tecido muscular cardíaco
canino, submetido ao efeito da Azatioprina e infecção por
diferentes formas da cepa Me-78 *Trypanosoma cruzi*, durante
a fase aguda [manuscrito] / Sheler Martins Souza. - 2014.
138f. : il., color, graf., tabs.

Orientadora: Profa. Dra. Cláudia Martins Carneiro.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Ouro Preto.
Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de
Pesquisas em Ciências Biológicas.
Área de Concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Imunopatologia. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3.
Parasitologia. I. Carneiro, Cláudia Martins. II.
Universidade Federal de Ouro Preto. III. Título.

CDU. 577.37.616.937



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Tese Intitulada:

"Avaliação imunopatológica do tecido muscular cardíaco canino, frente ao efeito da Azatioprina e inóculo por diferentes formas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* durante a fase aguda"

Aos dez dias do mês de junho de 2014, às 9:00h, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Tese do aluno **Sheler Martins de Souza**. A defesa da tese iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por APROVAR o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Cristiane Alves Silva
Menezes Examinadora
(UFMG)

Prof.ª Dr.ª Silvana Maria Elói Santos
Examinadora (UFMG)

Prof. Dr. André Talvani
Examinador (FIOCRUZ)

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

Prof.ª Dr.ª Cláudia Martins Carneiro
Presidente (UFOP)

DATA DA DEFESA: 10/06/2014



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Marro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3598.1880 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

Dedico este trabalho aos meus filhos: Gabriel, pela sua coragem de enfrentar a vida e hoje estar junto a mim, e Laura, por sua luta para vir a esta vida.

“A lembrança da vida da gente se guarda em trechos diversos, cada um com seu signo e sentimento, uns com os outros acho que nem não misturam. Contar seguido, alinhavado, só mesmo sendo as coisas de rasa importância. De cada vivimento que eu real tive, de alegria forte ou pesar, cada vez daquela hoje vejo que eu era como se fosse diferente pessoa. Sucedido desgovernado. Assim eu acho, assim é que eu conto.”

“Despedir dá febre!”

João Guimarães Rosa.

Agradeço:

À Professora Cláudia Martins Carneiro, por abrir as portas do antigo laboratório de histopatologia a um aluno de primeiro período, e orientá-lo ao ponto deste escrever esta tese. Muito obrigado é pouco...

À Professora Paula Melo de Abreu Vieira, a disponibilidade, a franqueza e os momentos dedicados ao norteamento deste trabalho;

Ao Professor Alexandre Barbosa Reis, as sugestões dadas, pois foram de fundamentais para tal desfecho;

Ao Henrique Gama Ker e Rodrigo Dian Oliveira Aguiar Soares, grandes amigos e companheiros;

À Maria Chaves, os ensinamentos técnicos histopatológicos e a amizade;

Aos amigos do Laboratório de Imunopatologia, muito obrigado pelos momentos de aprendizado e descontração;

Aos prezados companheiros republicanos, os momentos de descontração em nossa querida República Nós é Nós;

À UFOP/NUPEB, o ensino de excelência;

Aos amigos Abílio Martins Vieira e ao Marcus Vinícius da Silva, sempre presentes em minha vida;

À minha irmã, Shiara Martins de Souza, a amizade, o apoio e carinho;

Aos meus pais, Jardir Feliciano de Souza e Marilza Martins Fonseca de Souza, o apoio nesta caminhada que é a vida;

À Venúncia Emília Coelho, a compreensão, a amizade e o amor a nós dedicado;

Ao Gabriel Assis Fonseca de Souza, por deixar meus dias mais felizes, me surpreendendo a cada instante;

À Laura Coelho de Souza, por chegar trazendo alento ao futuro.

As duas formas de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, tripomastigota metacíclica (TM) e sanguínea (TS) são distintas em relação ao processo de interação com as células do hospedeiro, devido às moléculas presentes em sua superfície. Esta diferença pode desencadear diferente resposta imunológica. Resposta esta, que também pode ser alterada com o tratamento pelo fármaco Azatioprina. Com base nestes aspectos, o objetivo deste trabalho foi avaliar a resposta imune no coração de cães tratados com a Azatioprina ou não, durante a fase aguda da infecção por formas TM ou TS da cepa Berenice-78 do *T. cruzi*. Ao avaliar o parasitismo e a resposta imune no tecido muscular cardíaco de cães infectados por formas TM, verifica-se que estes apresentaram um aspecto histopatológico mais preservado, com baixo parasitismo, um balanço favorável, evidenciado pela razão, da expressão da IL-12p40 e uma maior expressão dos receptores TLR2 e TLR4. Em contrapartida, os cães infectados por formas TS apresentaram destruição tecidual, alto parasitismo, intenso processo inflamatório e elevada expressão das citocinas, quimiocinas, CCR5 e TLR9. Nos animais submetidos à infecção por diferentes formas do *T. cruzi* e tratados com a Azatioprina, ocorreu um aumento do parasitismo em ambos os grupos (TMA e TSA) e do processo inflamatório no grupo TMA, sendo estes fatores determinantes na gênese das lesões da fibra muscular cardíaca. Além disso, pode-se constatar aumento das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β 1, da quimiocina CCL3/MIP-1 α e TLR9 no grupo TMA. Em suma, a ação da Azatioprina parece conduzir à resposta imune distinta. Esta evidência foi observada em ambas as formas de infecção, culminando em uma piora dos aspectos histopatológicos, principalmente naqueles do grupo TMA. Este fato pode estar ligado a mecanismos co-estimulatórios, via CD28. Sabe-se que a Azatioprina pode levar ao bloqueio desta via que é de grande importância para desencadear uma resposta imune Th1. Neste sentido, o bloqueio ou mesmo o desequilíbrio desta via e, conseqüentemente, da resposta imune de cunho protetora, favorece a replicação parasitária. Sugere-se a possível importância da via CD28 nos mecanismos de defesa contra o *T. cruzi* e chama-se a atenção para a função dos receptores TLR2 e TLR4 na infecção chagásica, pois estes podem desempenhar função protetora.

The two infective forms of *Trypanosoma cruzi*, metacyclic trypomastigote (MT) and blood trypomastigote (BT), are distinct with respect to the host cell interaction process due to molecules present on the surface of the parasite, which could trigger different immune responses. Therefore, this study clarifies some aspects inherent of the two major infective forms of *T. cruzi*. Thus, investigating the two forms of infection, this work highlights the aspects related to a possible imbalance in the immune response by treating the dogs with Azathioprine drug. Based on these aspects, it was evaluated the immune response in the hearts of dogs treated with Azathioprine or not, during the acute phase of infection by MT or BT forms of Berenice -78 strain of *T. cruzi*. Analysis of the parasitism and immune response in cardiac muscle tissue of dogs infected MT forms demonstrated that this group had a more preserved histopathology, lower tissue parasitism, a favorable cytokine balance, evidenced by the ratio of the expression of IL-12p40 and increased expression of TLR2 and TLR4 receptors. In contrast, infected dogs with BT forms have tissue destruction, higher tissue parasitism, an intense inflammation and increased expression of cytokines, chemokines, CCR5 and TLR9 receptor. In infected by different forms of *T. cruzi* and treated with Azathioprine, it appears that there was an increase of cardiac parasitism in both groups (MTA and BTA) and inflammation (MTA group), which are determining factors in the genesis of the cardiac muscle fiber lesions. Moreover, it was not notice differences in other parameters, such as an increased on mRNA cytokine expression for instance TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 and TGF- β 1, chemokine CCL3/MIP-1 α and TLR9 in MTA Group. In summary, the action of Azathioprine leads to a distinct immune response, in both forms of infection, resulting in a worsening of histopathological aspects, especially those of the MTA group. This may be associated to co-stimulatory mechanisms, via CD28. It is known that Azathioprine can block this pathway, which is of great importance to elicit a Th1 immune response. In this sense, the block or even the imbalance of this pathway and of the protective immune response favors the parasite replication. Finally, this study presents a more severe form of Chagas infection with BT forms, which could have implications in non-endemic areas, such as USA and Europe. Moreover, it suggests a possible role and significance of CD28 pathway in defense mechanisms against *T. cruzi* and draws attention to the role of TLR2 and TLR4 receptors in infection, as these can play a protective role.

Tabela 1: Sequências dos primers <i>forward</i> e <i>reverse</i> referente aos genes avaliados, contendo sua respectiva função	32
Tabela 2: Razão entre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias em relação às citocinas imunomodulatórias no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	46
Tabela 3: Razão entre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias em relação às citocinas imunomodulatórias no Átrio Direito dos cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> , tratados com a Azatioprina	58

Figura 1: Esquema representativo do metabolismo da Azatioprina.....	11
Figura 2: Delineamento experimental contendo a distribuição dos animais nos seis grupos experimentais: Não Infectado, infectado por formas Tripomastigotas Metacíclicas, infectado por formas Tripomastigotas Sanguíneas, Não Infectado e submetidos ao efeito da Azatioprina, infectado por formas Tripomastigotas Metacíclicas e submetidos ao efeito da Azatioprina, infectado por formas Tripomastigotas Sanguíneas e submetidos ao efeito da Azatioprina.	21
Figura 3: Gel de agarose a 1,2%, representativo da integridade das amostras de RNA extraídos.....	30
Figura 4: Análise qualitativa e quantitativa do parasitismo no Átrio Direito de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> , eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda.....	35
Figura 5: Avaliação qualitativa e quantitativa de cortes histológicos do Átrio Direito corados pela Hematoxilina Eosina de cães Não Infectados e infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> , eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda..	36
Figura 6: Correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório no Átrio Direito de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	37
Figura 7: Avaliação qualitativa e quantitativa de cortes histológicos do Átrio Direito corados pelo Tricrômico de Masson de cães Não Infectados e infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i> , eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda.....	38
Figura 8: Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β 1 em amostras no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	40
Figura 9: Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e do receptor CCR5 em amostras no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do <i>Trypanosoma cruzi</i>	41
Figura 10: Análise da expressão relativa de mRNA de receptores <i>Toll-like</i> (TLR2, TLR4, e TLR9) e da enzima iNOS em amostras no Átrio Direito de cães	

Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*..... 42

Figura 11: Correlação entre o parasitismo e IFN- γ , IL-10, CCL5/RANTES, CCR5 e TLR9 no Átrio Direito de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. 43

Figura 12: Correlação entre o processo inflamatório e as citocinas (IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1) no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. 44

Figura 13: Correlação entre o processo inflamatório e CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCR5 e receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9) no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. 45

Figura 14: Análise qualitativa e quantitativa do parasitismo no Átrio Direito de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, tratados com a Azatioprina e eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda. . 48

Figura 15: Avaliação qualitativa e quantitativa de cortes histológicos do Átrio Direito corados pela Hematoxilina Eosina de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, tratados com a Azatioprina, e eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda..... 49

Figura 16: Correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório no Átrio Direito de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina..... 50

Figura 17: Avaliação qualitativa e quantitativa de cortes histológicos do Átrio Direito corados pelo Tricrômico de Masson de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, tratados com a Azatioprina e eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda..... 51

Figura 18: Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β 1 em amostras no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina..... 53

- Figura 19: Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e do receptor CCR5 em amostras no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina..... 54
- Figura 20: Análise da expressão relativa de mRNA de receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4, e TLR9) e da enzima iNOS em amostras no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina..... 55
- Figura 21: Correlação entre o processo inflamatório e as citocinas (IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1) no Átrio Direito de cães Não Infectados, infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas ou Tripomastigotas Sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina. 57
- Figura 22: Avaliação do impacto da Azatioprina sob o parasitismo através do número de cópias de DNA em 50ng das amostras no Átrio Direito detectado por qRT-PCR..... 60
- Figura 23: Avaliação do impacto da Azatioprina sob o processo inflamatório e da fibrose em lâminas no Átrio Direito corados pela Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson..... 62
- Figura 24: Avaliação do impacto da Azatioprina sob a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias..... 64
- Figura 25: Avaliação do impacto da Azatioprina sob a expressão relativa de mRNA das citocinas do tipo II e imunomodulatórias..... 66
- Figura 26: Avaliação do impacto da Azatioprina sob a expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor dessas quimiocinas CCR5. 68
- Figura 27: Avaliação do impacto da Azatioprina sob a expressão relativa de mRNA dos receptores *Toll-like* e da enzima iNOS..... 70
- Figura 28: Resposta imune no tecido cardíaco de cães após infecção por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice 78 do *Trypanosoma cruzi* eutanasiados durante a fase aguda, tratados com a Azatioprina ou não..... 87

6-MP	6-Mercaptopurina
6-TU	Ácido 6-tioúrico
6-TXMP	6-Tioxantina monofosfato
AD	Átrio Direito
AIDS	Síndrome da Imunodeficiência Adquirida
APC	Célula apresentadora de antígeno
AZA	Azatioprina
CC	Beta Quimiocina
CCA	Centro de Ciência Animal
CCR5	Receptor de Beta quimiocina (classe CC)
CD	<i>Cluster of Differentiation</i>
CD4	Co-receptor para MHC de classe II. Expresso em subgrupos de timócitos, linfócitos T, monócitos e macrófagos.
CD8	Co-receptor para MHC de classe I. Expresso em subgrupos de timócitos e linfócitos T citotóxicos
CpG	Citosina guanina dinucleotídeos
DAB	3.3'-diaminobenzidina
DEPC	Dietil-Pirocarbonato
DC	Doença de Chagas
GAPDH	Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase
GIPLs	Glicoinositolfosfolipídeos
GMPS	Guanidina 5-monofosfato sintetase
Gp 82	Glicoproteína 82
Gp 85	Glicoproteína 85
GPI	Glicosilfosfatidilinositol
GRB	Receptor do fator de crescimento
GST	Glutathione S-transferase
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	vírus da imunodeficiência humana
HPRT	Hipoxantina-fosforribosil transferase
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-10	Interleucina - 10
IL-12	Interleucina - 12
IL-4	Interleucina - 4
IMPDH	Inosina-5-monofosfato desidrogenase
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
MeTIMP	6-Metilinosina monofosfato
MyD88	Diferenciação mielóide proteína resposta primária 88
NFAT	Fator nuclear de ativação de células T
NF- $\kappa\beta$	Fator nuclear kappa beta
NI	Não Infectado
NIA	Não Infectado e tratados com a Azatioprina
NK	Células Natural Killer

NO	Óxido Nítrico
PAMPs	Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PB	Pares de base
PBS	<i>Phosphate Buffer Saline</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PIP3	Fosfatidilinositol 1,4,5 – Fosfato
PLC	Fosfolipase C
PTK	Proteína tirosina kinase
qRT-PCR	PCR quantitativo em Tempo Real
TCR	Receptor de células T
TGDP	6-Tioguanina difosfato
TGN	6-Tioguanina
TGTP	6-Tioguanina trifosfato
TIMP	Tioinosina monofosfato
TLR	Receptor do tipo <i>Toll-Like</i>
TM	Tripomastigotas metacíclica
TMA	Tripomastigotas metacíclicas e tratados com a Azatioprina
TNFR	Receptores de co-estimulação membros da família do fator de necrose tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral-alfa
TPMT	Tiopurinametiltransferase
TS	Tripomastigotas sanguíneas
TSA	Tripomastigotas sanguíneas e tratados com a Azatioprina
UFOP	Universidade Federal de Ouro Preto
WHO	<i>World Health Organization</i>
XO	Xantina oxidase

1. Introdução	1
1.1 A doença de Chagas	2
1.2 Aspectos imunopatogênicos da doença de Chagas	4
1.3 Principais vias de infecção pelo T. cruzi e suas interações com as células hospedeiras	8
1.4 A azatioprina e o curso da infecção chagásica	11
1.5 O modelo canino no estudo da doença de Chagas	13
2. Justificativa	15
3. Objetivos	17
3.1 Objetivo geral	18
3.1.1 Objetivos específicos	18
4. Material e Métodos	22
4.1 Atividades previamente realizadas	22
4.1.1 Animais	22
4.1.2 Inóculo	22
4.1.3 Tratamento com a Azatioprina	23
4.1.4 Necropsia, coleta e fixação	23
4.2 Atividades realizadas neste estudo	23
4.2.1 Extração de DNA	23
4.2.2 Curva padrão e determinação da carga parasitária por qRT-PCR	24
4.2.3 Técnicas histológicas	25
4.2.3.1 Coloração pela Hematoxilina Eosina	25
4.2.3.3 Quantificação morfométrica do processo inflamatório e do tecido conjuntivo fibroso	26
4.2.4 Análise da expressão gênica pela qRT-PCR	28
5. Análise estatística	33
6. Resultados I	34
6.1 Aspectos qualitativos e quantitativos do parasitismo no Átrio Direito por IHQ e qRT-PCR	35
6.2 Aspectos qualitativos e quantitativos do processo inflamatório no átrio direito em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina	36
6.3 Análise de correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório	37
6.4 Aspectos qualitativos e quantitativos da fibrose no átrio direito em cortes histológicos corados pelo tricrômico de masson	38
6.5 Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas por qRT-PCR	39
6.6 Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor destas quimiocinas CCR5 por qRT-PCR	41
6.7 Análise da expressão relativa de mRNA dos receptores Toll-like e da enzima iNOS por qRT-PCR	42
6.8 Análise de correlação entre o parasitismo e a expressão relativa de mRNA do IFN- γ , IL-10, CCL5/RANTES, CCR5 e TLR9	43
6.9 Análise de correlação entre o processo inflamatório e a expressão relativa de mRNA das citocinas	44
6.10 Análise de correlação entre o processo inflamatório e expressão relativa de mRNA das quimiocinas e receptores	45
6.11 Razão da expressão relativa de mRNA das citocinas	46

pró-inflamatórias e imunomodulatórias.....	46
7. Resultados II	47
7.1 Aspectos qualitativos e quantitativos do parasitismo no átrio direito por IHQ e qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina	48
7.2 Aspectos qualitativos e quantitativos do processo inflamatório no átrio direito em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina de cães tratados com Azatioprina.....	49
7.3 Análise de correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório de cães tratados com Azatioprina	50
7.4 Aspectos qualitativos e quantitativos da fibrose no átrio direito em cortes histológicos corados pelo tricrômico de masson de cães tratados com Azatioprina ..	51
7.5 Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas por qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina	52
7.6 Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor dessas quimiocinas CCR5 por qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina	54
7.7 Análise da expressão relativa de mRNA dos receptores Toll-like e da enzima iNOS por qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina	55
7.8 Análise de correlação entre o processo inflamatório e expressão relativa de mRNA das citocinas de cães tratados com Azatioprina	56
7.9 Razão da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias e imunomodulatórias de cães tratados com Azatioprina	58
8. Resultados III	59
8.1 Impacto do efeito da Azatioprina sobre o parasitismo	60
8.2 Impacto do efeito da Azatioprina sobre o processo inflamatório e fibrose	61
8.3 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias	63
8.4 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas Th2 e imunomodulatórias	65
8.5 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor dessas quimiocinas CCR5	67
8.6 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA dos receptores Toll-like e da enzima iNOS	69
9. Discussão	71
10. Conclusões	88
11. Referências bibliográficas	92

“Eu sou é eu mesmo, divêrjo de todo mundo. Eu quase que não sei de nada,
mas desconfio de muita coisa.”

João Guimarães Rosa

1. Introdução

1.1 A doença de Chagas

Atualmente a tripanossomíase americana ou doença de Chagas (DC) (Chagas, 1909), enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, apresenta distribuição geográfica nas Américas mais reduzida do que há duas décadas. No entanto, ela ainda atinge a população desde o sul dos Estados Unidos até o sul da América do Sul (Noireau *et al.*, 2009). A redução da incidência da DC deve-se principalmente a medidas de controle vetorial, principal forma de transmissão da doença na América Latina, e controle da via transfusional, instaladas em muitas áreas endêmicas (Moncayo, 2006). Essas ações reduziram consideravelmente a transmissão que passou de 16-18 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* na década de 90, para a estimativa de sete a oito milhões em 2013 (WHO, 2013).

A via transfusional de infecção apresenta-se como importante mecanismo de transmissão da DC, principalmente em países da Europa (Riera *et al.*, 2006; Bart *et al.*, 2011) e dos EUA (Gascon *et al.*, 2007). Este fato está diretamente associado ao fluxo de migrantes latino-americanos infectados pelo *T. cruzi* e à falta de exames para a detecção da DC em bancos de sangue, principalmente na Europa. Nos Estados Unidos, em regiões onde há casos de transmissão por essa via, o controle nos bancos de sangue já vem sendo realizado (Leiby *et al.*, 2002; CDC, 2007; Bern *et al.*, 2009; Coura e Dias, 2009).

Além das vias de infecção citadas acima, podem ocorrer ainda a transmissão por via oral (Cardoso *et al.*, 2006; Coura *et al.*, 2006), com elevada prevalência no território da Amazônia Legal (Coura *et al.*, 2002a,b; Valente *et al.*, 2009), a transmissão através de acidentes de laboratórios ou congênita (Prata, 2001) e por transplante de órgãos (CDC, 2001; 2006; Chin-Hong *et al.*, 2011).

A infecção pelo *T. cruzi* culmina, em um primeiro momento, na fase aguda que pode apresentar-se assintomática ou sintomática, esta com quadros clínicos comuns a outras infecções o que dificulta o diagnóstico da doença. A

presença de miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia também podem ocorrer, além de meningoencefalite que pode levar ao óbito devido às lesões cerebrais. Este período da infecção dura cerca de dois a três meses, sendo que as lesões observadas podem estar diretamente relacionadas à cepa, ao inóculo, as re-infecções, bem como ao *status* nutricional e imunológico do hospedeiro (Pitella, 1993; Higuchi, 1995; Parada *et al.*, 1997; Morato *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2009).

Quando superada a fase aguda, os sintomas desaparecem e os exames clínicos apresentam-se normais, caracterizando a forma indeterminada da DC. Alguns indivíduos desta forma, aproximadamente 20-30%, em um período de 10 a 30 anos podem desenvolver sintomas cardiovasculares (Puigbó *et al.*, 1993; Teixeira *et al.*, 1997), e/ou digestivos, principalmente megacólon e/ou megaesôfago (Moncayo, 2003), podendo ter como gênese os danos aos neurônios, contribuindo para a denervação dos plexos entéricos (Köberle, 1957; Tafuri *et al.*, 1970; Coura *et al.*, 1983; Silveira *et al.*, 2005).

A resposta imunológica do hospedeiro frente à infecção pelo *T. cruzi* é constituída predominantemente por células da linhagem mononuclear. Ressalta-se o fato do principal órgão afetado ser o coração, provocando quadros degenerativos das fibras musculares cardíacas que podem progredir para morte tecidual e, conseqüentemente fibrose (Parada, 1997; Andrade *et al.*, 2000; Caliari *et al.*, 2002a; Higuchi *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2005). A avaliação da miocardite chagásica crônica tem demonstrado o predomínio de linfócitos T CD8⁺ em relação aos linfócitos T CD4⁺ (Higuchi *et al.*, 1993; Tostes Junior *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 2000). Neste sentido, a presença dos linfócitos T CD8⁺ no tecido muscular cardíaco poderia estar associada não somente à proteção, principalmente durante a fase aguda (Tarleton, 1991, 1994; Dutra *et al.*, 1996; Brener e Gazzinelli, 1997), mas também ao desenvolvimento da lesão tecidual, devido à sua ação imunopatogênica contra as células do hospedeiro, podendo causar citólise com destruição da miofibra cardíaca (Cuña e Cuña, 1995; Fuenmayor *et al.*, 2005; Silvério *et al.*, 2012).

1.2 Aspectos imunopatogênicos da doença de Chagas

Atualmente ainda perduram questionamentos à respeito dos aspectos imunológicos e patológicos que envolvem a gênese da miocardite chagásica. Estas dúvidas têm como princípio a consequente exposição das células do sistema imune a diversos antígenos do parasito. Inicialmente, as células da resposta imune inata, principalmente os fagócitos mononucleares e as células dendríticas, entram em contato com os antígenos do *T. cruzi*, dando início a uma série de eventos imunológicos. Neste contexto, resalta-se os receptores *Toll-like* (TLRs) que reconhecem diversos padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), originando alvos que ativam a resposta imune inata via NF-κB (factor nuclear kappa B), atuando na produção de citocinas pró-inflamatórias que subsequentemente ativam a resposta imune específica, atuando como importante elo entre as imunidades natural e adaptativa. Os receptores TLR2, TLR4 e TLR9, têm sido indicados como receptores de diferentes PAMPs do *T. cruzi*. O TLR2 reconhece GPI (GlicosilPhosfatidilinositol) mucinas (Campos *et al.*, 2001; Ouaiissi *et al.*, 2002), TLR4 reconhece, possivelmente, GIPs (GlicolinositolFosfoLipídeos) (Oliveira *et al.*, 2004) e TLR9 está envolvido no reconhecimento de regiões CpG (citossina guanina dinucleotídeos). Camundongos TLR4^{-/-} ou TLR9^{-/-} mostraram elevada parasitemia e vieram a óbito mais precocemente (Oliveira *et al.*, 2004), enquanto camundongos TLR2^{-/-} e TLR9^{-/-} desenvolveram parasitemia equivalente a camundongos MyD88^{-/-} (Bafica *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2010).

Os componentes da resposta imune inata, expostos a esses eventos, principalmente os macrófagos podem ser induzidos à produção de citocinas, como a interleucina-12 (IL-12), que por sua vez estimula a produção de Interferon-γ (IFN-γ) pelas células da resposta imune inata, as células natural killer (NK) e/ou por células da resposta imune específica, como os linfócitos T (Ropert *et al.*, 2002). O IFN-γ age na ativação dos macrófagos, amplificando a resposta imune inata, dando continuidade à síntese de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas e também desempenhando funções efetoras

através da produção de intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO). Avaliando este contexto, verifica-se que a IL-12 e o IFN- γ são citocinas chaves no processo de resposta ao *T. cruzi* (Michailowsky *et al.*, 2001). Além destas citocinas, o Fator de Necrose Tumoral- α (TNF- α) exerce função importante no processo de recrutamento e ativação dos componentes celulares da resposta imune, mas também pode auxiliar o processo de internalização do *T. cruzi* em células não fagocíticas (Pinto *et al.*, 2011). Evidências sugerem o papel ambíguo desta citocina, por se mostrar relacionada ao controle da replicação do *T. cruzi* (Lima *et al.*, 1997; Aliberti *et al.*, 2001) e também atua na indução da miocardite (Abel *et al.*, 2001; Kroll-Palhares *et al.*, 2008).

Citocinas consideradas imunomoduladoras como a Interleucina-10 (IL-10) e o Fator de Crescimento e Transformação- β (TGF- β), ou ainda, citocinas da resposta Th2, como a Interleucina-4 (IL-4), podem auxiliar o controle da resposta imune frente à infecção pelo *T. cruzi*, não permitindo que ocorra uma exacerbação da mesma (Soares *et al.*, 2001; Martins *et al.*, 2007). Neste contexto, estudos de sobrenadante de cultura das células mononucleares do sangue periférico de cães infectados pelo *T. cruzi*, e que desenvolveram a forma cardíaca da doença durante a fase crônica, apresentaram elevada produção de IFN- γ e TNF- α com baixa ou nula produção de IL-10 durante a fase aguda (Guedes *et al.*, 2009). O TGF- β pode ter um papel importante na infecção pelo *T. cruzi*, contribuindo para o recrutamento de fibroblastos, importantes no desenvolvimento da fibrose. Dessa forma, alguns trabalhos mostraram aumento do TGF- β na circulação de pacientes infectados (Silva *et al.*, 1991; Araújo-Jorge *et al.*, 2002) e ainda, que há participação dessa citocina no processo de invasão celular pelo *T. cruzi* (Ming *et al.*, 1996). Além disso, o TGF- β pode ser considerado modulador da resposta imune (Gazzinelli *et al.*, 1992; Letterio *et al.*, 1997; Hansen *et al.*, 1998; Martin *et al.*, 2007). A citocina IL-4 parece ter uma função moduladora da resposta imune na infecção chagásica, principalmente associada a IL-10, podendo modular a produção do IFN- γ (Abrahamsohn *et al.*, 2000). Estudo que avaliou a função da IL-4 demonstrou, em camundongos IL-4^{-/-}, um menor parasitismo e menor taxa de

mortalidade, acompanhado do aumento do processo inflamatório, estando presentes as células T CD4⁺ ou CD8⁺ (Soares *et al.*, 2001). A IL-4 parece estar também associada à sinalização e indução de células B, e sua diferenciação em células de memória (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2001, 2004).

Além da importância das citocinas para a resposta imune frente à infecção pelo *T. cruzi*, algumas quimiocinas são apontadas como cruciais nesse processo. Estas são importantes para o recrutamento e migração de leucócitos para o sítio de infecção, além da ativação destes. As quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES estão relacionadas à migração de macrófagos e regulação/ativação de linfócitos T, respectivamente. Foi demonstrado que em leucócitos de pacientes chagásicos há expressão de CCR5, receptor de CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES (Calzada *et al.*, 2001; Talvani *et al.*, 2004; Marino *et al.*, 2004). Em camundongos CCR5^{-/-} pode ocorrer a inibição da migração de células T, aumento da parasitemia, parasitismo cardíaco e redução na taxa de sobrevivência, e, conseqüentemente, aumento da susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (Machado *et al.*, 2005; Hardison *et al.*, 2006). Em ratos, o bloqueio dessas duas quimiocinas e de seu receptor, aumenta a inflamação e fibrose cardíaca (Roffê *et al.*, 2010).

As células T CD4⁺ produzem citocinas como o TNF- α e IFN- γ , ambas as citocinas são fundamentais na ativação de macrófagos e conseqüentemente, auxiliam a indução da IL-2 que auxilia na proliferação das células T CD8⁺. Estes eventos parecem estar relacionados ao controle da infecção pelo *T. cruzi*, pois camundongos células T CD4^{-/-} e T CD8^{-/-}, são susceptíveis à infecção (Ferraz *et al.*, 2009). Isso pode ser devido às células T CD8⁺, pois, uma vez que estão em maior quantidade no infiltrado inflamatório (Higuchi *et al.*, 1997), podem agir e eliminar as células infectadas através de mecanismos apoptóticos, granzima/perforina (Muller *et al.*, 2003) ou produzindo o IFN- γ , que pode estimular a transdução de sinal nos macrófagos iniciando a ativação de enzimas, como a enzima induzível do óxido nítrico sintase (iNOS) com posterior produção do NO, podendo assim controlar o parasitismo durante a fase aguda da doença de Chagas (Vespa *et al.*, 1994; Aliberti *et al.*, 1996;

1999; Hoft *et al.*, 2000; Martin e Tarleton, 2004; Borges *et al.*, 2009; Silvério *et al.*, 2012).

Em suma, a resposta imune frente à infecção pelo *T. cruzi*, pode ser conduzida a favor do controle da replicação do parasito ou a favor de sua proliferação. Os aspectos procedentes dessa dicotomia ainda permanecem obscuros e podem estar relacionados a uma polarização da resposta imune Th1 ou Th2 (Brener e Gazzinelli, 1997; Bahia-Oliveira *et al.*, 1998, 2000; Guedes *et al.*, 2002; Gomes *et al.*, 2003). Estudos demonstraram que a presença dos linfócitos T CD8⁺ associada à persistência do parasito e seus antígenos, sugerem a influência direta do parasito no desenvolvimento da miocardite em pacientes chagásicos crônicos. Além disso, estudos por imuno-histoquímica (IHQ) e, mais recentemente, por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) apontaram a presença do *T. cruzi* como fator decisivo na gênese das lesões cardíacas (Reis *et al.*, 1993; Higuchi *et al.*, 1997; Vago *et al.*, 1996; Tarleton *et al.*, 1999; Tarleton, 2001; Caldas *et al.*, 2012).

Eventos inflamatórios podem iniciar a morte tecidual e, conseqüentemente, um quadro imunopatogênico com a presença de diversos mediadores químicos, tornando o microambiente propício à substituição tecidual. Logo, no tecido muscular cardíaco pode ocorrer proliferação de fibroblastos e/ou miofibroblastos, que atuam produzindo componentes da matriz extracelular, como o colágeno, laminina e fibronectina, realizando a substituição dos cardiomiócitos lesados por componentes cicatriciais e como consequência deste processo, pode ocorrer perda da função ou de parte da função do órgão (Manzullo *et al.*, 1999; Espira e Czubryt, 2009).

A avaliação de cães, durante a fase aguda da infecção por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou tripomastigotas sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 (Be-78) do *T. cruzi*, mostrou predomínio de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico no grupo infectado por formas TM em relação ao grupo infectado por formas TS e também em relação ao grupo controle não infectado (NI) (Carneiro *et al.*, 2007). Além disso, a dosagem sérica revelou maiores níveis de NO neste mesmo grupo, infectado por formas TM. Avaliação das diferentes regiões cardíacas, por imuno-histoquímica, indicou maior expressão

da enzima iNOS no grupo infectado por formas TM quando comparado aos cães do grupo NI. No entanto, no grupo infectado por formas TS ocorreu maior processo inflamatório cardíaco em relação ao grupo infectado por formas TM (Vieira *et al.*, 2009). Apesar do maior processo inflamatório verificado no grupo infectado por formas TS, células T CD8⁺ predominaram nos cães infectados por formas TM (Souza, 2010).

1.3 Principais vias de infecção pelo *T. cruzi* e suas interações com as células hospedeiras

A DC é transmitida, na América Latina, principalmente por vetores hematófagos dos gêneros *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*, denominados triatomíneos. Nestes, o parasito apresenta uma plasticidade morfológica, apresentando formas alongadas designadas epimastigotas, responsáveis pela multiplicação do parasito no inseto vetor, e formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, denominadas tripomastigotas metacíclicas (TM), encontradas na porção posterior do intestino do vetor. Ao realizar o repasto sanguíneo, no hospedeiro vertebrado, os triatomíneos defecam nas proximidades do local da picada e, se infectados, podem liberar o *T. cruzi* junto às fezes e/ou urina. Dessa forma, os parasitos podem entrar em contato com as células do hospedeiro vertebrado, a partir do tecido lesado pela picada ou das mucosas adjacentes e iniciar a infecção (Brener, 1973).

Ao entrar em contato com as células do hospedeiro vertebrado ocorre a internalização do parasito e a mudança morfológica deste para formas arredondadas, com flagelos “involuídos”, denominadas amastigotas. Estas são as formas que se multiplicam no interior das células do hospedeiro vertebrado, através de sucessivas divisões binárias simples. Após vários ciclos de multiplicação, as formas amastigotas se diferenciam em formas tripomastigotas sanguíneas (TS), que são liberadas no interstício e na corrente sanguínea prontas para infectar outras células hospedeiras ou ainda podem ser ingeridas pelos vetores, durante seu repasto sanguíneo, completando assim o ciclo

evolutivo do parasito. Dessa forma, nota-se um pleomorfismo deste parasito exibido em suas formas evolutivas, as quais se encontram adaptadas aos seus respectivos microambientes (Stuart *et al.*, 2008).

As duas formas infectivas do *T. cruzi*, TM e TS, são capazes de infectar potencialmente todas as células nucleadas dos mamíferos, por meio de diversas moléculas presentes em sua membrana celular. No entanto, estas formas apresentam variabilidades em relação ao processo de infecção, sendo a forma TM a mais eficiente em penetrar a mucosa oral de camundongos (Hoff, 1996) e por via conjuntival em cães (Bahia *et al.*, 2002).

As formas TM do *T. cruzi*, que apresentam maior capacidade infectiva, ligam-se à superfície das células hospedeiras através de moléculas, como as glicoproteínas gp82, oligopeptidase B, trans-sialidasas e cruzipaina (Ramirez *et al.*, 1993; Burleigh *et al.*, 1997). Estas moléculas de superfície induzem a ativação de proteínas tirosina kinases (PTK), acionando mecanismos de sinalização celular envolvendo a ativação da fosfolipase C (PLC) e geração de fosfatidilinositol -3,4,5- fosfato (PIP₃). Estes eventos principiam a mobilização de Ca²⁺ dos seus estoques intracelulares, tendo importante função no processo de recrutamento de lisossomos e fusão na membrana celular. Além disso, gp82 induz o desagrupamento da actina auxiliando o processo de internalização importante para algumas células não fagocíticas. (Araya *et al.*, 1994; Burleigh e Andrews 1995b; Giordano *et al.*, 1999; Yoshida, 2000; Caler *et al.*, 2000; Yoshida, 2006).

Contudo, as formas TM, com menor capacidade de infecção utilizam preferencialmente as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50, ocorrendo a interação parasito-célula hospedeira de maneira distinta das formas altamente invasivas (Dorta *et al.*, 1995; Málaga e Yoshida 2001). Este grupo ao usar preferencialmente a gp35/50, ativam mecanismos de sinalização independente de PTK e PLC e provavelmente dependente de AMPc (AMP cíclico). O Ca²⁺ necessário para invasão é liberado para o citosol a partir de vacúolos, os acidocalciosomas, que contém um sistema de troca iônica Ca²⁺/H⁺; distintos daquele observado pelas formas TM com maior capacidade de infecção, que são oriundos do retículo endoplasmático (Burleigh e Andrews, 1995a;

Rodríguez *et al.*, 1995; Docampo, 1995; Burleigh *et al.*, 1997; Paiva *et al.*, 1998; Neira *et al.*, 2002; Yoshida 2006; Ferreira, 2006).

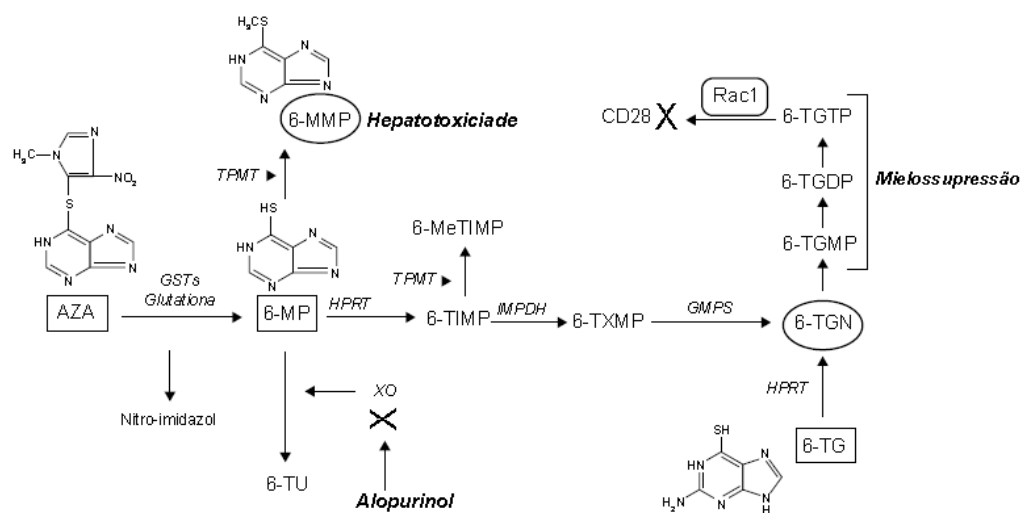
As formas TS do *T. cruzi* possuem moléculas em suas superfícies como as glicoproteínas da família da gp85, que contém sítios de ligação para a laminina e citoqueratina 18. As enzimas serina proteinases oligopeptidases (POP) Tc85 e Tc80 (80kDA) hidrolisam componentes da matriz extracelular como o colágeno (tipo I e IV) e a fibronectina, auxiliando a interação celular mediada principalmente por IP₃ (inositol-1,4,5-trifosfato), Akt (serina/treonina kinase) (Burleigh *et al.*, 1998; Grellier *et al.*, 2001; Araújo-Jorge *et al.*, 2008) e TGF-β. O processo de internalização celular em células epiteliais do pulmão é altamente dependente do TGF-β, pois o *T. cruzi* é incapaz de penetrar nestas células quando estas estão deficientes nos receptores para o TGF-β, confirmando a importância desta citocina (Ming *et al.*, 1996).

A oligopeptidase B auxilia uma importante via de sinalização e interação com as células do hospedeiro, pois induz a mobilização de Ca²⁺ intracitoplasmático, mediada por IP₃, em fibroblastos e cardiomiócitos (Burleigh *et al.*, 1998). Além desta via, a oligopeptidase B pode utilizar uma glicoproteína de peso molecular 70 – 200kDA, membro da família das trans-sialidases, que conflui na mobilização de Ca²⁺ intracitoplasmático participando assim do processo de internalização do parasito. A trans-sialidase gp85 possui ligantes para laminina e fibronectina e possui relação com a via de sinalização PI-3K. Estudos mostram que tratamentos que visam bloquear a interação da gp85 com a laminina ou com a fibronectina, diminuem o processo de penetração das formas TS do *T. cruzi* na célula hospedeira (Todorov *et al.*, 2000; Yoshida, 2006).

Reconhecendo os principais pontos que distinguem as formas infectantes do *T. cruzi* e suas interações distintas com as células do hospedeiro, pode-se inferir a respeito das alterações provocadas por essas formas infectantes sobre os parâmetros parasitológicos, imunológicos e patológicos, que podem refletir na evolução clínica da doença.

1.4 A azatioprina e o curso da infecção chagásica

Dentre os fármacos utilizados no intuito de controlar a resposta imune frente a uma situação de transplantes de órgãos, tem-se a Azatioprina (AZA). Sua principal atividade farmacológica (Figura 1) deve-se à incorporação do metabólito ativo, 6-tioguanina (6-TGN) ao DNA das células. Este metabólito ativo possui estrutura análoga às bases púricas, adenina e hipoxantina. A AZA é uma pró-droga de absorção oral, que pode ser convertida em 6-mercaptopurina (6-MP) através de uma clivagem não enzimática dependente da glutatona S-transferase (GSTs). A 6-MP é metabolizada pela tiopurinametiltransferase (TPMT) ao metabólito inativo 6-metilmercaptopurina (6-MMP) ou pela xantina oxidase (XO) no metabólito inativo ácido 6-tioúrico (6-TU). A 6-MP, competitivamente, pode ser metabolizada por processo enzimático sequencial nos seus potenciais metabólitos ativos, os nucleotídeos 6-TGN (Mahadevan *et al.*, 2002; Neto *et al.*, 2008).



AZA: azatioprina; GSTs: glutatona S-transferases; 6-MP: 6-mercaptopurina; TPMT: tiopurina metiltransferase; 6-MMP: 6-metilmercaptopurina; 6-TU: ácido 6-tioúrico; XO: xantina oxidase; HPRT: hipoxantina-fosforibosil transferase; 6-TIMP: 6-tioinosina monofosfato; 6-MeTIMP: 6-metiltioinosina monofosfato; IMPDH: inosina-5-monofosfato desidrogenase; 6-TXMP: 6-tioxantossina monofosfato; GMPS: guanidina 5-monofosfato sintetase; 6-TGN: 6-tioguanina; 6-TGMP: 6-tioguanina monofosfato; 6-TGDP: 6-tioguanina difosfato; 6-TGTP: 6-tioguanina trifosfato.

Figura 1: Esquema representativo do metabolismo da Azatioprina. (Extraído do artigo de Neto *et al.*, 2008).

Alguns aspectos das funções terapêuticas da AZA permanecem obscuros devido ao seu complexo metabolismo e do polimorfismo genético da enzima TPMT. Evidências sugerem que esses efeitos estejam relacionados à inibição da síntese dos nucleotídeos purina, com inibição da síntese de DNA e, conseqüente, redução da divisão e proliferação celular. Estes eventos induziriam a inibição da reação linfocitária através dos antígenos de diferenciação de célula T, o receptor B7 (antígeno CD80) o qual modula a ativação de célula T, e, conseqüentemente a redução da citotoxicidade dependente de linfócitos (pode atuar também sobre as células NK). Mais recentemente, relatou-se que os análogos da purina induzem também à apoptose de células T, mecanismo responsável pelo uso desse fármaco para o tratamento de doenças inflamatórias como a doença de Crohn (Huibregtse *et al.*, 2007; Neto *et al.*, 2008).

Os mecanismos também podem estar relacionados ao sítio de co-estimulação CD28, sendo que esse ligante pode aumentar no recrutamento de PI3K levando à ativação da proteína quinase atk/PKB (proteína quinase B). Outro mecanismo de ação pode estar relacionado à região YMNM e CD28, que medeiam a interação com GRB (receptor do fator de crescimento), sendo que a interação GRB e CD28 ativa GTPase Rac1 via troca de fator Vav (fator de troca de nucleotídeo guanina para as GTPases Rac e Rho) e adaptador de proteína SLP-76 (proteína de leucócitos de 76kD). A ligação ao CD28 leva ao aumento do fator de transcrição NF- κ B e do fator nuclear de ativação de células T (NFAT) (Maltzman e Koretzky, 2003; Visse *et al.*, 2003). Estudos com camundongos transgênicos CD28^{-/-} têm mostrado que a região YMNM é importante para regulação do gene Bcl-x1 (linfoma de células B – extragrande) e estimulação do CD28/TCR (receptor de células T) (Burr *et al.*, 2001; Okkenhaug *et al.*, 2001).

Dessa forma, os efeitos da AZA podem levar a um desequilíbrio da resposta imune celular promovida pelas células T, gerando na infecção pelo *T. cruzi*, o favorecimento da proliferação parasitária e, conseqüentemente, uma piora clínica no indivíduo acometido por esse parasito.

Os fatores que levam às alterações no sistema imune são diversos, e alguns podem facilitar a disseminação do *T. cruzi* e seu estabelecimento, podendo assim agravar o quadro clínico do indivíduo infectado. O quadro de infecção associado a alterações imunes pode ocorrer através de uma variedade de condições, incluindo o tratamento com drogas para a prevenção de rejeições em indivíduos transplantados (Almeida *et al.*, 1996; Couto *et al.*, 2001; Campos *et al.*, 2008), doenças imunossupressoras, tais como a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS) e leucemia (Sartori *et al.*, 1998a,b) ou indivíduos submetidos à quimioterapias (Ferreira *et al.*, 1997). Nestas situações, indivíduos na fase crônica da infecção chagásica, podem apresentar sinais característicos de fase aguda (Amato *et al.*, 1997a,b; Ferreira, 1999; Ramos Jr *et al.*, 2010).

1.5 O modelo canino no estudo da doença de Chagas

Uma das grandes dificuldades no estudo da DC estava relacionada a um modelo que reproduzisse os mecanismos patogênicos observados em seres humanos. Neste contexto, o cão (*Canis familiaris*) demonstrou ser um bom modelo para este estudo, pois este animal apresenta diversos aspectos relacionados à doença humana, como susceptibilidade à infecção e manifestações de fase aguda e crônica, sendo possível reproduzir as formas anatomoclínicas aguda sintomática, indeterminada e crônica cardíaca e descompensada fibrosante (Andrade e Andrade, 1980; Tafuri *et al.*, 1987; Lana *et al.*, 1992; Caliari *et al.*, 1995; Bahia *et al.*, 2002; Veloso *et al.*, 2008; Guedes *et al.*, 2004, 2007, 2008, 2009), como observadas em humanos (Chagas, 1909; Laranja, 1953; Bambirra, 1982).

A cardiopatia chagásica é um dos principais fatores que leva o indivíduo ao óbito. Um modelo que reproduza este quadro é de suma importância para elucidar os mecanismos imunopatogênicos da DC. Lana *et al.* (1992 e 1998) observaram cardiopatia em todos os cães infectados pela cepa Be-78 do *T. cruzi*, necropsiados entre 92 e 864 dias após o inóculo. Dessa forma, o cão se mostrou como excelente modelo para o estudo da DC, além de apresentar

resposta semelhante à humana frente ao tratamento com o benzonidazol (Guedes *et al.*, 2002).

Dessa forma, os resultados desses trabalhos têm colaborado com a pesquisa em DC, como forma de sugerir proximidades entre a imunopatologia do cão e a humana, fomentando o conhecimento, já que o cão se consolidou como um excelente modelo para o estudo da infecção chagásica.

2. Justificativa

Nos últimos anos nosso grupo de pesquisa tem buscado esclarecer alguns aspectos da DC modelo canino por diferentes formas de infecção do *T. cruzi*. Resultados de amostras do sangue periférico de cães infectados com as formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*, analisadas por citometria de fluxo, mostraram aumento no percentual dos linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico dos animais infectados pelas formas TM (Carneiro *et al.*, 2007). Avaliação do perfil de imunoglobulinas constatou maiores níveis séricos das imunoglobulinas no grupo infectado por formas TS em relação ao grupo infectado por TM (Coura Vital *et al.*, 2008). Análises destes mesmos grupos de animais evidenciaram maior produção de óxido nítrico sérico e maior expressão da enzima induzível do óxido nítrico (iNOS) no tecido muscular cardíaco do grupo infectado por formas TM (Vieira *et al.*, 2009). Enquanto que resultados por IHQ no átrio direito (AD) e septo interventricular (SI) dos cães infectados por formas TM, mostraram aumento de células T CD8⁺ no coração destes animais em comparação aos grupos TS e NI (Souza, 2010).

O conhecimento sobre a infecção chagásica associada ao efeito de fármaco que alterem a resposta imune no modelo cão é escasso e os dados referentes às alterações imunológicas promovidas por fármacos são oriundos de relatos de casos de indivíduos submetidos a transplantes de órgãos e, conseqüentemente, submetidos a protocolos imunossupressivos (Amato *et al.*, 1997). Dessa forma, há necessidade da realização de estudos para desvendar os quadros inerentes às alterações imunológicas em relação às diferentes formas de infecção pelo *T. cruzi*, e em paralelo mostrar a identificação das alterações que porventura possam ser evidenciadas através do uso de fármacos que levem a alterações do sistema imune. Este estudo, por sua vez, auxiliará o melhor entendimento dos aspectos intrínsecos às respostas e às alterações imunes frente à infecção chagásica, principalmente em pacientes que fazem uso da Azatioprina ou mesmo em casos de co-infecções entre *T. cruzi* e quaisquer outras enfermidades que possam levar a quadros que alterem o sistema imune, como a leucemia e AIDS.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Avaliar a resposta imunopatológica cardíaca durante a fase aguda da infecção de cães por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, frente ao efeito da Azatioprina.

3.1.1 Objetivos específicos

3.1.1.1 Qual o perfil imunopatológico cardíaco na infecção de cães por formas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas?

3.1.1.2 Quais as alterações no perfil imunopatológico cardíaco relacionadas à infecção de cães por formas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas submetidos ao tratamento com a Azatioprina?

3.1.1.3 Qual o impacto do tratamento com a Azatioprina sobre o curso da infecção de cães por formas tripomastigotas metacíclicas e sanguíneas?

Para responder os questionamentos anteriores, realizou-se:

Avaliação qualitativa e quantitativa no tecido muscular cardíaco do (a):

Parasitismo;

Processo inflamatório;

Fibrose.

Quantificação da expressão relativa de mRNA no tecido muscular cardíaco das (os):

Citocinas:

Pró-inflamatórias: IL-12p40, TNF- α e IFN- γ ;

Th2: IL-4;

Imunomodulatórias: TGF- β 1 e IL-10;

Enzima: iNOS;

Quimiocinas: CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES;

Receptores: CCR5 e *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9).

4. Material e Métodos

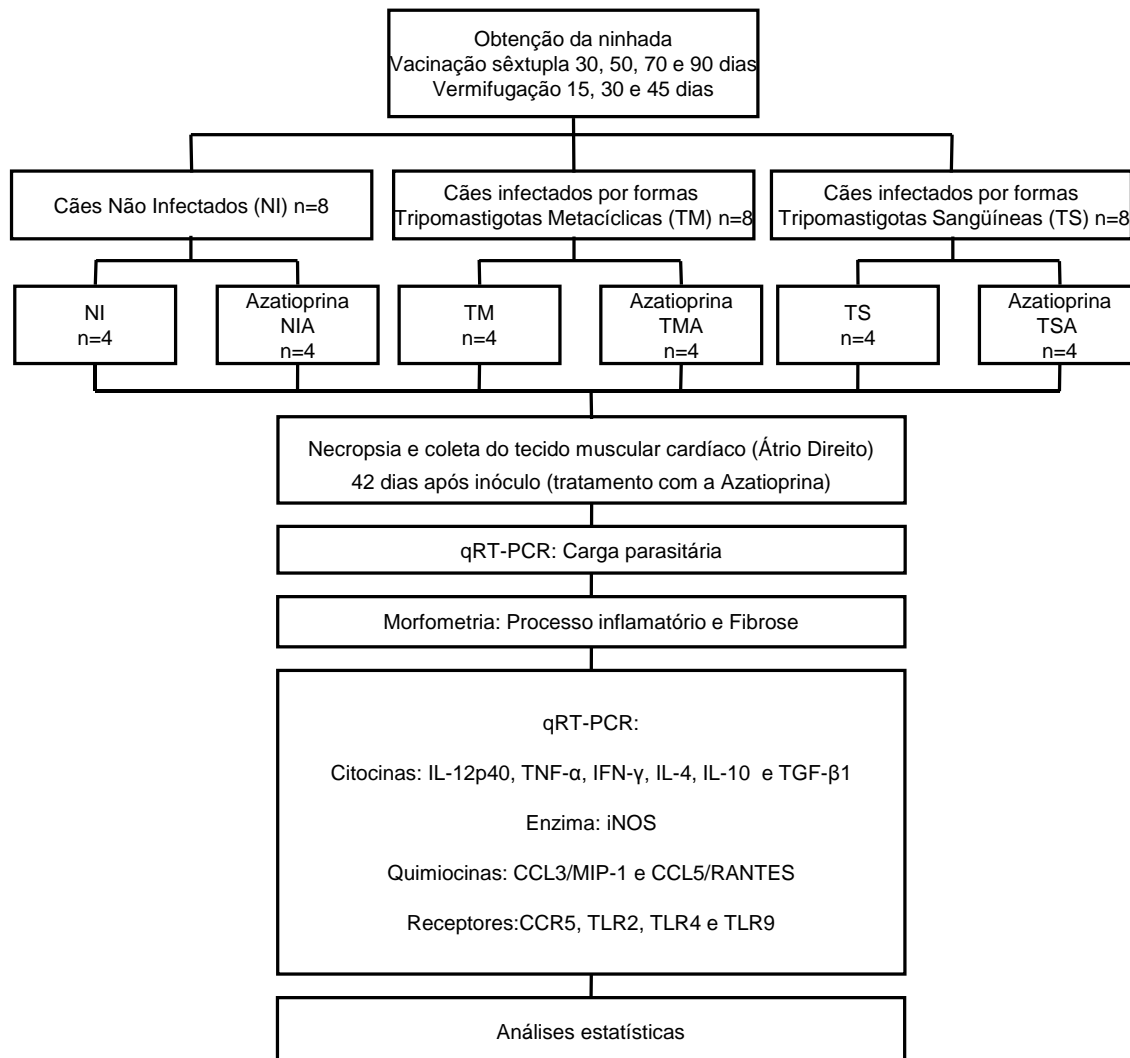


Figura 2: Delineamento experimental contendo a distribuição dos animais nos seis grupos experimentais e metodologia utilizada. NI: Não Infectado, TM: infectado por formas *Tripomastigotes* Metacíclicas, TS: infectado por formas *Tripomastigotes* Sanguíneas, NIA: Não Infectado e tratados com a Azatioprina, TMA: infectado por formas *Tripomastigotes* Metacíclicas e tratados com a Azatioprina e TSA: infectado por formas *Tripomastigotes* Sanguíneas e tratados com a Azatioprina.

4.1 Atividades previamente realizadas

4.1.1 Animais

Foram utilizados 24 cães jovens sem raça definida, de ambos os sexos (doze machos e doze fêmeas), procedentes do Setor de Criação de Cães do Centro de Ciência Animal (CCA) da Universidade Federal de Ouro Preto (UFOP).

Durante o período de amamentação realizou-se o controle de endo e ectoparasitoses. Aos 30, 50, 70 e 90 dias de idade os animais foram vacinados pela via subcutânea no dorso anterior, com a vacina *Vanguard* HTLP5/CV-L Laboratório *Pfizer* LTDA, contra Parvovirose, Cinomose, Leptospirose canina, Coronavírus, Adenovírus Tipo 2 e Parainfluenza.

4.1.2 Inóculo

Aos quatro meses de idade, os animais foram distribuídos em seis grupos experimentais: não infectados (NI, n=4), não infectados e tratados com a Azatioprina (NIA, n=4), infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM, n=4), infectados por formas tripomastigotas metacíclicas e tratados com a Azatioprina (TMA, n=4), infectados por formas tripomastigotas sanguíneas (TS, n=4) e infectados por formas tripomastigotas sanguíneas e tratados com a Azatioprina (TSA, n=4) (Figura 02). Para o inóculo dos animais, foram utilizadas 2000 formas TM ou TS por quilograma (kg) de massa corporal dos cães.

Formas TM foram obtidas de ninfas de *Triatoma infestans*, e as formas TS foram obtidas de camundongos. Ambas as formas de infecção são oriundas da cepa Be-78 do *T. cruzi*. Esta cepa foi isolada por xenodiagnóstico em 1978 (Lana e Chiari, 1986) da paciente Berenice, considerada o primeiro caso humano da doença descrito na literatura (Chagas, 1909).

4.1.3 Tratamento com a Azatioprina

Os cães dos grupos NIA, TMA e TSA receberam AZA 2mg/Kg pela via oral (Rinkardt *et al.*, 1999), todos os dias a partir do dia do inóculo, até o 42º dia, culminando com a necropsia dos cães.

4.1.4 Necropsia, coleta e fixação

Após 42 dias do inóculo, os cães foram eutanasiados (0,5 ml/Kg por via endovenosa de tiopental sódico – 0,03g/ml de solução salina 0,8%) com posterior necropsia e coleta dos fragmentos de diferentes tecidos, sendo estes fixados em formol a 4% em pH 7,2 - 7,4 ou criopreservados em freezer -80°C.

4.2 Atividades realizadas neste estudo

4.2.1 Extração de DNA

Os fragmentos do AD, previamente armazenados a -80°C, foram cortados com auxílio de lâmina de bisturi, pesados, obtendo-se fragmentos de aproximadamente 30 mg. As amostras foram transferidas para tubos de 1,5 ml e em seguida foram realizados os procedimentos de extração do DNA utilizando o kit *Wizard™ Genomic DNA Purification Kit* (Promega, Madison, WI, USA), seguindo as recomendações do fabricante com algumas modificações: foram adicionadas aos tubos, contendo os tecidos, 500 µL de solução de lise nuclear e mantido em gelo por 2 minutos. Após homogeneização por inversão dos tubos, foi adicionado 30 µL de Proteinase K (Sigma-Aldrich®, USA) na concentração de 20 mg/ml. Estes foram mantidos *overnight* em banho seco a 55°C. Após este período, foram adicionados 3 µL de RNase e as amostras foram incubadas por 30 minutos em banho seco a 37°C. Após incubação, os tubos foram mantidos em temperatura ambiente por 5 minutos e foram adicionados 200 µL de solução de precipitação de proteínas. Com o auxílio do vortex (Vision Scientific®, Korea), as amostras foram homogeneizadas por 20 segundos e posteriormente centrifugadas por 5 minutos a

16.000 g (Microcentrífuga Eppendorf®- Modelo 5418, NY, USA). Em seguida, o sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600 µL de isopropanol (Merck®, Darmstad, Alemanha). Esse tubo foi então homogeneizado e centrifugado por 1,5 minutos a 16.000 g. Após centrifugação, foi descartado o sobrenadante e adicionado 200 µL de solução de etanol 70% (Merck®, Darmstad, Alemanha). Posteriormente foi realizada uma nova centrifugação a 16.000 g, e novamente descartado o sobrenadante. Os tubos foram mantidos abertos para evaporação do etanol 70% remanescente e em seguida foram adicionados 100 µL de solução de hidratação. O DNA permaneceu reidratando por 24h à temperatura ambiente e posteriormente foi realizada a dosagem do DNA em nanoespectrofotômetro (Nanodrop®, GE Healthcare, USA). Após a dosagem as amostras foram armazenadas a -20°C até o momento da análise por qRT-PCR.

4.2.2 Curva padrão e determinação da carga parasitária por qRT-PCR

Para realizar a quantificação dos parasitos por qRT-PCR, fez-se necessário realizar uma curva padrão para determinar o número de cópias do DNA do parasito. Para tal, utilizou-se epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, crescidas em meio de cultura, até atingir o número de 1×10^8 parasitos, os quais foram submetidos ao protocolo de extração de DNA (conforme descrito acima). Em seguida, a concentração e a qualidade do DNA obtido foram determinadas por espectrofotômetro (Nanodrop, a GE Healthcare Products) e em cada reação de qRT-PCR foram utilizados 10 µL da amostra extraída, contendo 50 ng de DNA genômico e 5 µL de SYBR Green PCR Mastermix (Applied Biosystems). Os iniciadores para o DNA do *T. cruzi* foram: TCZ - F 5' - GCTCTTGCCCACAMGGGTGC - 3', em que M = A ou C, e TCZ - R 5' - CCAAGCAGCGGATAGTTCAGG - 3'; amplificando um fragmento de 182 pb (Cumming e Tarleton, 2006). Cada placa de reação de 96 poços continha a curva padrão, criada a partir de uma solução obtida pela extração na concentração de 1×10^8 epimastigotas da cepa Y do *T. cruzi*. Dessa solução, procederam-se diluições seriadas em água (1:10) para obter os pontos da curva, que é medida a partir de DNA equivalente a 1×10^6 até um parasito. A placa continha controles

negativos que foram submetidos à reação com os iniciadores específicos do *T. cruzi* e AD de cão NI; também foram utilizados como controle negativo da reação poços com iniciadores específicos do *T. cruzi* e água, sem a presença de DNA. Cada amostra de DNA foi quantificada em triplicata.

4.2.3 Técnicas histológicas

4.2.3.1 Coloração pela Hematoxilina Eosina

Para a quantificação do processo inflamatório, os cortes histológicos do AD 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 de Harris por 10 minutos e lavados em água corrente, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (100 ml de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e novamente lavados em água corrente para evitar acidificação excessiva. Posteriormente, foram corados pela Eosina, por 30 segundos. Após a última lavagem em água corrente, foram desidratados em dois banhos de álcool absoluto, levados à estufa a 56°C para secagem e montados com lamínula e Entellan.

4.2.3.2 Coloração pelo Tricrômico de Masson

Para a quantificação do tecido conjuntivo fibroso, as lâminas contendo os cortes histológicos do AD 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 de Harris por 30 segundos e lavados em água corrente (5 minutos) para retirada do excesso do corante. Os cortes foram corados pela solução número I (Sudam III – em solução alcoólica a 1% - mais fucsina ácida – solução aquosa a 1% - e ácido acético glacial) por 1 minuto e em seguida foram lavados em água corrente por 30 segundos. Gotejou-se a solução número II (ácido fosfotúngstico, ácido

fosfomolibdico e água destilada) sobre os cortes histológicos por 10 minutos, seguidos de lavagem em água corrente por 30 segundos. Aplicou-se a solução número III (azul de anilina, água destilada e ácido acético glacial) por 5 minutos, com posterior lavagem em água corrente por 30 segundos, os quais foram desidratados, em dois banhos de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e montados com lamínula e Entellan.

4.2.3.3 Quantificação morfométrica do processo inflamatório e do tecido conjuntivo fibroso

Os fragmentos do AD dos cães foram avaliados através da análise morfométrica das lâminas submetidas às técnicas de coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) ou Tricrômico de Masson. As imagens foram visualizadas e capturadas através da objetiva de 40x e ocular de 10x do microscópio *Leica DM5000B*, e foram digitalizadas pela câmara *Leica DFC340 FX* e o programa *Leica Application Suite* (Versão 2.4.0 R1). Para a análise das imagens obtidas utilizou-se o programa *Leica QWin V3*. Para análise do processo inflamatório foram capturadas 15 imagens (campos) aleatórias em uma área total percorrida igual a $1,125 \times 10^6 \mu\text{m}^2$ as quais foram submetidas à quantificação semiautomática dos núcleos celulares (Maltos *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2007). Para a neoformação de colágeno (tecido conjuntivo fibroso) foram utilizadas 20 imagens em uma área de $1.5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, sendo que a área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso dos cortes histológicos corados pelo Tricrômico de Masson foi quantificada através dos pixels contendo tons de cor azul, os quais foram selecionados para a criação de uma imagem binária e estes tons azuis foram posteriormente utilizados para o cálculo da área total ocupada por fibrose, conforme equações abaixo:

$$\text{Porcentagem de colágeno} = \frac{\text{Área do colágeno}}{\text{Área do colágeno} + \text{Área do tecido}} \times 100$$

$$\text{Colágeno acertado} = \frac{\text{Percentual do colágeno} \times \text{Área do}}{100}$$

4.2.3.4 Reação de Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) foi utilizada para a análise qualitativa do parasitismo no AD dos cães infetados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*. Para tal, as lâminas foram desparafinizadas em duas trocas de xilol, hidratadas em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e então lavadas em água corrente. Após hidratação (5 minutos), as lâminas foram imersas por 5 minutos em PBS (Phosphate Buffer Saline) pH 7,2 - 7,4. Em seguida, procedeu-se o bloqueio da peroxidase endógena por imersão dos cortes histológicos por 30 minutos em PBS/Peróxido de Hidrogênio 30% (1:10) à temperatura ambiente, e em seguida as lâminas foram imersas em 3 banhos de PBS (5 minutos cada). Realizou-se bloqueio dos sítios inespecíficos com soro normal de cabra diluído em PBS na proporção de 1:50, sendo os cortes incubados em câmara úmida à temperatura ambiente (30 minutos).

Após essa etapa, os cortes foram incubados com os anticorpos primários (Anti-*T. cruzi* – produzido pelo Laboratório de Imunopatologia, na diluição de 1:1000 em PBS/Albumina 0,1%) durante 16-18 horas em câmara úmida (2–8°C) e posteriormente receberam 3 banhos em PBS (5 minutos cada). Em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário (Anti-IgG de coelho, produzido em cabra e diluído em PBS/Albumina 0,1% na proporção de 1:200) por 30 minutos em câmara úmida à 37°C, seguido de 3 banhos em PBS (5 minutos cada). Aplicou-se então o complexo peroxidase-antiperoxidase (PAP – SIGMA – diluído na proporção de 1:250 em PBS/Albumina 0,1%) onde os cortes foram incubados em câmara úmida por 30 minutos a 37°C, seguido de 3 banhos em PBS (5 minutos cada).

A marcação celular foi revelada pela ação da enzima peroxidase, que age sobre o seu substrato 3.3'-diaminobenzidine (DAB), formando um precipitado

sobre a célula que contém o epítipo alvo da marcação do anticorpo primário, usado na imunomarcação. Para tal reação, utilizou-se 500 ml de PBS (phosphate buffer saline – pH 7,2 - 7,4) para 100 mg de DAB, a solução foi filtrada em papel filtro e acrescida de 1 ml de peróxido de hidrogênio 30% na cuba usada para a revelação. Os cortes foram imersos nesta solução (5 minutos) à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas permaneceram (5 minutos) imersas em água corrente com o objetivo de bloquear a ação da enzima peroxidase. Para contraste, utilizou-se Hematoxilina de Harris (5 segundos) e novamente os cortes foram imersos em água corrente (5 minutos), imersos em álcool absoluto (1 minuto), levados à estufa de secagem (56°C) e montados com Entellan e lamínula. As lâminas foram então analisadas e regiões representativas foram visualizadas e capturadas através da objetiva de 40x e ocular de 10x do microscópio *Leica DM5000B*, e foram digitalizadas pela câmara *Leica DFC340 FX* e o programa *Leica Application Suite* (Versão 2.4.0 R1).

4.2.4 Análise da expressão gênica pela qRT-PCR

4.2.4.1 Extração e purificação do RNA total das amostras de tecido

Fragmentos do AD, de massa entre 20-30 mg, foram imersos em 1,0 ml de *TRIzol® Reagent* (Invitrogen São Paulo, SP, Brasil) em tubo de 1,5 ml e macerados utilizando o aparelho *Politron* (Modelo OV5, VELP) até total fragmentação do tecido. Para assegurar a pureza do material, os instrumentos utilizados no processo de maceração foram lavados com água tratada com Dietil-Pirocarbonato (DEPC) e posteriormente limpos com gaze embebida em removedor de nucleases (RNAses) *RNAse Away* (Invitrogen, São Paulo).

Após a maceração, o conteúdo 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. Em seguida, foram adicionados 0,2 ml de clorofórmio (Sigma, St. Louis, MO, USA) para cada 1,0 ml de *TRIzol* nos

tubos contendo o homogeneizado. Subsequentemente foram fechados e agitados vigorosamente por 15 segundos e incubados por 7 minutos à temperatura ambiente. As amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 12.000 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 450 µL de etanol 95% v/v (preparado com água tratada com DEPC) e homogeneizado para que ocorresse a precipitação do RNA total.

Utilizou-se o kit de extração de RNA total (SV total RNA Isolation System - Promega, Madison, WI, USA) para purificação do RNA total contido na amostra, no entanto procederam-se algumas adequações descritas a seguir: a fase aquosa que foi homogeneizada com etanol, contendo o RNA foi transferida para o *spin basket* acoplado ao tubo coletor de 2,0 ml e centrifugado a 12.000 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 g por 2 minutos. Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com DNase, assegurando a ausência de contaminação por DNAg (DNA genômico). Posteriormente, foram adicionados 200 µL de *SV DNase Stop Solution* para inibir a atividade enzimática da DNase. O tubo foi então centrifugado a 12.000 g por 2 minutos e o líquido contido no tubo coletor foi descartado. Foram adicionados 600 µL de solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) e centrifugados por 12.000 g por 2 minutos. Foram acrescentados 250 µL da solução de lavagem (SV RNA Wash Solution) seguido de centrifugação a 14.000 g por 3 minutos. O spin foi transferido para um tubo de eluição e foram adicionados 100 µL de água livre de nuclease, seguido de centrifugação a 12.000 g por 2 minutos. Em seguida, as amostras foram armazenadas em freezer -80°C.

4.2.4.2 Dosagem, avaliação do grau de pureza e integridade do RNA

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 absorbância obtidos a 260 e 280 nm. O grau de contaminação por fenol foi avaliado pela absorbância a 320 nm. As amostras que apresentaram

absorbância 260/280 nm acima de 1,8 foram consideradas com grau de pureza satisfatório. Em seguida, procedeu-se à realização do gel de agarose a fim de verificar a integridade das amostras de RNA extraído (Figura 3).

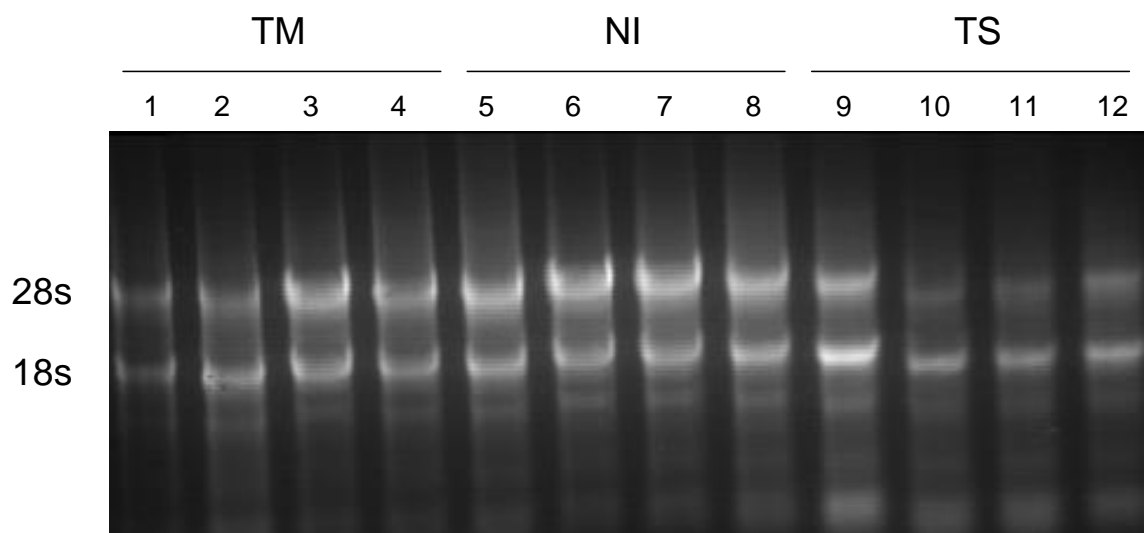


Figura 3: Gel de agarose a 1,2%, representativo da integridade das amostras de RNA extraídos. Verificam-se as bandas íntegras referentes às subunidades ribossômicas 28s e 18s, respectivamente.

4.2.4.3 Síntese da 1ª fita de DNA complementar – cDNA

Para a síntese da primeira fita de cDNA, utilizou-se do kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription kit* (PE Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Adicionou-se em tubo 1,0 µg de RNA total presente em um volume final máximo de 10 µL. Em seguida, foram adicionados 10 µL do mix de transcrição reversa em todos os tubos contendo RNA, e estes foram colocados no termociclador *Veriti™ Thermal Cycler* (PE Applied Biosystems) nas seguintes condições: um ciclo de 10 minutos a 25°C, um ciclo de 120 minutos a 37°C, um ciclo de 15 segundos a 85°C e um ciclo de 5 minutos a 10°C, sucessivamente. Finalizado, os tubos foram armazenados à temperatura de -20°C.

4.2.4.4 Detecção dos níveis de citocinas, iNOS, quimiocinas, CCR5 e receptor Toll-like por qRT-PCR

Para avaliar a expressão gênica no AD, foram utilizados 3 µL dos *primers* na concentração de 2,5 pM, cinco µL de SYBR™ Green, 2 µL de cDNA diluído 5 vezes com água livre de DNase, totalizando o volume final de 10 µL.

O experimento foi realizado em triplicata para todos os genes, com a presença do gene constitutivo, o Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH) na mesma placa que os genes avaliados. Os resultados serão expressos pelo método $2^{-\Delta Ct} = 2^{-(Ct_{\text{Gene alvo}} - Ct_{\text{GAPDH}})}$. Os valores obtidos pelo método $2^{-\Delta Ct}$ foram multiplicados por 1000. Dessa forma, impetramos números inteiros e positivos, auxiliando a visualização e análise dos resultados.

4.2.4.5 Sequência dos primers

Para realizar a qRT-PCR, foram empregados *primers* (Tabela 1) desenhados nas sequências *Forward* (F) e *Reverse* (R) (software Gene Runner - versão 3.05, 1994).

Tabela 1: Sequências dos primers *forward* e *reverse* referente aos genes avaliados, contendo sua respectiva função

Gene	Sequência de nucleotídeos (5' – 3')	Função
GAPDH	F: 5' – CTA CCC ACG GCA AAT TCC – 3'	Constitutivo
	R: 5' – ACT CAG CAC CAG CAT CAC – 3'	
IL-12p40	F: 5' – CAG CAG AGA GGG TCA GAG TGG – 3'	Citocina
	R: 5' – ACG ACC TCG ATG GGT AGG C – 3'	
TNF- α	F: 5' – CGT CCA TTC TTG CCC AAA C – 3'	Citocina
	R: 5' – AGC CCT GAG CCC TTA ATT C – 3'	
IFN- γ	F: 5' - TCA ACC CCT TCT CGC CACT - 3'	Citocina
	R: 5' - GCT GCC TAC TTG GTC CCT GA - 3'	
IL-10	F: 5' - AGA ACC ACG ACC CAG ACA TC - 3'	Citocina
	R: 5' – CCA CCG CCT TGC TCT TAT TC – 3'	
TGF- β	F: 5' – AGG ATC TGG GCT GGA AGT G – 3'	Citocina
	R: 5' – CGG GTT GTG CTG GTT GTA – 3'	
IL-4	F: 5' – CAC CTC CCA ACT GAT TCC AA – 3'	Citocina
	R: 5' – CTC GCT GTG AGG ATG TTC AA – 3'	
iNOS	F: 5' – GCCCTGTGCCTCGGATAATC – 3'	Enzima
	R: 5' – CCACGGAAGAAGTTAAAGTTG – 3'	
CCL3/MIP-1 α	F: 5' – GTC TCCA AGC AGA TTC CA – 3'	Quimiocina
	R: 5' – CTG GTC TCA AAG CAG TC – 3'	
CCL5/RANTES	F: 5' – TTC TAC ACC AGC AGC AAG – 3'	Quimiocina
	R: 5' – TTC TAC ACC AGC AGC AAG – 3'	
CCR5	F: 5' – TCC TTC TCC TGA GAC CCTT – 3'	Receptor
	R: 5' – CCC GAC GAA AGC ATA GAT – 3'	
TLR2	F: 5' – CCT CTC GGT GTC GGA ATG TC – 3'	Receptor <i>Toll-like</i>
	R: 5' – ATG GAA ACG GTG GCA CAG – 3'	
TLR4	F: 5' – CTC CTG TGG TGC TTC TTG C – 3'	Receptor <i>Toll-like</i>
	R: 5' – TGA ATC ATC CGC CCT TAG – 3'	
TLR9	F: 5' – TGC GGC GTC TCA ATC TCA – 3'	Receptor <i>Toll-like</i>
	R: 5' – AGG AAG GTG TTG GGC TCA A – 3'	

5. Análise estatística

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o pacote de *software Prism 5.0* (Software Prism, Irvine, CA, EUA). *Kruskal-Wallis* e pós-teste de *Dunn* foram utilizados para comparar os diferentes grupos. O teste de *Mann-Whitney* foi utilizado para determinar as diferenças em relação ao parasitismo tecidual entre os grupos infectados e/ou infectados e tratados com a Azatioprina, sendo que a análise de correlação foi realizada através da correlação de *Spearman* para investigar o parasitismo *versus* processo inflamatório e parasitismo ou o processo inflamatório *versus* expressão relativa de mRNA de citocinas, quimiocinas e receptor CCR5 assim como dos receptores *Toll-like*. Os valores foram expressos como mediana \pm erro padrão. Em todos os casos as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

6. Resultados I

6.1 Aspectos qualitativos e quantitativos do parasitismo no Átrio Direito por IHQ e qRT-PCR

Os aspectos qualitativos e quantitativos do parasitismo no fragmento AD dos cães infectados por formas TM ou TS, da cepa Be-78 do *T. cruzi* estão mostrados na Figura 4. Em A tem-se fotomicrografias de cortes histológicos submetidos à técnica de imuno-histoquímica, como forma de mostrar os aspectos qualitativos observados entre as duas formas de infecção, ressaltando o maior número de parasitos nos cães infectados por formas TS em relação aos cães infectados por formas TM. A quantificação da carga parasitária foi determinada através do número de cópias de DNA do *T. cruzi* utilizando qRT-PCR. Na Figura B, observa-se o maior número de cópias do DNA do *T. cruzi* nos cães infectados por formas TS comparado aos cães infectados por formas TM ($p < 0,05$), o que corrobora o observado na análise qualitativa do parasitismo tecidual.

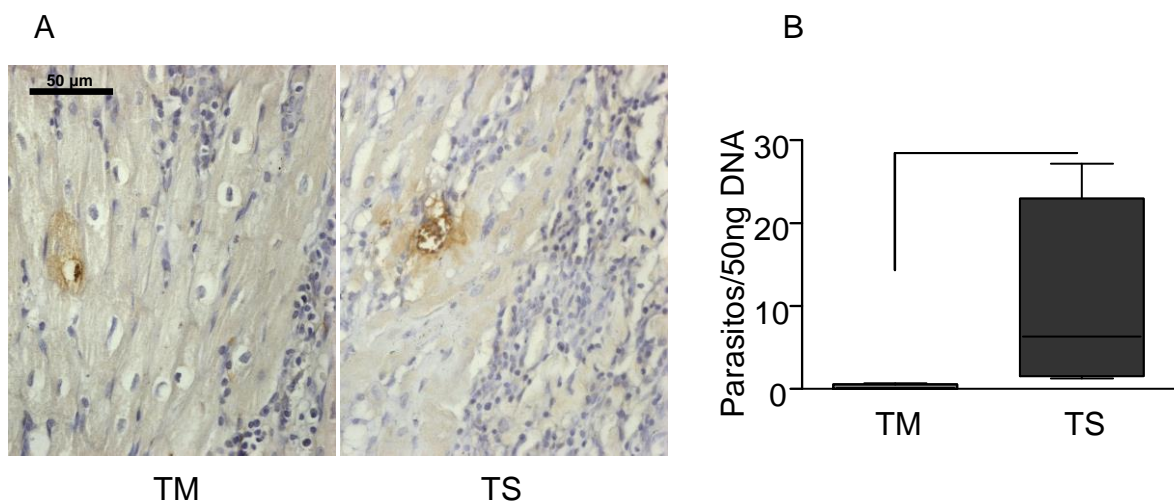


Figura 4: Análise qualitativa e quantitativa do parasitismo no Átrio Direito (AD) de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda. (A) Fotomicrografias de cortes histológicos do tecido muscular cardíaco submetido à técnica de imuno-histoquímica evidenciando os aspectos qualitativos. (B) Quantificação do número de cópias dos parasitos em 50ng de DNA detectado por qRT-PCR. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

6.2 Aspectos qualitativos e quantitativos do processo inflamatório no átrio direito em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina

Estão apresentadas na Figura 5 as análises, qualitativa e morfométrica, do processo inflamatório no AD de cortes histológicos corados pela HE de cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*. Na Figura 5A, observam-se os aspectos histológicos compatíveis com quadro de normalidade no grupo NI, assim como nos cortes histológicos dos cães infectados por formas TM. Entretanto, nos cães infectados por formas TS, nota-se destruição das fibras musculares cardíacas, isso devido ao elevado número de células inflamatórias. A Figura 5B apresenta o resultado obtido pela quantificação morfométrica dos núcleos celulares, onde se evidencia o processo inflamatório presente nos cortes histológicos. Dessa forma, constata-se o aumento do processo inflamatório nos cães infectados por formas TS em relação aos cães infectados por formas TM e também em comparação aos cães do grupo NI.

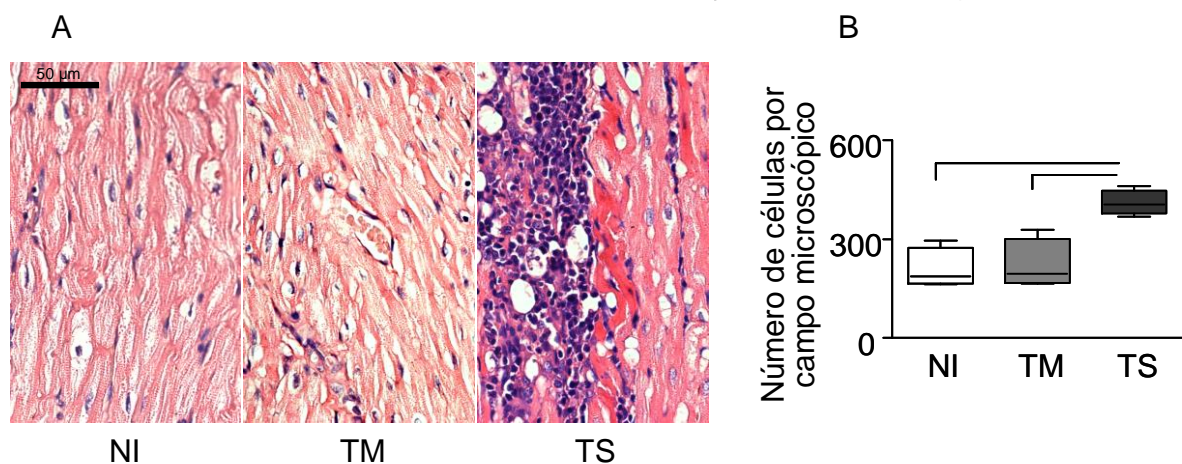


Figura 5: Avaliação qualitativa e quantitativa do processo inflamatório no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NI) e infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda. (A) Nas fotomicrografias, observa-se padrão histológico compatível com quadro de normalidade no grupo NI, semelhante ao observado no grupo TM, bem como intenso processo inflamatório nos cães infectados por formas TS. (B) Nota-se alto processo inflamatório nos cães infectados por formas TS em comparação aos cães infectados por formas TM e ao grupo NI. Linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão. Hematoxilina Eosina (HE).

6.3 Análise de correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório

Os resultados da correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório no AD de cães infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi* estão mostrados na Figura 6. Verifica-se que há correlação positiva ($r = 0,8095$ $p = 0,0218$) entre esses parâmetros, evidenciando que o aumento do processo inflamatório está diretamente relacionado ao elevado número de parasitos, principalmente nos animais infectados por formas TS.

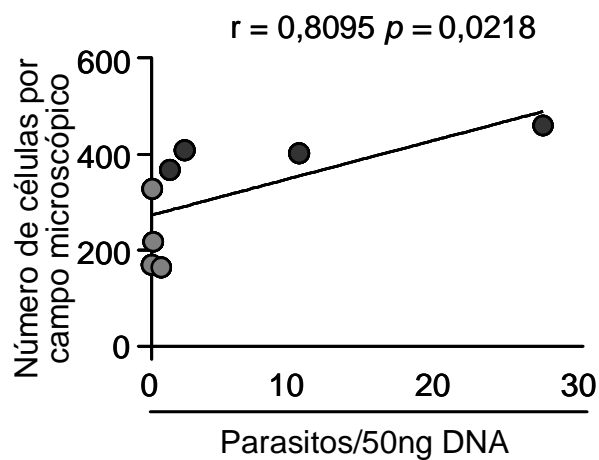


Figura 6: Correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório no Átrio Direito (AD) de cães infectados por formas *Tripomastigotas Metacíclicas* (TM;●) ou *Tripomastigotas Sanguíneas* (TS;●) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. A Correlação de Spearman e os índices são mostrados no gráfico.

6.4 Aspectos qualitativos e quantitativos da fibrose no átrio direito em cortes histológicos corados pelo tricrômico de masson

A análise qualitativa e morfométrica da fibrose no AD dos cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi* está apresentada na Figura 7. A Figura 7A mostra o quadro histológico sem diferenças na formação do tecido conjuntivo fibroso nos animais do grupo NI, infectados por formas TM ou TS, respectivamente. Em 7B, observa-se os resultados obtidos através da quantificação morfométrica dos pixels em tons de azul a fim de obter a quantificação da área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso (área de colágeno) nos cortes histológicos. Dessa forma, aspectos qualitativos são confirmados, não havendo diferença quantitativa entre os três grupos avaliados.

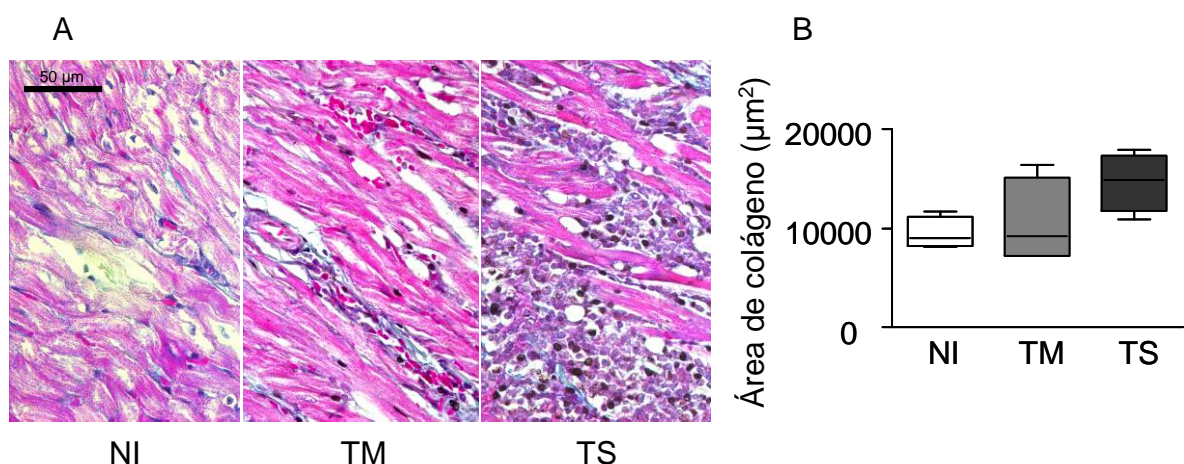


Figura 7: Avaliação qualitativa e quantitativa da neoformação de colágeno de no Átrio Direito (AD) em cães Não Infectados (NI) e infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda. (A) Observa-se padrão histológico similar nos três grupos avaliados quanto à neoformação de colágeno. (B) Na análise morfométrica da área ocupada por fibrose (área de colágeno), constata-se que não há diferenças entre os três grupos avaliados. Linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão. Tricrômico de Masson.

6.5 Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas por qRT-PCR

A Figura 8 apresenta os gráficos referentes às análises da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, TNF- α e IFN- γ), Th2 (IL-4) e imunomodulatórias (IL-10 e TGF- β 1) por qRT-PCR. Os dados foram obtidos do AD de cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*.

Em 8A está apresentado o resultado obtido para expressão relativa de mRNA da citocina IL-12p40. A análise revelou maior expressão desta citocina nos cães infectados por formas TS em relação ao grupo NI. Os níveis da expressão relativa de mRNA do IFN- γ e TNF- α estão mostrados na Figura 8C e E, respectivamente; onde observa-se maior expressão nos cães infectados por formas TS em relação ao grupo NI e em comparação aos animais infectados por formas TM, para ambas as citocinas.

Os resultados da expressão relativa de mRNA das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β 1 estão mostrados na Figura 8B, D e F, respectivamente. Observa-se maior expressão destas citocinas nos cães infectados por formas TS, em relação aos animais infectados por formas TM e ao grupo NI.

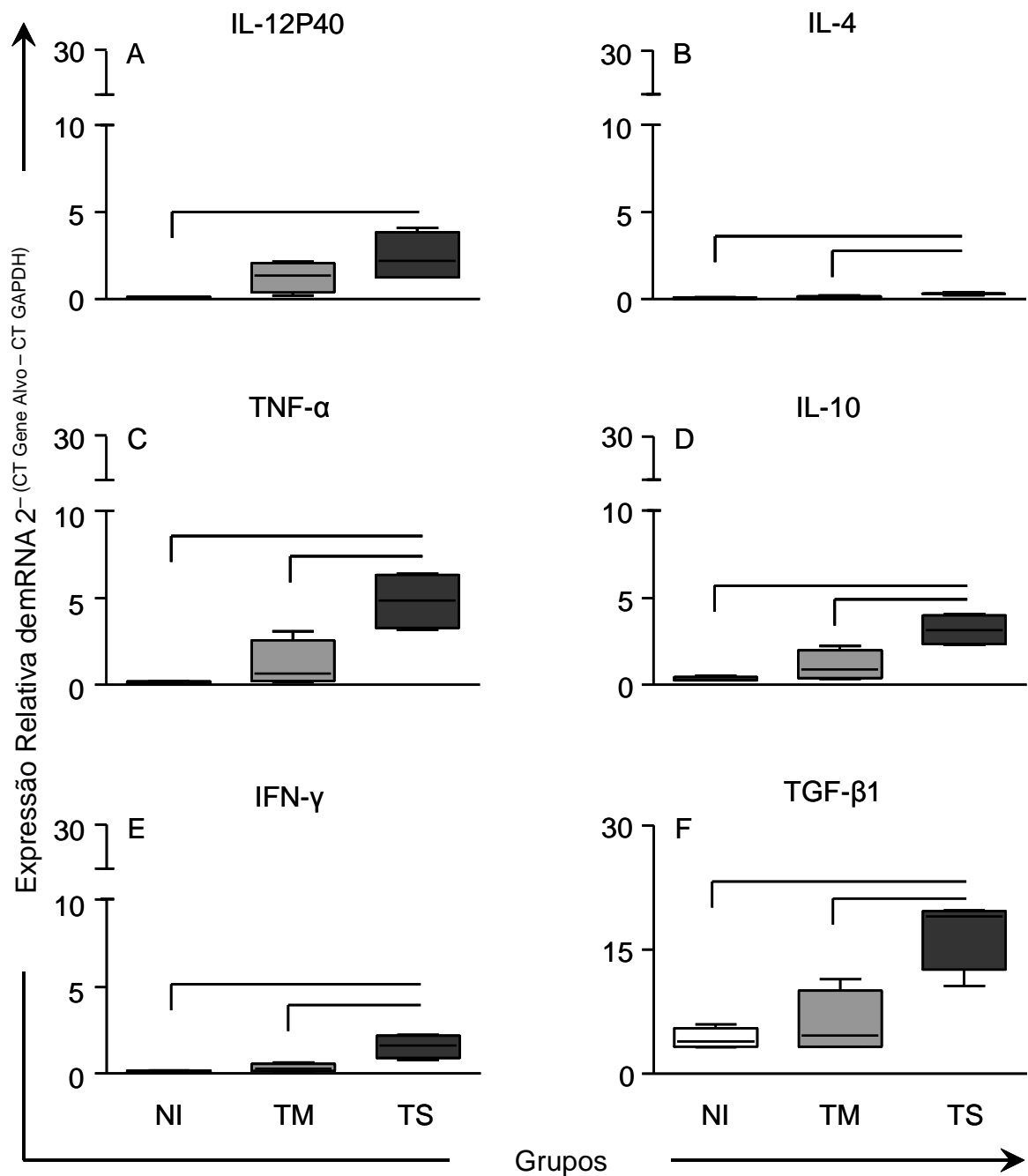


Figura 8: Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β 1 em amostras no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NI), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$), Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

6.6 Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor destas quimiocinas CCR5 por qRT-PCR

As análises da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e do receptor de ambas as quimiocinas, o CCR5 de cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*, estão mostradas na Figura 9. Observa-se aumento da expressão de CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES (Figuras 9A e B) e também do receptor CCR5 (Figura 9C) nos cães infectados por formas TS em comparação ao grupo NI.

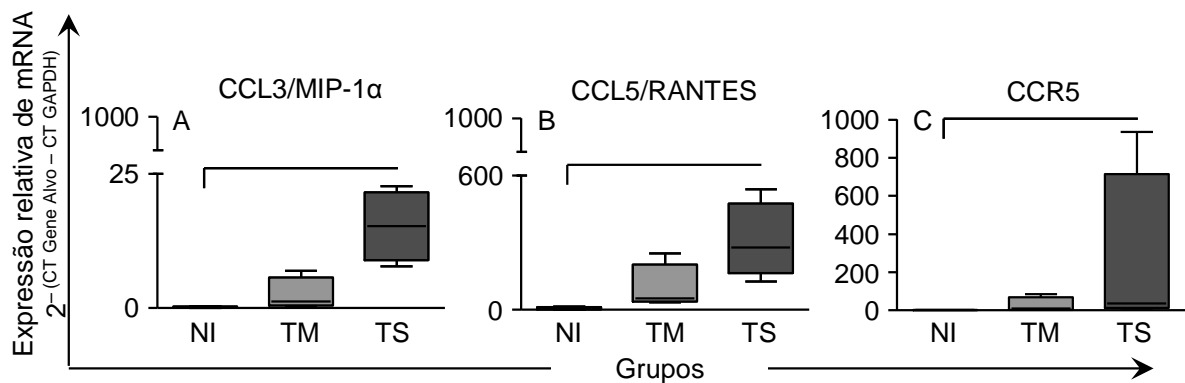


Figura 9: Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e do receptor CCR5 em amostras no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NI), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

6.7 Análise da expressão relativa de mRNA dos receptores Toll-like e da enzima iNOS por qRT-PCR

Os resultados obtidos das análises da expressão relativa de mRNA dos receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9) e da enzima iNOS no AD de cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi* são mostrados na Figura 10. Observa-se aumento da expressão de TLR2 e TLR4 nos animais infectados por formas TM em relação ao grupo NI (Figura 10A e B). No entanto, verifica-se aumento da expressão relativa de TLR9 nos cães infectados por formas TS em comparação ao grupo NI (Figura 10C). Nenhuma diferença foi observada na análise da expressão da enzima iNOS no AD (Figura 10D).

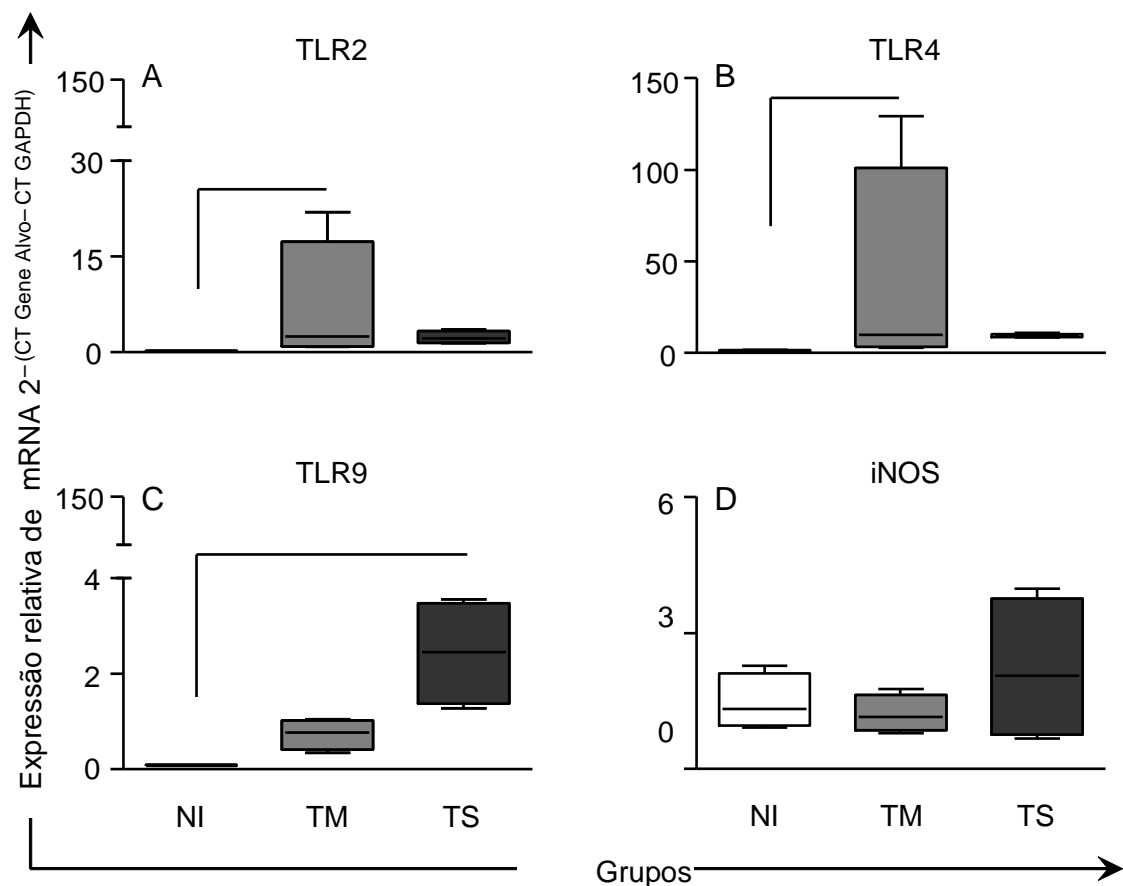


Figura 10: Análise da expressão relativa de mRNA de receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4, e TLR9) e da enzima iNOS em amostras no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NI), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

6.8 Análise de correlação entre o parasitismo e a expressão relativa de mRNA do IFN- γ , IL-10, CCL5/RANTES, CCR5 e TLR9

A análise de correlação entre citocinas, quimiocinas e os receptores mostrada na Figura 11, revelou correlação positiva entre o parasitismo e IFN- γ , IL-10, CCL5/RANTES, CCR5 e TLR9 no AD de cães infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*.

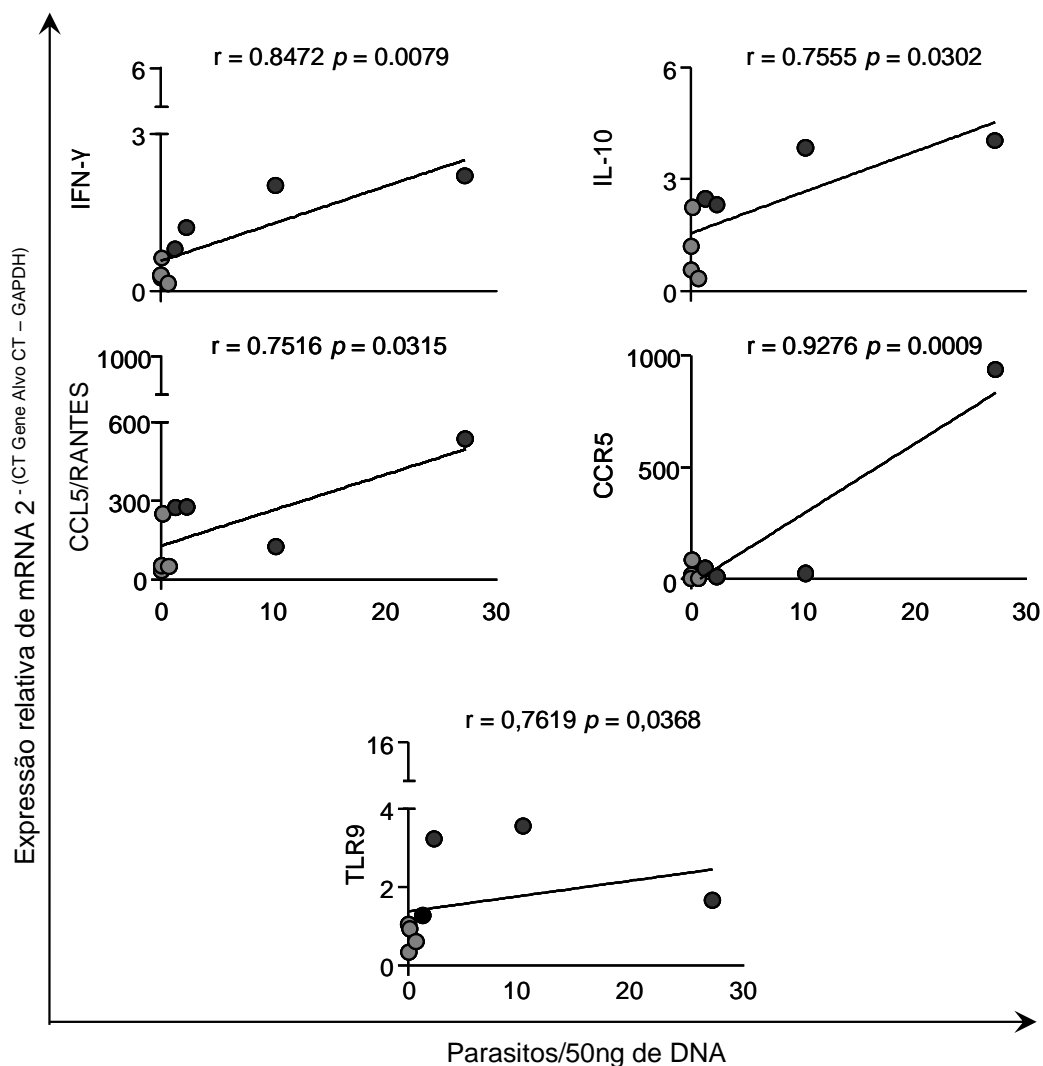


Figura 11: Correlação entre o parasitismo e IFN- γ , IL-10, CCL5/RANTES, CCR5 e TLR9 no Átrio Direito (AD) de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM; \odot) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS; \bullet) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Correlação de Spearman e os índices são mostrados nos gráficos.

6.9 Análise de correlação entre o processo inflamatório e a expressão relativa de mRNA das citocinas

A Figura 12 mostra correlação positiva entre o processo inflamatório e as citocinas IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1 no AD de cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*. Estes resultados indicam que o aumento do processo inflamatório é seguido de forma concomitante à expressão relativa de mRNA destas citocinas.

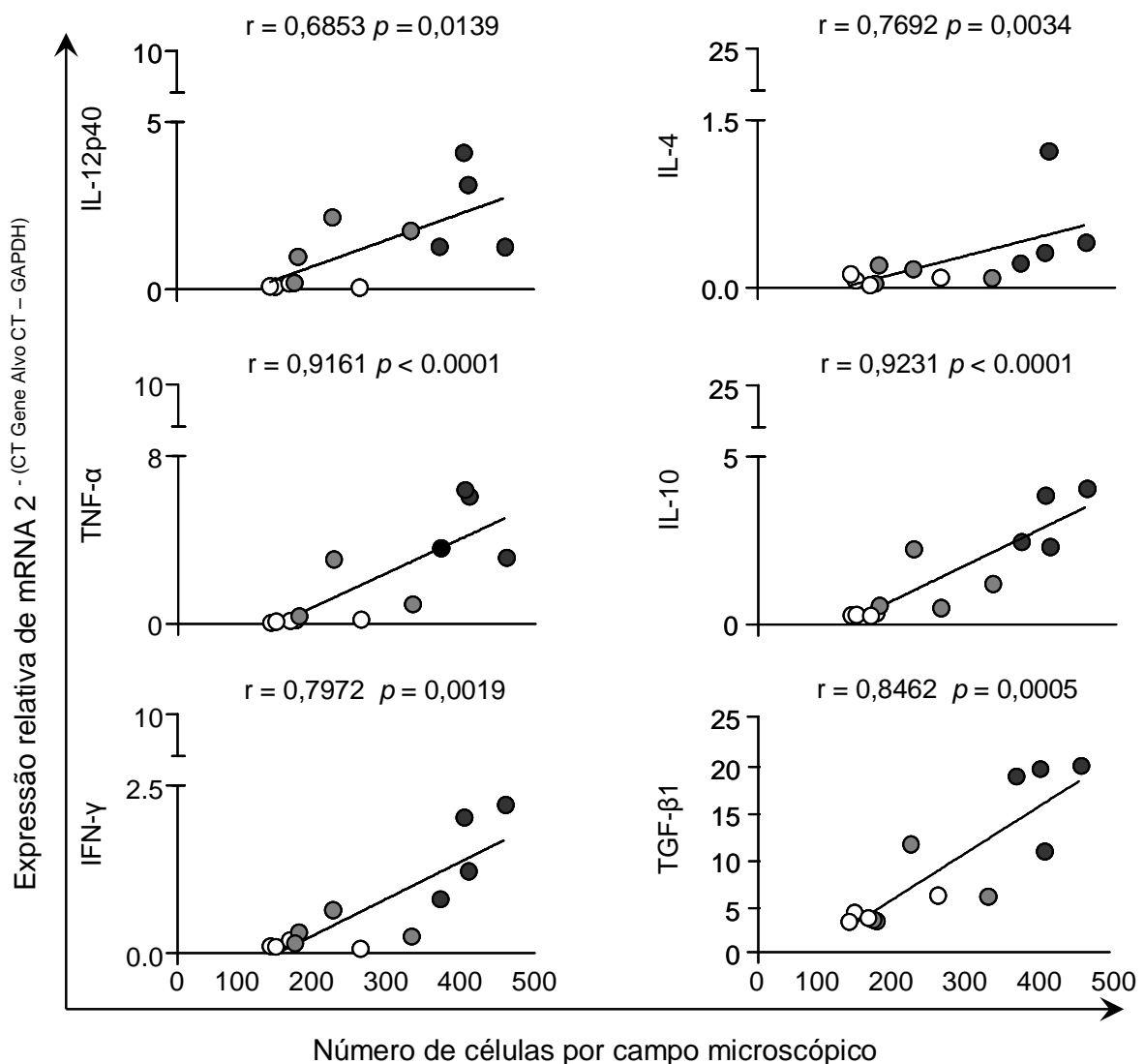


Figura 4: Correlação entre o processo inflamatório e as citocinas (IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1) no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NI; ○), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM; ●) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS; ●) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Correlação de Spearman e os índices são mostrados nos gráficos.

6.10 Análise de correlação entre o processo inflamatório e expressão relativa de mRNA das quimiocinas e receptores

A correlação entre o processo inflamatório e CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCR5 e receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9) no AD de cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*, é positiva e está mostrada na Figura 13. Esses achados revelam que o aumento do processo inflamatório está associado ao aumento da expressão relativa de mRNA destes parâmetros.

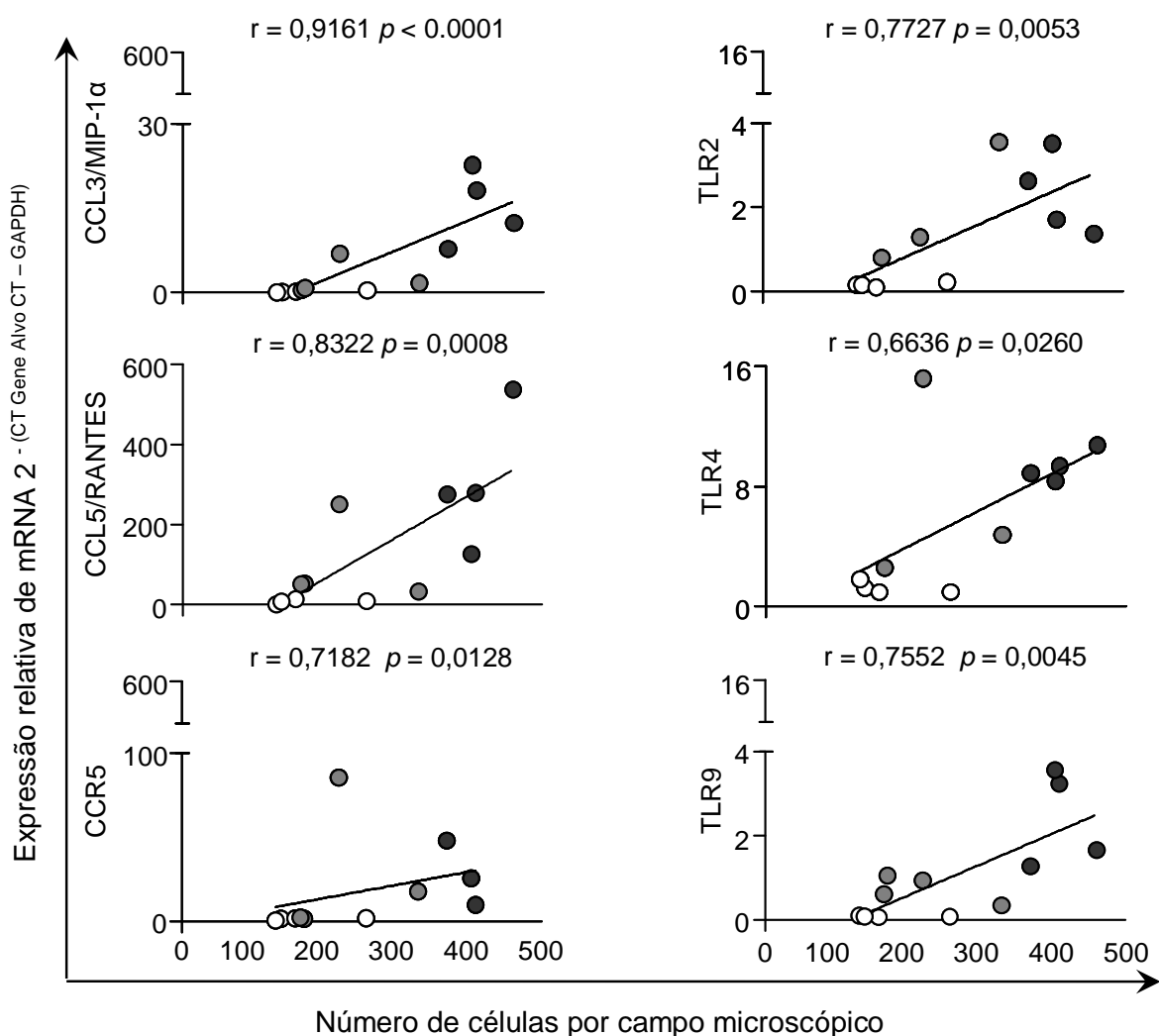


Figura 5: Correlação entre o processo inflamatório e CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCR5 e receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9) no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NI; ○), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM; ●) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TS; ●) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Correlação de Spearman e os índices são mostrados nos gráficos.

6.11 Razão da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias e imunomodulatórias

As razões entre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias *versus* imunomodulatórias do AD de cães NI, infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi* estão mostradas na Tabela 2. Observa-se aumento da expressão da IL-12p40 em relação às citocinas imunomodulatórias, IL-10 e TGF- β 1 em cães infectados por formas TM. Em cães infectados por formas TS, há aumento da expressão do TNF- α em comparação a IL-10 e TGF- β 1. Já a razão observada para o IFN- γ ocorreu aumento apenas em relação ao TGF- β 1 nos animais do grupo TS. Destaca-se o balanço favorável a IL-12p40 no grupo infectado por formas TM e de TNF- α no grupo infectado por formas TS, ambos os casos em relação à citocina imunomodulatória IL-10.

Tabela 2: Razão entre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias em relação às citocinas imunomodulatórias no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NI), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM) ou Sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.

Razão	NI	TM	TS
IL-12p40/IL-10	0.341 \pm 0.049	1.183 \pm 0.504 ^{b*}	0.811 \pm 0.476
IL-12p40/TGF-β1	0.02 \pm 0.003	0.210 \pm 0.112 ^b	0.159 \pm 0.112
TNF-α/IL-10	0.384 \pm 0.116	0.827 \pm 0.377	1.633 \pm 0.757 ^{c*}
TNF-α/TGF-β1	0.029 \pm 0.008	0.148 \pm 0.091	0.313 \pm 0.185 ^c
IFN-γ/IL-10	0.377 \pm 0.236	0.369 \pm 0.154	0.481 \pm 0.104
IFN-γ/TGF-β1	0.029 \pm 0.017	0.059 \pm 0.024	0.093 \pm 0.033 ^c

b: diferença ($p < 0.05$) entre os grupos TM *versus* NI

c: diferença ($p < 0.05$) entre os grupos TS *versus* NI

* Balanço das citocinas nos grupos TMA e TSA em comparação ao grupo NI

7. Resultados II

7.1 Aspectos qualitativos e quantitativos do parasitismo no átrio direito por IHQ e qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina

A Figura 14 mostra os aspectos qualitativos e quantitativos do parasitismo no AD de cães tratados com a AZA e infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi*. A Figura 14A mostra fotomicrografias de cortes histológicos do AD submetidos à técnica de IHQ, revelando os aspectos qualitativos referentes ao parasitismo, mostrando um quadro similar em ambos os grupos. A Figura 14B apresenta o resultado da quantificação da carga parasitária, a qual foi determinada através do número de cópias de DNA do *T. cruzi* utilizando qRT-PCR. Verifica-se que não ocorreu diferença em relação ao parasitismo entre os cães dos grupos TMA e TSA.

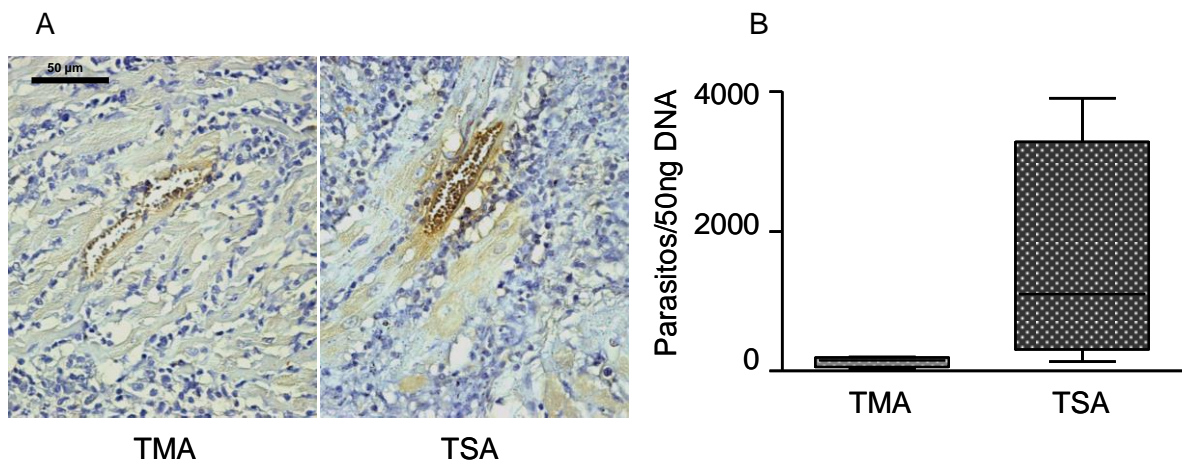


Figura 14: Análise qualitativa e quantitativa do parasitismo no Átrio Direito (AD) de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TSA) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, tratados com a Azatioprina e eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda. (A) Fotomicrografias de cortes histológicos submetidos à técnica de imuno-histoquímica mostrando os aspectos qualitativos semelhantes entre os grupos. (B) Quantificação do número de cópias dos parasitos em 50ng de DNA detectado por qRT-PCR. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

7.2 Aspectos qualitativos e quantitativos do processo inflamatório no átrio direito em cortes histológicos corados pela hematoxilina e eosina de cães tratados com Azatioprina

A análise qualitativa e morfométrica do processo inflamatório em cortes histológicos do AD, corados pela HE de cães não infectados: NI (NIA), e infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados com a AZA, estão mostradas na Figura 15. Na Figura 15A são mostradas fotomicrografias dos aspectos histológicos compatíveis com quadro de normalidade no grupo NIA e intenso processo inflamatório nos grupos TMA e TSA. A Figura 15B apresenta o resultado da quantificação morfométrica dos núcleos celulares, onde verifica-se a presença de processo inflamatório nos grupos TMA e TSA ($p < 0,05$) em relação ao grupo NIA.

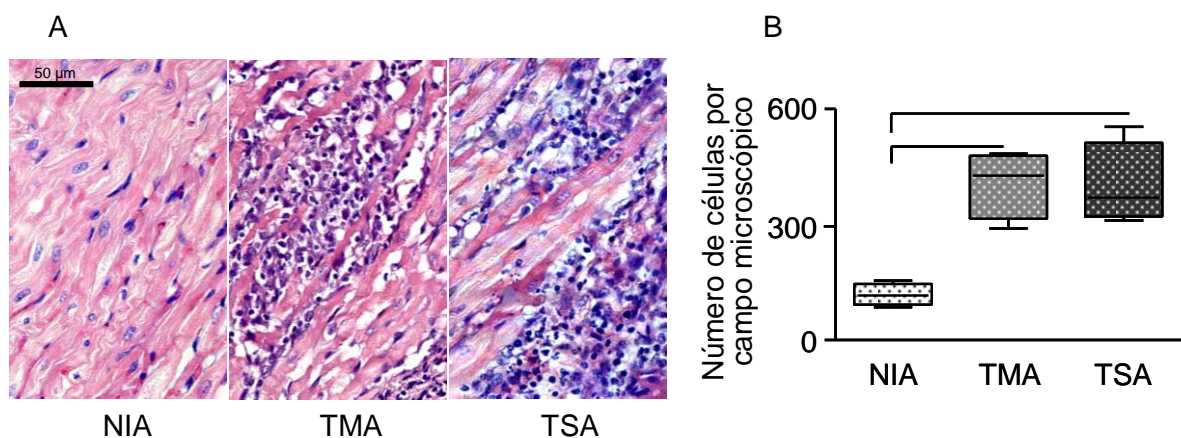


Figura 15: Avaliação qualitativa e quantitativa do processo inflamatório de no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NIA), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA) ou Sanguíneas (TSA) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, tratados com a Azatioprina, e eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda. (A) Nas fotomicrografias, observa-se padrão histológico compatível com quadro de normalidade no grupo NIA. Nos cães dos grupos TMA e TSA há um intenso processo inflamatório, confirmado também pela quantificação das células inflamatórias (B). Linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão. Hematoxilina Eosina (HE).

7.3 Análise de correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório de cães tratados com Azatioprina

Na Figura 16 é mostrado o resultado da correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório no AD de cães tratados com a AZA e infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi*. Os dados mostram valores de $r = 0,2381$ e $p = 0,5821$ entre esses parâmetros.

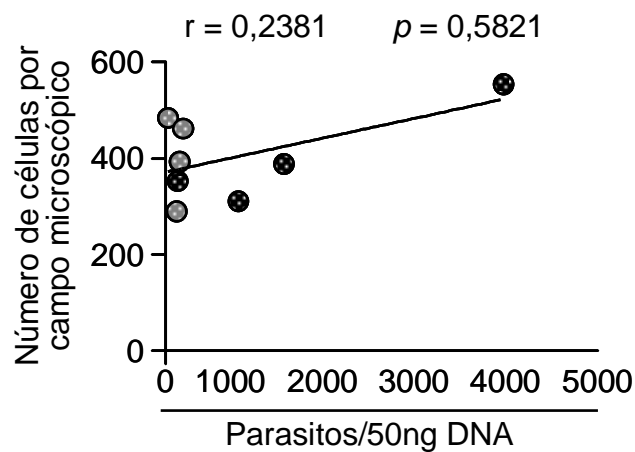


Figura 6: Correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório no Átrio Direito (AD) de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA; ●) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TSA; ⊕) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina. Correlação de Spearman e os índices são mostrados no gráfico.

7.4 Aspectos qualitativos e quantitativos da fibrose no átrio direito em cortes histológicos corados pelo tricrômico de masson de cães tratados com Azatioprina

A Figura 17 mostra a análise qualitativa e morfométrica da fibrose em cortes histológicos do AD corados pelo Tricrômico de Masson de cães não infectados: NI (NIA), infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados com a AZA. A Figura 17A mostra o quadro histológico sem alterações na formação de tecido conjuntivo fibroso no AD de cães dos grupos NIA, TMA e TSA, respectivamente. Em B, são mostrados os resultados obtidos através da quantificação morfométrica dos pixels de tons de azul, utilizados para obter a quantificação da área ocupada pelo tecido conjuntivo fibroso (área de colágeno) nos cortes histológicos. Dessa forma, aspectos qualitativos são certificados através da análise quantitativa, mostrando que não há diferença entre os três grupos avaliados.

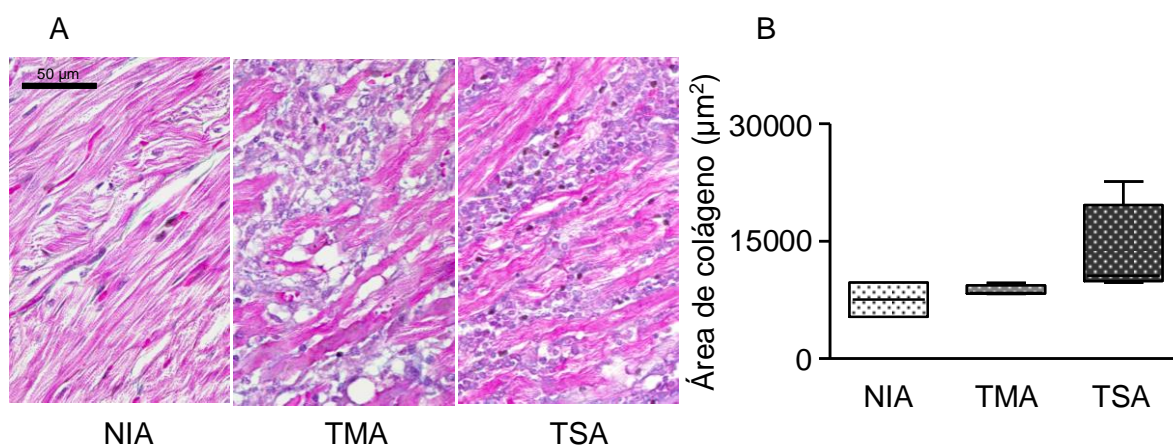


Figura 17: Avaliação qualitativa e quantitativa da neoformação de colágeno no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NIA), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TSA) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, tratados com a Azatioprina e eutanasiados com a mesma faixa etária durante a fase aguda. (A) Observa-se padrão histológico correlato nos três grupos avaliados, quanto à neoformação de colágeno. (B) Não há diferenças entre os três grupos avaliados. Linhas conectoras indicam diferenças significativas entre os grupos ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão. Tricrômico de Masson.

7.5 Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas por qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina

Estão apresentados na Figura 18 os resultados referentes às análises da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, TNF- α e IFN- γ), Th2 (IL-4) e imunomodulatória (IL-10 e TGF- β 1) por qRT-PCR. Os dados foram obtidos do fragmento AD do coração de cães não infectados: NI (NIA), infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados com a AZA.

A Figura 18A mostra o resultado obtido referente à expressão relativa de mRNA da citocina IL-12p40, onde não há diferenças entre os grupos avaliados. A expressão relativa de mRNA do TNF- α , IFN- γ , IL-4 e TGF- β 1 está mostrada na Figura 18B, C, E e F. Observa-se maior expressão nos cães do grupo TMA em relação ao grupo NIA.

A expressão relativa de mRNA da citocina IL-10 está mostrada na Figura 18D. Observa-se maior expressão desta citocina nos cães do grupo TSA em comparação ao grupo NIA.

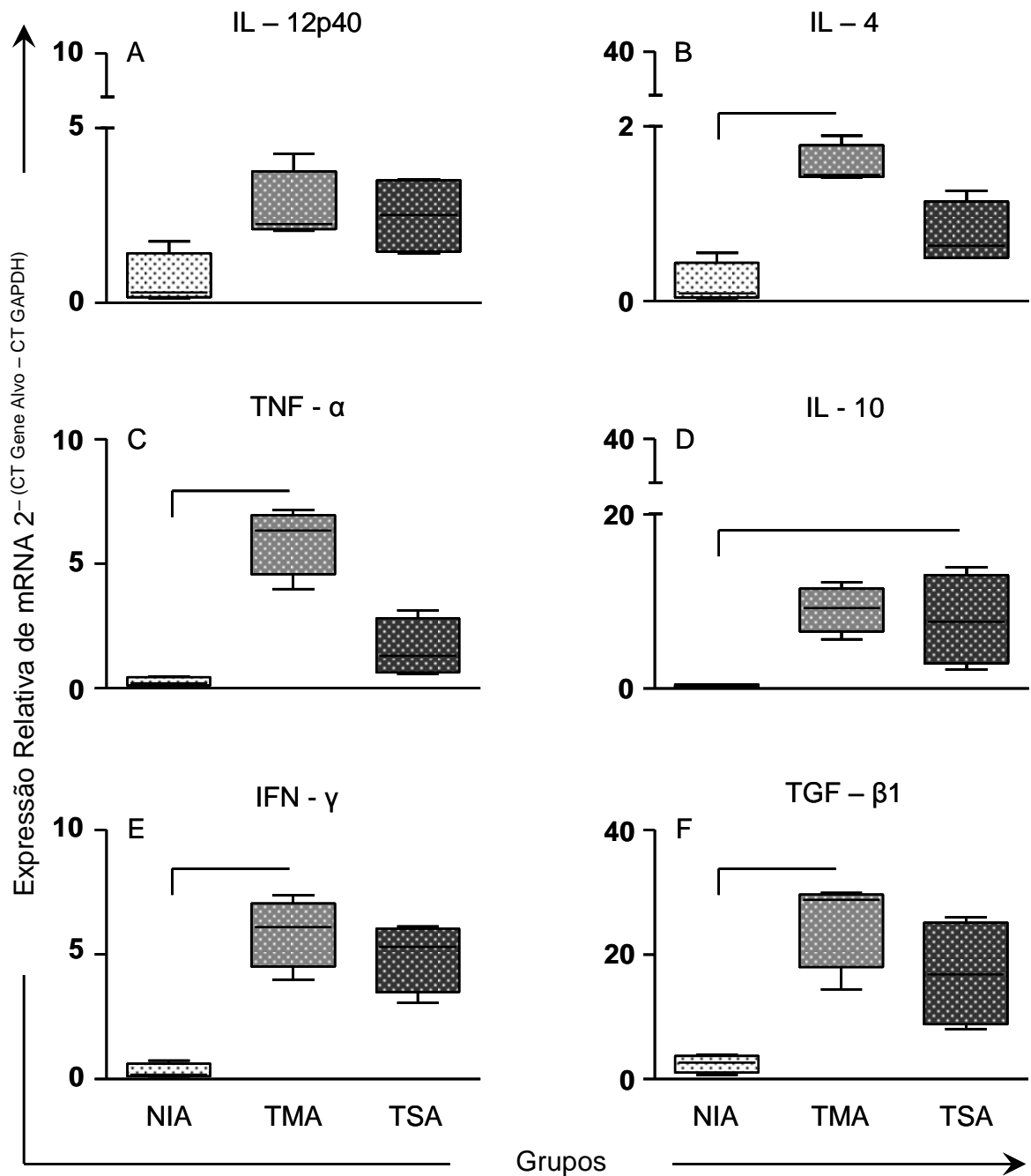


Figura 18: Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10 e TGF- β 1 em amostras no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NIA), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TSA) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

7.6 Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor dessas quimiocinas CCR5 por qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina

Os resultados das análises da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e do receptor de ambas as quimiocinas, o CCR5 de cães não infectados: NI (NIA) e infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados com a AZA estão mostrados na Figura 19. Observa-se aumento da expressão de CCL3/MIP-1 α e CCR5 (Figuras 19A e C) nos cães do grupo TMA em comparação ao grupo NIA.

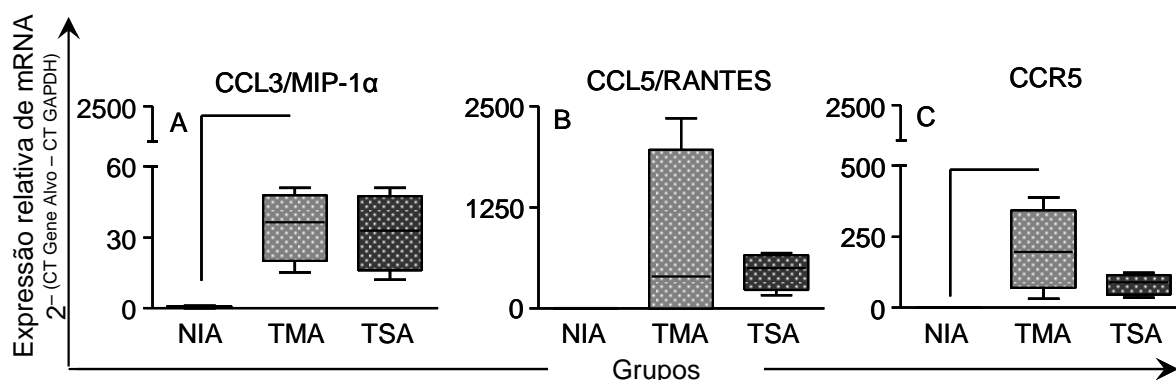


Figura 19: Análise da expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e do receptor CCR5 em amostras no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NIA), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TSA) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

7.7 Análise da expressão relativa de mRNA dos receptores Toll-like e da enzima iNOS por qRT-PCR de cães tratados com Azatioprina

Os dados referentes às análises da expressão relativa de mRNA dos receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9) e da enzima iNOS no AD de cães tratados com a AZA: NI (NIA), infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi* estão mostrados da Figura 20. Observa-se aumento da expressão de TLR9 nos animais do grupo TMA em relação ao grupo NIA (Figura 20C).

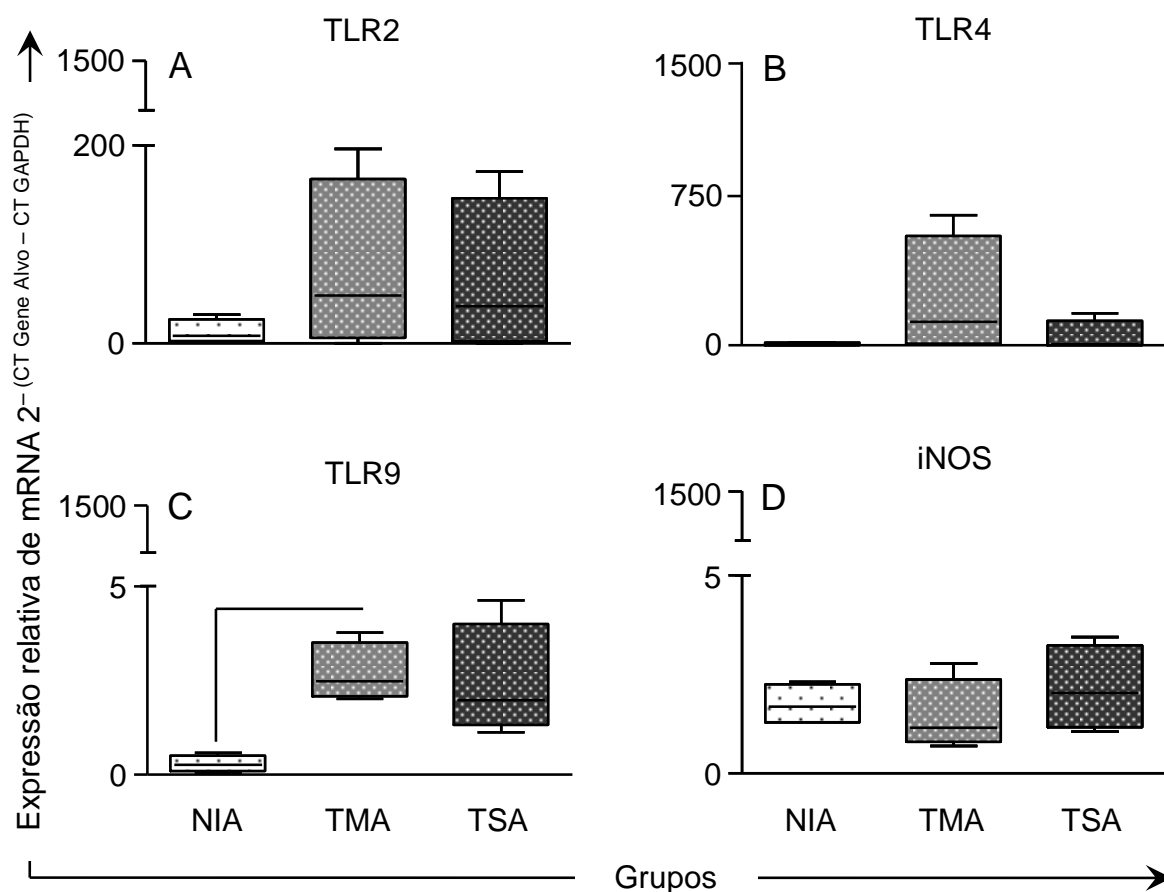


Figura 20: Análise da expressão relativa de mRNA de receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4, e TLR9) e da enzima iNOS em amostras no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NIA), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TSA) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

7.8 Análise de correlação entre o processo inflamatório e expressão relativa de mRNA das citocinas de cães tratados com Azatioprina

A Figura 21 mostra correlação positiva entre o processo inflamatório e as citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, TNF- α , IFN- γ), Th2 (IL-4), e imunomodulatórias (IL-10, TGF- β 1) no AD de cães não infectados: NI (NIA), infectados por formas TM (TMA) ou TS (TSA) da cepa Be-78 do *T. cruzi* e tratados com a AZA. Esses resultados indicam que o aumento do processo inflamatório é acompanhado pela expressão relativa de mRNA das citocinas.

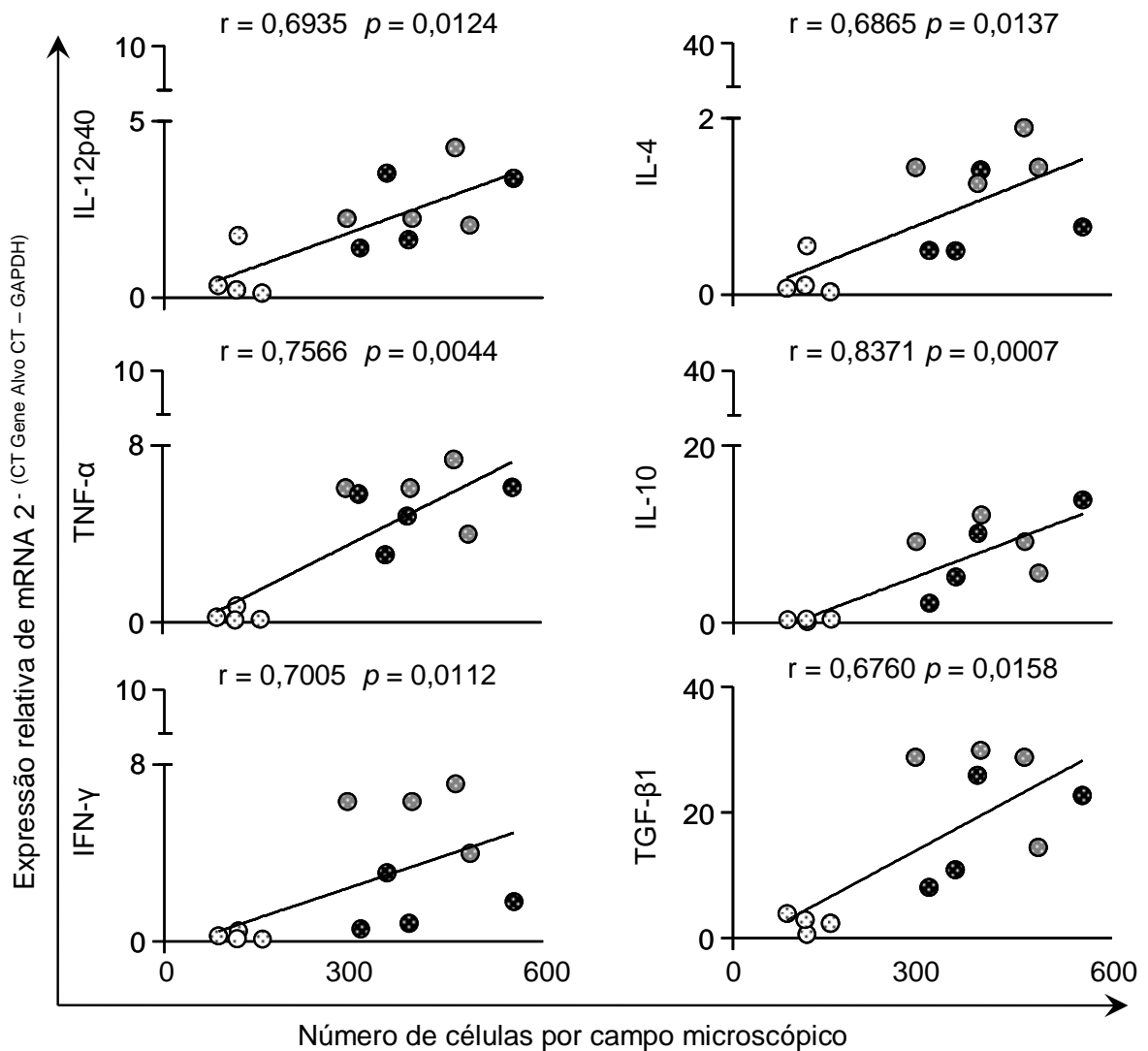


Figura 21: Correlação entre o processo inflamatório e as citocinas (IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4, IL-10, TGF- β 1) no Átrio Direito (AD) de cães Não Infectados (NIA; \odot), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA; \bullet) ou Tripomastigotas Sanguíneas (TSA; \oplus) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina. Correlação de Spearman. Os índices são mostrados nos gráficos.

7.9 Razão da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias e imunomodulatórias de cães tratados com Azatioprina

As razões entre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias *versus* imunomodulatórias do AD do coração dos cães dos grupos NIA, TMA ou TSA estão mostradas na Tabela 3. Observa-se balanço favorável às citocinas IL-12p40 e IFN- γ , nos grupos infectados e tratados, (adicionado TNF- α no grupo TMA) em comparação à citocina IL-10, em relação ao grupo NI. Porém, sem diferença estatística. Neste sentido, parece que a razão mostra que ocorre uma alteração no padrão de resposta imune destas citocinas, fato que pode estar vinculado à resposta imune exacerbada nestes grupos, visto a importância da IL-10 perante o processo de imunomodulação. Pois quando nos remetemos ao grupo NI, prevalece o balanço da expressão da IL-10. Ressalta-se o balanço favorável ao TNF- α no grupo TMA, pois este fator pode estar relacionado ao maior processo inflamatório neste grupo, assim como o observado no grupo TS (Tabela 2).

Tabela 3: Razão entre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias em relação às citocinas imunomodulatórias no Átrio Direito (AD) dos cães Não Infectados (NIA), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TMA) ou Sanguíneas (TSA) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* e tratados com a Azatioprina

Razão	NIA	TMA	TSA
IL-12p40/IL-10	3,716 \pm 5,510	0,337 \pm 0,141*	0,431 \pm 0,266*
IL-12p40/TGF- β 1	0,743 \pm 1,335	0,122 \pm 0,040	0,178 \pm 0,108
TNF- α /IL-10	1,691 \pm 2,243	0,670 \pm 0,155*	1,034 \pm 1,070
TNF- α /TGF- β 1	0,329 \pm 0,554	0,245 \pm 0,037	0,363 \pm 0,240
IFN- γ /IL-10	1,337 \pm 1,355	0,667 \pm 0,133*	0,328 \pm 0,424*
IFN- γ /TGF- β 1	0,230 \pm 0,352	0,245 \pm 0,032	0,117 \pm 0,115

b: diferença ($p < 0.05$) entre os grupos TM *versus* NI

c: diferença ($p < 0.05$) entre os grupos TS *versus* NI

* Balanço das citocinas nos grupos TMA e TSA em comparação ao grupo NI

8. Resultados III

8.1 Impacto do efeito da Azatioprina sobre o parasitismo

A Figura 22 mostra os resultados quantitativos do tratamento com a AZA sobre o parasitismo no AD do coração de cães infectados por formas TM ou TS, da cepa Be-78 do *T. cruzi*. As Figuras 22A e 22B mostram os dados da quantificação da carga parasitária, a qual foi determinada através do número de cópias de DNA do *T. cruzi*, utilizando qRT-PCR. Observa-se maior número de cópias de DNA dos parasitos no grupo TMA comparado a sua respectiva forma de infecção, TM e também em TSA em relação a sua respectiva forma de infecção, TS (Figuras 22A e B).

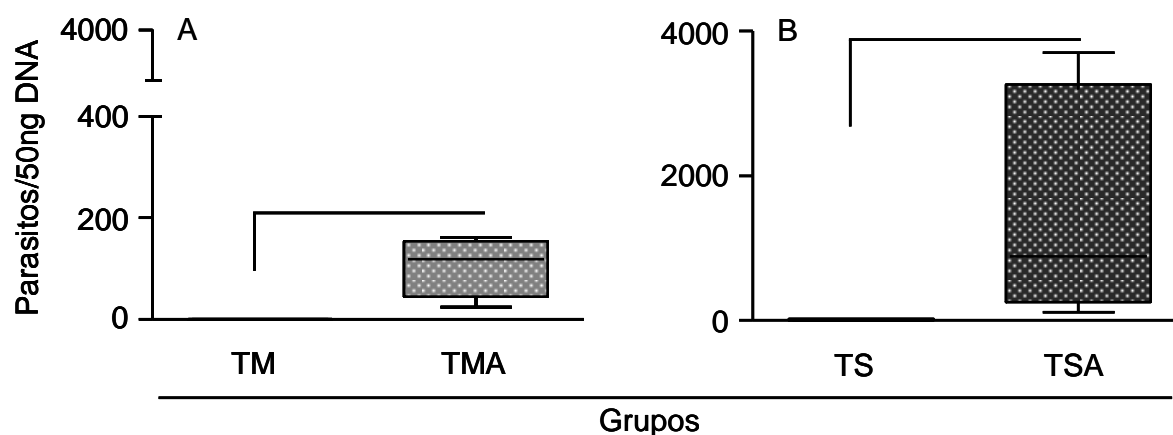


Figura 22: Avaliação do impacto da Azatioprina sob o parasitismo através do número de cópias de DNA em 50ng das amostras no Átrio Direito (AD) detectado por qRT-PCR. Em (A) são mostrados os resultados dos cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclica (TM) comparado ao grupo TMA (tratados com a Azatioprina). Em (B) cães infectados por formas Tripomastigotas Sanguíneas (TS) comparado ao grupo TSA (tratados com a Azatioprina), Ambas as formas infectantes são oriundas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

8.2 Impacto do efeito da Azatioprina sobre o processo inflamatório e fibrose

A Figura 23 mostra os resultados quantitativos referentes ao efeito da AZA, nos grupos TMA e TSA, sobre o processo inflamatório e a formação de colágeno no AD de cães infectados por formas TM ou TS, da cepa Be-78 do *T. cruzi*.

Os resultados da análise morfométrica do processo inflamatório e da formação de colágeno no AD foram obtidos a partir de fotomicrografias de cortes histológicos corados pela HE e Tricrômico de Masson de cães dos grupos: TM, TMA, TS e TSA. A Figura 23A e 23B apresentam os resultados obtidos através da quantificação morfométrica das células e na Figura 23C e 23D os dados referentes à quantificação morfométrica da área ocupada pelo tecido fibroso (área de colágeno), mostrando que não houve diferenças entre ambos os parâmetros avaliados.

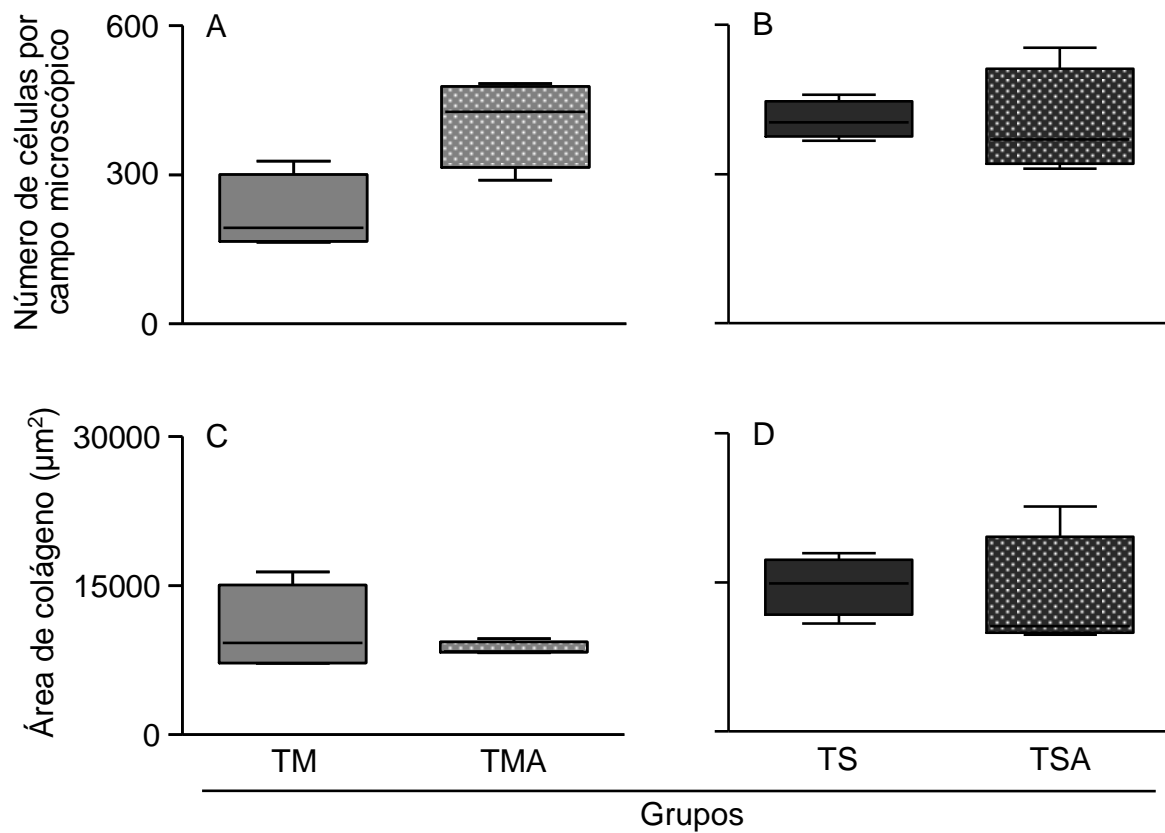


Figura 23: Avaliação do impacto da Azatioprina sob o processo inflamatório (A e B) e da fibrose (C e D) em lâminas no Átrio Direito (AD) corados pela Hematoxilina e Eosina e Tricrômico de Masson, respectivamente. Os resultados são de cães infectados por formas Tripomastigotas Metacíclica (TM) comparado ao grupo TMA (tratados com a Azatioprina). Em (B) cães infectados por formas Tripomastigotas Sanguíneas (TS) comparado ao grupo TSA (tratados com a Azatioprina), ambas as formas infectantes são oriundas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

8.3 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias

A Figura 24 mostra os resultados do impacto do efeito da AZA sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias (IL-12p40, TNF- α e IFN- γ). Os dados foram obtidos dos fragmentos do AD do coração de cães pertencentes aos grupos TM, TMA, TS e TSA.

Nota-se um aumento da expressão relativa de mRNA das citocinas TNF- α e IFN- γ nos animais do grupo TMA em comparação à TM.

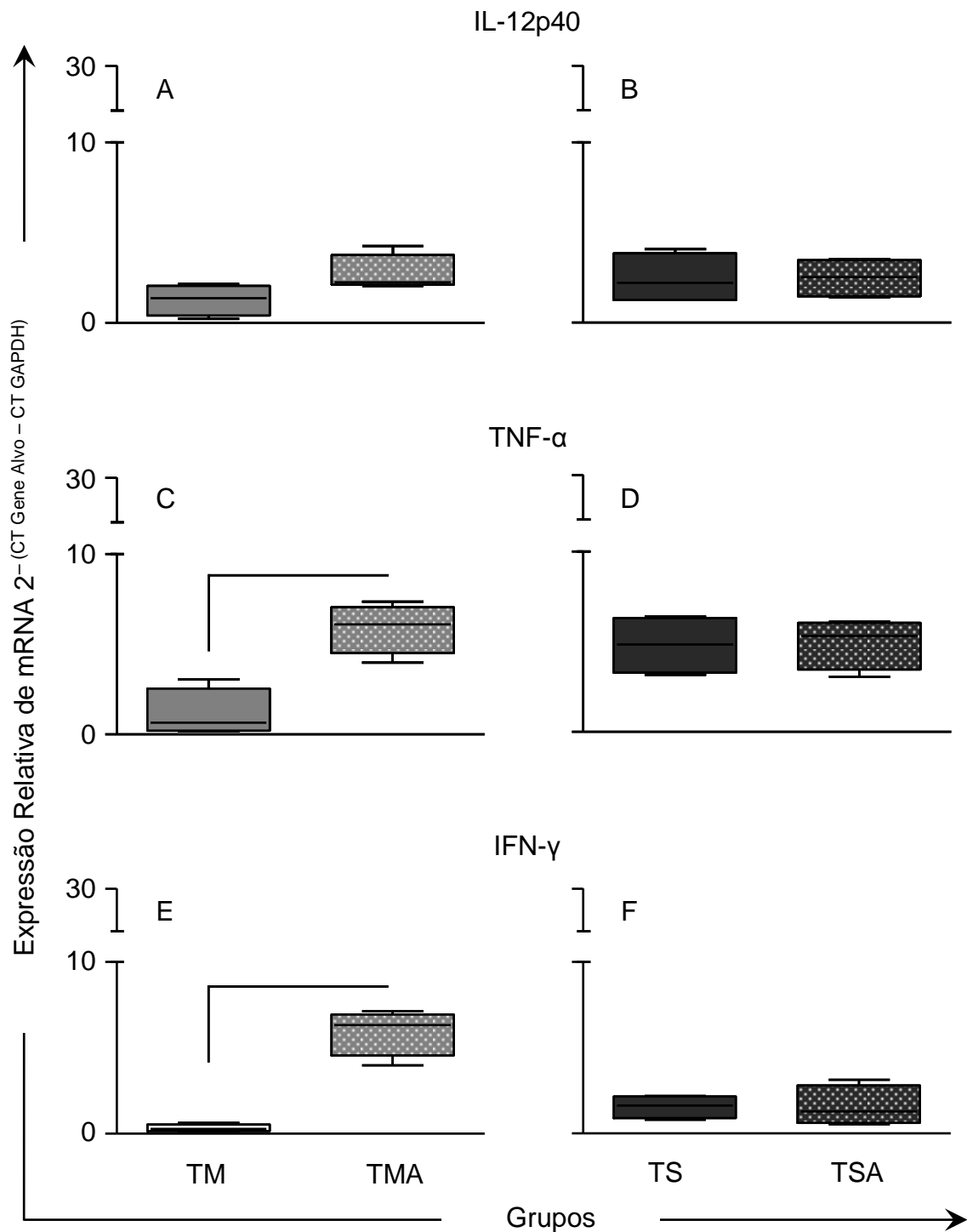


Figura 7: Avaliação do impacto da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias em amostras no Átrio Direito (AD) de cães dos grupos: infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas - tratados com a (TMA); por formas Tripomastigotas Sanguíneas (TS), infectados por formas Tripomastigotas Sanguíneas - tratados com a Azatioprina (TSA). Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

8.4 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas Th2 e imunomodulatórias

A Figura 25 mostra os resultados do impacto do efeito da AZA sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas Th2 (IL-4) e imunomodulatória (IL-10 e TGF- β 1). Os dados são oriundos dos fragmentos do AD do coração de cães dos grupos TM, TMA, TS e TSA.

Há um aumento da expressão relativa de mRNA das citocinas IL-4, IL-10 e TGF- β 1 nos cães do grupo TMA em comparação a TM.

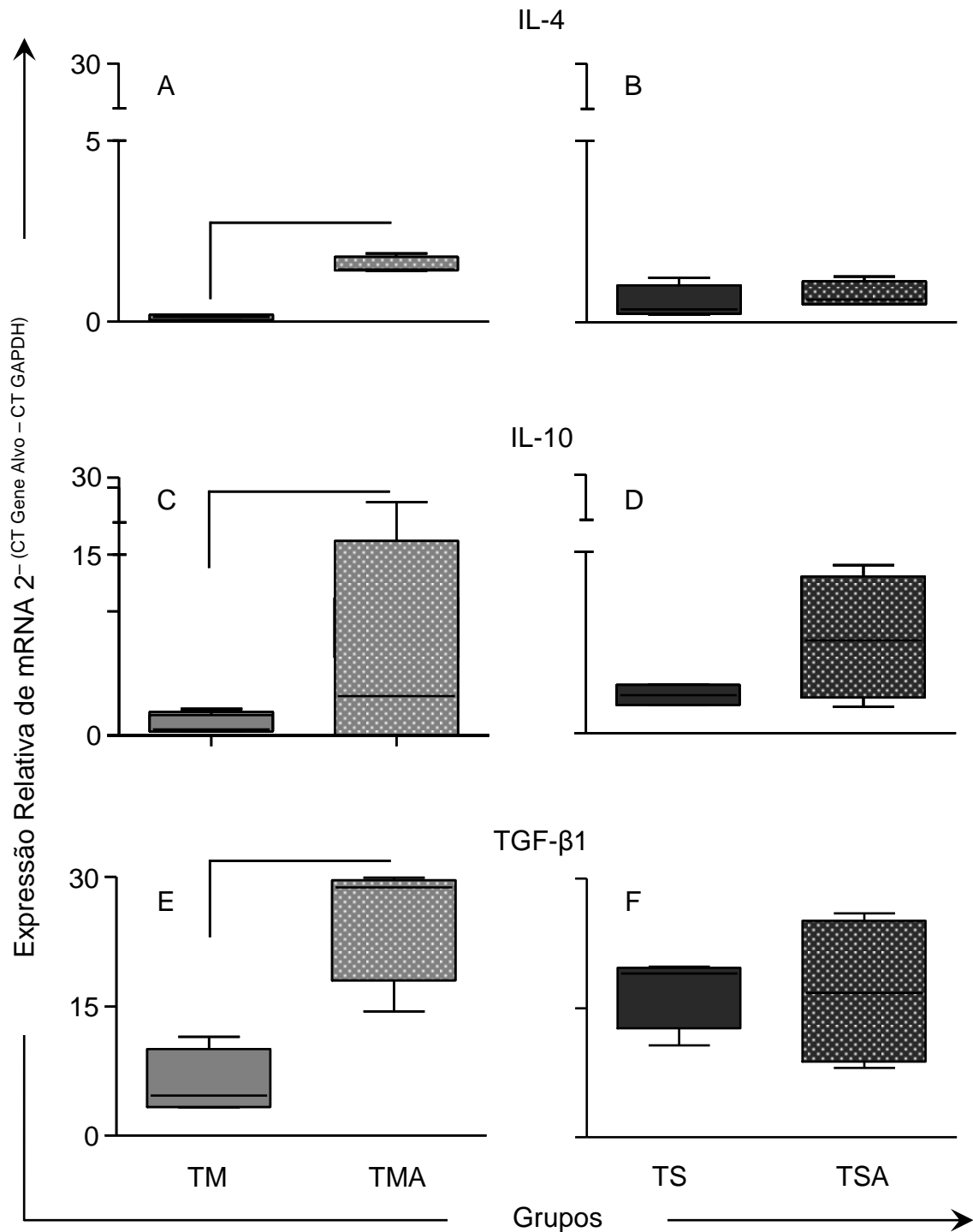


Figura 8: Avaliação do impacto da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das citocinas do Th2 e imunomodulatórias em amostras no Átrio Direito (AD) de cães dos grupos: infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas - tratados com a Azatioprina (TMA); por formas Tripomastigotas Sanguíneas (TS), infectados por formas Tripomastigotas Sanguíneas - tratados com a (TSA). Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

8.5 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor dessas quimiocinas CCR5

As análises do impacto do efeito da AZA sobre a expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES e do receptor de ambas as quimiocinas, o CCR5 de cães dos grupos TM, TMA, TS e TSA estão mostradas na Figura 26.

Observa-se aumento da expressão de CCL3/MIP-1 α (Figuras 26A) nos cães do grupo TMA em comparação ao grupo TM.

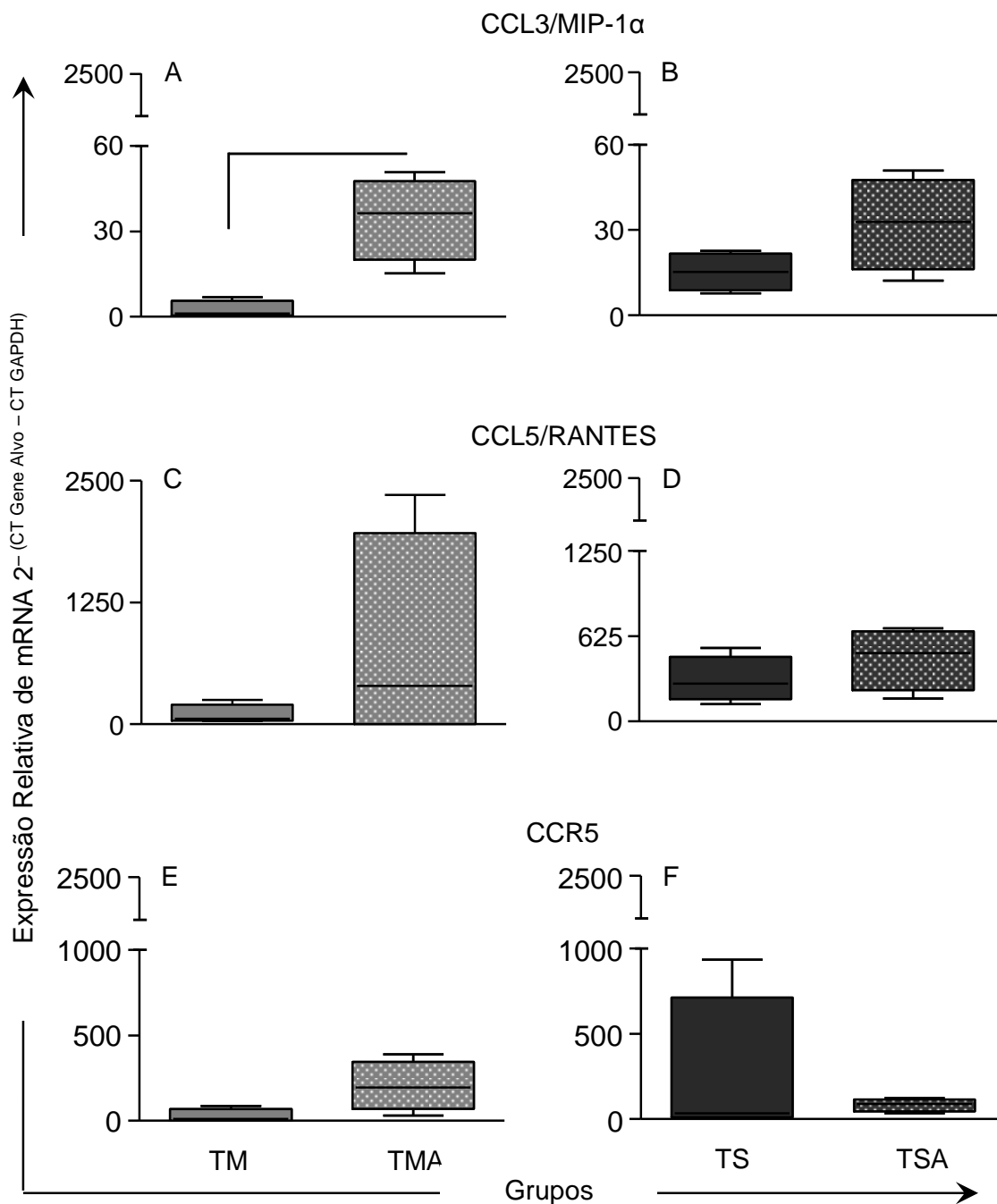


Figura 26: Avaliação do impacto da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES e do receptor dessas quimiocinas CCR5 em amostras no Átrio Direito (AD) detectado por qRT-PCR de cães dos grupos: Infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas (TM), infectados por formas Tripomastigotas Metacíclicas – tratados com a Azatioprina (TMA); por formas Tripomastigotas Sanguíneas (TS), infectados por formas Tripomastigotas Sanguíneas – tratados com a Azatioprina (TSA). Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

8.6 Impacto do efeito da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA dos receptores Toll-like e da enzima iNOS

Estão apresentados na Figura 27, os resultados obtidos pelo impacto do efeito da AZA sob a expressão relativa de mRNA dos receptores *Toll-like* (TLR2, TLR4 e TLR9) e da enzima iNOS de cães dos grupos TM, TMA, TS e TSA.

Nota-se um aumento da expressão de TLR9 nos animais do grupo TMA em relação ao grupo TM (Figura 27E).

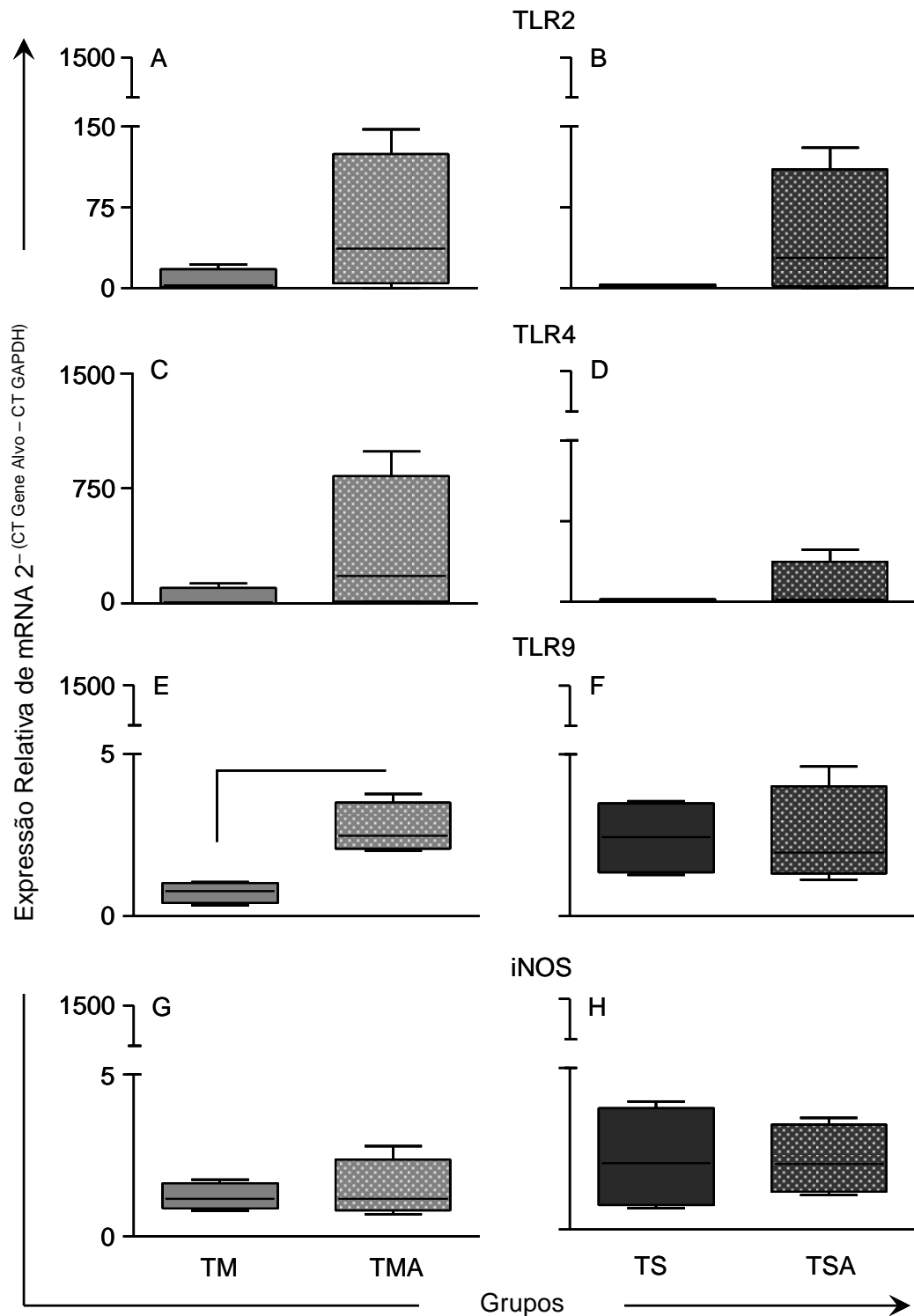


Figura 9: Avaliação do impacto da Azatioprina sobre a expressão relativa de mRNA dos receptores *Toll-like* e da enzima iNOS em amostras no Átrio Direito (AD) de cães dos grupos: infectados por formas *Tripomastigotas Metacíclicas* (TM), infectados por formas *Tripomastigotas Metacíclicas* - tratados com a Azatioprina (TMA); por formas *Tripomastigotas Sanguíneas* (TS), infectados por formas *Tripomastigotas Sanguíneas* - tratados com a Azatioprina (TSA). Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$). Os valores são expressos como mediana \pm erro padrão.

9. Discussão

Um dos grandes obstáculos para o avanço da pesquisa científica é a obtenção de um modelo experimental que reproduza os aspectos clínicos semelhantes àqueles observados em humanos. Durante as últimas décadas, nosso grupo de pesquisa mostrou que o cão é um excelente modelo para o estudo da doença de Chagas, por apresentar similaridades com os humanos, nas manifestações das fases aguda e crônica (Lana *et al.*, 1992 e 1998).

Escolheu-se a cepa Berenice-78, pois esta é constituída predominantemente por formas largas e por isto permanece por maior tempo no sangue periférico, além de ser mais resistente aos mecanismos imunológicos do hospedeiro e apresentar tropismo por células musculares, fator determinante para a realização deste estudo (Brenner, 1969; Lana e Chiari, 1986).

Estudos realizados pelo nosso grupo, que avaliaram a parasitemia e a taxa de mortalidade em camundongos e cães infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi* durante a fase aguda, têm mostrado que infecções por essas formas de inóculo desencadeiam comportamentos parasitológicos distintos. Resultados semelhantes foram obtidos em ambos os trabalhos, como: maior período pré-patente e pico de parasitemia mais tardio em camundongos e cães infectados por formas TM em relação aos animais infectados por formas TS (Carneiro *et al.*, 2007; Vieira *et al.*, 2012). Esses dados suportam a hipótese de que, independente do modelo utilizado, essas formas de infecção surgem como um elemento importante, por apresentarem características diversas no curso da infecção pelo *T. cruzi*.

Trabalhos que analisaram o tecido muscular cardíaco no modelo canino na doença de Chagas têm avaliado o AD em análises imunopatológicas (Rossi, 1998; Chiari *et al.*, 2002; Guedes *et al.*, 2007, Vieira *et al.*, 2009). Neste sentido, no desenvolvimento da dissertação de Souza, 2010, foram avaliadas duas regiões cardíacas, AD e septo interventricular (SI), como regiões de estudo na análise dos leucócitos presentes no tecido muscular cardíaco de cães NI e infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*. O SI foi escolhido porque, na avaliação das diferentes regiões cardíacas (átrio direito, átrio esquerdo, ventrículo direito, ventrículo esquerdo, septo interventricular e

ponta), Vieira *et al.*, (2009) observaram maior processo inflamatório no SI. A fim de dar prosseguimento a este estudo, buscou-se suporte nesses dois fragmentos cardíacos no decorrer desta tese. No entanto, constatou-se que nos resultados para os parâmetros aqui apresentados, haviam variações sutis que não comprometiam a veracidade do estudo e dessa forma, uma avaliação do AD assegurava uma análise confiável dos dados aqui apresentados.

Assim, a princípio, foram investigados os aspectos relacionados ao parasitismo cardíaco, em relação às diferentes formas de infecção, TM ou TS, da cepa Be-78 do *T. cruzi*. Ao se constatar maior parasitismo nos cães infectados pelas formas TS, pode-se inferir que as infecções provenientes de transfusão sanguínea, congênita e por transplantes de órgão podem ser mais graves do que aquelas promovidas pelo inseto vetor. Sendo assim, surge um novo contexto referente à patologia da DC, visto que, por ora, esta enfermidade vem tendo destaque em regiões não endêmicas, como EUA e Europa, devido ao grande fluxo de latino-americanos para essas regiões. Isto, aliado ao fato de não ocorrer controle em bancos de sangue para DC em algumas desses locais, torna, assim, essas regiões vulneráveis à infecção pelo *T. cruzi*, via formas TS (Jackson *et al.*, 2010; Gascon *et al.*, 2010; Strasen *et al.*, 2013; Wallace *et al.*, 2013).

Na resposta imunológica frente à infecção pelo *T. cruzi*, alguns fatores devem ser considerados, pois o parasito pode provocar respostas imunes distintas, levando a comunidade científica a postular teorias a esse respeito, como, por exemplo, considerações sobre os processos autoimunes que perduram por décadas (Kalil e Cunha-Neto, 1996; Brener e Gazzinelli, 1997; Andrade, 1999; Soares *et al.*, 2001; Leon e Engman, 2001, 2002; Gironés e Fresno, 2003; Gironés *et al.*, 2005; Kierszenbaum, 1986, 1999, 2003, 2005, 2007). Avaliações *in vitro* e *in vivo* das duas formas de infecção do *T. cruzi*, empregadas neste estudo, têm evidenciado que elas podem induzir respostas imunológicas distintas (Brener e Gazzinelli, 1997). Estas diferenças imunológicas podem ajudar a explicar o porquê das formas TS, mas não as formas TM ou epimastigotas, serem um potente estimulador de citocinas pró-inflamatórias, como a IL-12 e o TNF- α , e ativarem a síntese de óxido nítrico

pelos macrófagos, sendo que este fato pode estar relacionado às glicoproteínas, como glicosilfosfatidilinositol (GPI) (Camargo *et al.*, 1997; Almeida *et al.*, 2000). Além disso, GPI derivada das formas de infecção TS e das formas amastigotas podem atuar como uma molécula adjuvante e promover a inflamação no local de infecção parasitária e, possivelmente, ser fator determinante para que ocorra a miocardite durante a DC experimental e humana (Ropert *et al.*, 2000). Com base nestas informações, pode-se deduzir que os resultados obtidos neste trabalho sugerem que a infecção por formas TS do *T. cruzi* pode levar a um quadro mais grave da doença de Chagas, visto o maior processo inflamatório observado neste grupo de infecção.

Sendo assim, o processo inflamatório aumentado nos cães infectados por formas TS em relação aos cães infectados por formas TM, e também em comparação ao grupo NI, levou à análise da correlação entre o parasitismo e o processo inflamatório, na qual se observou forte correlação positiva ($r=0,8095$ e $p=0,0218$) entre esses parâmetros. Neste sentido, pode-se deduzir que o maior parasitismo observado nos cães infectados por formas TS é o desencadeador do intenso processo inflamatório nesse mesmo grupo. A avaliação da fibrose não constatou a neoformação de fibras colágenas nos grupos NI, TM e TS. Este fato pode ser devido ao curto período entre a infecção e a necropsia – 42 dias –, sendo considerada ainda fase aguda.

Em uma avaliação quantitativa dos leucócitos presentes no processo inflamatório, verificou-se que os cães infectados por formas TM apresentam aumento de linfócitos T CD8⁺ em relação ao grupo NI (Souza, 2010). Estes resultados estão de acordo com estudos prévios realizados por Carneiro *et al.* (2007), que observaram aumento nos níveis de linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico desses mesmos cães, infectados com as formas TM. Assim como foi encontrado elevados níveis de NO sérico e também maior expressão da enzima iNOS no AD, por IHQ, neste mesmo grupo de animais por Vieira *et al.* (2009). Estes resultados podem explicar o menor parasitismo encontrado nos cães infectados por formas TM.

Estudos quantitativos, em modelos murinos, das células que constituem o infiltrado inflamatório agudo, realizado por IHQ, revelaram que os linfócitos T

CD8⁺ são predominantes na miocardite chagásica (Sun e Tarleton, 1993). Outros trabalhos mostraram que os linfócitos T CD8⁺ e as células NK são predominantes no infiltrado celular (Sato *et al.*, 1992). Na miocardite chagásica aguda humana, há proporção semelhante entre os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ (Fuenmayor *et al.*, 1999). Estudo realizado durante a fase aguda, também revelou que os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são essenciais para a proteção no fígado de camundongos (Sardinha *et al.*, 2006). Outros estudos demonstraram que os neutrófilos são maioria e entre os linfócitos, os linfócitos T CD4⁺ é a maioria (Younès-Chennoufi *et al.*, 1988).

Utilizando o cão como modelo experimental a fim de investigar o fenótipo celular presente no AD de cães infectados, por via conjuntival, pela cepa Be-78, Caliari *et al.* (2002) observaram durante a fase aguda da infecção 58% de linfócitos T CD8⁺ e 42% de linfócitos T CD4⁺, ressaltando assim o predomínio e importância dos linfócitos T CD8⁺ na infecção chagásica experimental no modelo canino. Tarleton *et al.* (1994) em modelo murino, também demonstraram a importância dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ durante a fase aguda e crônica da infecção. O papel crucial dos linfócitos T CD8⁺ no controle da infecção pelo *T. cruzi* é evidente a partir de vários estudos que demonstram a incapacidade de camundongos sem estas células de sobreviver à infecção e também em relação à capacidade de aumentar o nível de resistência (Martin e Tarleton, 2004; Padilla *et al.*, 2009). No entanto, os linfócitos T CD4⁺ são um requisito essencial em termos de eficácia, devido à sua função auxiliar na ativação dos linfócitos T CD8⁺ e B, para produção de anticorpos e de liberação direta de importantes citocinas, tais como IFN- γ (Kumar e Tarleton, 2001; Padilla *et al.*, 2007; Ferraz *et al.*, 2009). Algumas pesquisas mostraram que a depleção em camundongos dos linfócitos T CD4⁺ leva a maiores níveis de parasitemia e altas taxas de mortalidade (Rottenberg *et al.*, 1993; 1995a,b). Além disso, os linfócitos T CD8⁺, IFN- γ e as perforinas são críticos para a sobrevivência dos camundongos (Tzelepis *et al.*, 2006).

Apesar dos níveis de expressão das citocinas não serem evidenciados no grupo TM, a avaliação da razão destas mostrou que a expressão da IL-12p40/IL-10 estava favorecendo a citocina pró-inflamatória IL-12p40, apesar

da razão da expressão da IL-12p40/TGF- β 1 estar favorecendo o TGF- β 1. Assim, este dado reafirma a importância de um balanço favorável à IL-12p40 em relação à IL-10, evidenciando o papel desta citocina pró-inflamatória no contexto da infecção chagásica durante a fase aguda por formas TM. Aliado a estes dados, a presença das células T CD8⁺ e expressão da enzima iNOS, podem ser indicativos de um perfil de resposta inflamatória que levou a menor replicação parasitária nesse grupo em relação aos cães infectados por formas TS. Além disso, o aspecto tecidual avaliado em cortes histológicos mostrou-se mais preservado nos cães infectados por formas TM, semelhante ao aspecto observado no grupo NI, apresentando integridade das fibras musculares cardíacas. Ao verificar a maior expressão relativa dos receptores *Toll-like*: TLR2 e TLR4, nos cães infectados por formas TM, pode-se inferir que estes receptores podem contribuir para o “perfil de resistência” indicado pelo menor parasitismo (Souza *et al.*, 2014), visto que TLR2 e TLR4 são importantes agonistas de citocinas pró-inflamatórias (Bellio *et al.*, 1999; Campos *et al.*, 2001; DosReis *et al.*, 2002; Oliveira *et al.*, 2004; Medeiros *et al.*, 2006, 2007; Kayama *et al.*, 2009; Carrera-Silva *et al.*, 2010; Souza, 2010).

Recapitulando o comportamento biológico das duas formas de infecção, como a parasitemia, verifica-se que a infecção por formas TS se evidencia como mais precoce que nos animais (cães e camundongos) infectados por formas TM. Nesse sentido, especula-se que a resposta nos animais infectados por formas TM é mais eficiente ao ponto de controlar a infecção em comparação à infecção por formas TS. Esta hipótese é suportada pelo trabalho de Caliaro *et al.* (2002), que observaram em cães infectados pelas formas TM aos 33 dias após a infecção 58% de linfócitos T CD8⁺ no AD, em relação aos 42% linfócitos T CD4⁺. Sendo assim, parece que a infecção de cães por formas TM desencadeia a resposta imune celular, mediada por linfócitos T CD8⁺ aos 33 dias, como observado por Caliaro *et al.* (2002), e que perdurará até no mínimo de 42 dias, como foi observado por Souza, (2010).

Os cães infectados por formas TS apresentaram perfil de resposta imune diferente, com maiores níveis da expressão das citocinas pró-inflamatórias: IL-12p40, TNF- α e IFN- γ , Th2: IL-4 e imunomodulatória: IL-10

e TGF- β 1. Levando em consideração que os níveis expressos dessas citocinas foram realmente produzidos, pode-se observar que o aumento da expressão de citocinas imunomodulatórias não conteve a expressão das citocinas pró-inflamatórias e nem mesmo levou ao controle do processo inflamatório. Em especial, tem-se que ressaltar as citocinas IFN- γ e IL-10, pois há correlação positiva entre essas citocinas e o parasitismo tecidual. Ao analisar a razão entre as citocinas pró-inflamatória/imunomodulatória, verifica-se que ocorreu sobreposição na expressão das citocinas pró-inflamatórias, TNF- α em comparação às citocinas imunomodulatórias, IL-10 e TGF- β 1 e também IFN- γ /TGF- β 1. Dessa forma, salienta-se que apesar de ter ocorrido correlação positiva do parasitismo com as citocinas IFN- γ e IL-10, quando observada a razão, nota-se que existe balanço favorável ao TNF- α , que por sua vez pode ser o fator determinante para o intenso processo inflamatório e também para o aumento da expressão relativa do IFN- γ nos animais infectado por formas TS. Aliado a esta sobreposição, não há resposta imunomodulada.

Associado a esses resultados, a IHQ não mostrou a presença de células T CD8⁺ (Souza, 2010), assim como não ocorreu a expressão da enzima iNOS, neste grupo, o que permite inferir, mais uma vez, a importância desses parâmetros na resposta imune do cão frente à infecção pelo *T. cruzi*, visto o maior parasitismo evidenciado neste grupo. Além disso, existe correlação positiva entre a inflamação e todas as citocinas aqui avaliadas. Sendo desta forma, uma evidência que para ocorra o controle da replicação parasitária, há a necessidade da IL12p40, de TLR2, TLR4, dos linfócitos T CD8⁺ e da enzima iNOS, durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.

A expressão relativa das quimiocinas: CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES, e do receptor de ambas as quimiocinas, o CCR5 mostra-se aumentadas, assim como o TLR9 nos cães infectados por formas TS em relação ao grupo NI. Os resultados mostraram correlação positiva entre a quimiocina CCL5/RANTES, o receptor CCR5 e o TLR9 em relação ao parasitismo. Ocorrendo também correlação positiva em relação ao processo inflamatório e CCL3/MIP-1 α , CCL5/RANTES, CCR5, TLR2, TLR4, e TLR9. Sendo assim, parece que o aumento desses parâmetros não é indicativo de bloqueio da replicação

parasitária nos cães infectados por formas TS. Visto que, mesmo ocorrendo o aumento do processo inflamatório, o parasitismo não foi controlado.

Ao avaliar a ação da AZA, a princípio realizou-se análise dos cães não infectados (NI e NIA) para todos os parâmetros realizados durante este trabalho. Nenhuma diferença foi observada entre os grupos controles não infectados, NI *versus* NIA. Sendo assim, parece que o tratamento com a AZA não leva ao desenvolvimento de alterações imunes em cães não infectados.

Dessa forma, investigou-se as possíveis alterações parasitológicas e imunológicas cardíacas desencadeadas nos cães pelo tratamento com a AZA na infecção chagásica aguda por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*. Verificou-se que não houve diferenças em relação ao parasitismo entre os grupos TMA e TSA. A avaliação do processo inflamatório mostrou presença de inflamação nos grupos TMA e TSA em comparação ao grupo NIA. Vale aqui ressaltar que o tratamento com a AZA sobre o curso da infecção por formas TM, leva ao aumento do processo inflamatório, isso deve ser evidenciado, pois durante as análises dos grupos: NI, TM e TS, não houve diferença no processo inflamatório entre os grupos NI e TM. No entanto, quando os cães infectados por formas TM são submetidos ao tratamento com a AZA (TMA), ocorre aumento do processo inflamatório, TMA *versus* NIA, equivalente a diferença entre os grupos TSA *versus* NIA. A avaliação da fibrose não evidenciou neoformação de fibras colágenas entre os grupos NIA, TMA e TSA. Este fato pode ser devido ao mesmo motivo da não constatação também nos grupos NI, TM e TS; o curto período entre a infecção/AZA e a necropsia, apenas 42 dias.

Análise da expressão relativa de mRNA das citocinas mostrou, mais uma vez, que o tratamento com a AZA interfere diretamente no perfil imunológico na infecção por formas TM, visto que ocorreu aumento da expressão relativa do TNF- α , IFN- γ , IL-4 e do TGF- β 1 nos animais do grupo TMA em comparação ao grupo NIA. Esse fato também deve ser ressaltado, devido às análises das citocinas dos grupos: NI, TM e TS terem mostrado aumento predominante das citocinas nos cães infectados por formas TS, não em TM. No entanto, quando avaliamos o tratamento com a AZA, parece que esta leva à mudança no perfil de citocinas, mostrando ainda correlação positiva

com o processo inflamatório. Interessante notar que não apenas o perfil das citocinas modifica perante o tratamento com a AZA no grupo TMA, mas também ocorre aumento nos níveis de expressão da quimiocina CCL3/MIP-1 α e dos receptores CCR5 e TLR9, mostrando assim que a AZA pode levar à mudança na resposta imune durante a infecção por formas TM.

Assim como ocorreu um perfil diferente de citocinas em relação à forma de infecção TM sobre o tratamento com a AZA, ao verificar o perfil entre TS e TSA, pode-se observar que ocorreu apenas aumento da expressão da citocina IL-10 em comparação ao grupo NIA. Perfil este totalmente distinto daquele observado nos cães que não foram tratados com AZA.

Portanto, de posse desses dados, referentes ao tratamento com a AZA e as modificações causadas perante as duas formas de inóculo, faz-se necessária uma análise mais acurada dos resultados, de forma a apontar as possíveis alterações da resposta imune causada por esse fármaco.

Nota-se que o tratamento com a AZA favorece a replicação parasitária em ambas as formas de inóculo. Apesar de não ocorrer diferenças no processo inflamatório e da fibrose em análise qualitativa, observa-se que há nítida diferença em relação à melhor preservação da arquitetura tecidual nos cães do grupo TM em comparação ao grupo TMA. Fato este não visto entre os grupos TS e TSA, pois ambos se apresentavam com pouca preservação tecidual, assim como o grupo TMA.

A avaliação das citocinas nos permitiu confirmar as informações de que o fármaco leva à mudança do perfil imunológico, principalmente quando utilizado junto à forma de infecção TM. Isto ocorre devido ao aumento da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IFN- γ ; Th2, IL-4 e imunomodulatórias IL-10 e TGF- β 1. Assim como também modificou a expressão de CCL3/MIP-1 α e de TLR9. Em suma, pode-se afirmar que existem implicações no tratamento com a AZA frente à forma de inóculo por TM, permitindo a replicação parasitária. Isto parece ocorrer devido ao mecanismo de ação desse fármaco, levando a um possível desequilíbrio da resposta imune. Uma hipótese que possa justificar esse descontrole da resposta imune envolve receptores TLR2 e TLR4. Estudos indicam que estes

receptores atuam via MyD88, estando esta via bloqueada pela AZA (via CD28), o que torna pouco eficaz a função de acidificação e consequente maturação do fagossomo, importante para o processo de controle parasitário (Blander e Medzhitov, 2004). Dado que a via Myd88 é de fundamental importância para dar início a uma resposta Th1. Além disso, o reconhecimento de patógenos por TLR2 e TLR4 indica um mecanismo de associação entre a resposta imune e a fagocitose (Akira, 2003; Zhang *et al.*, 2012).

Esta conjectura é apoiada pelos achados deste trabalho, visto que os cães infectados por formas TM apresentam menor parasitismo em comparação aos grupos TS, TMA e TSA, além de apresentar aumento na expressão dos receptores TLR2 e TLR4. É importante ressaltar que TLR2 pode apresentar função imunomoduladora, isso associado a células T regulatórias, pois além de ser essencial para a produção de citocinas como a IL-12 e TNF- α e do NO, pois camundongos deficientes deste receptor apresentam potente resposta inflamatória, contendo elevados níveis séricos de IFN- γ (Kulkarni *et al.*, 2011).

Uma hipótese acerca do aumento da expressão das citocinas deve aqui ser exposta. Pode-se inferir a possibilidade de uma superexpressão de citocinas oriunda da resposta imune inata, macrófagos e células dendríticas. Isso devido à via de sinalização mediada por TLR9, aliado às formas TS de infecção e também nos grupos TMA e TSA. O aumento da expressão das citocinas nos três grupos acima citados pode estar relacionado à expressão aumentada deste receptor, pois CpG não metilados de *T. cruzi*, são capazes de promover a resposta imune via TLR9 de citocinas por macrófagos e células dendríticas (Shoda *et al.*, 2001; Bafica *et al.*, 2006; Bartholomeu *et al.*, 2008; Caetano *et al.*, 2011). Sobretudo nos grupos TMA e TSA, pois esta ativação independe da via CD28 (MyD88). No entanto, há de se ressaltar que o desequilíbrio da via CD28 causada pelo tratamento com a AZA no grupo TMA pode ser um indício que essas vias de sinalização, CD28 (MyD88) e receptores TLR2, TLR4 e TLR9 apresentam uma ação em conjunto no processo de resistência à infecção pelo *T. cruzi*.

Sabe-se que nos primeiros dias após a infecção em camundongos (7 a 10 dias), antes mesmo da resposta imune adquirida, há uma resposta

imunológica ativada pelas células da resposta imune inata, que desempenham papel fundamental na contenção da parasitemia, através da ação de mediadores microbicidas (reativo intermediários do nitrogênio - RNI e ROS), cuja produção é reforçada pela ação das citocinas pró-inflamatórias (IL-12, TNF- α e IFN- γ) liberadas pelos macrófagos, células natural killer (NK) e T $\gamma\delta$ (Vespa *et al.*, 1994; Sardinha *et al.*, 2006). Assim, pode-se especular que no modelo canino, 42 dias após a infecção, as células da resposta imune inata estão auxiliando o processo de expressão de citocinas, isto aliado às funções efetoras dos linfócitos T CD8⁺ nos cães infectados por formas TM, pois exibem uma expressão de TLR2 e TLR4 e estes receptores medeiam a expressão da IL-12p40 e NO, que são moléculas fundamentais no controle do parasitismo cardíaco (Bafica *et al.*, 2006; Koga *et al.*, 2006; Oliveira *et al.*, 2010; Caetano *et al.*, 2011).

Alterações no sistema imunológico podem afetar a resposta do hospedeiro à infecção. Pacientes chagásicos crônicos podem reativar a infecção pelo *T. cruzi* após imunossupressão relacionada ao HIV (vírus da imunodeficiência humana) (Sartori *et al.*, 2002). A infecção pelo *T. cruzi*, concomitante ao vírus HIV, levou a maiores níveis séricos do TNF- α , IFN- γ e IL-4 nos pacientes em comparação aos pacientes infectados apenas com HIV (Rodrigues *et al.*, 2005). Da mesma forma, pacientes após transplantes de órgão e submetidos a protocolos de imunossupressão, podem apresentar uma piora clínica, como a reativação da infecção chagásica (Marchiori *et al.*, 2007). Dessa forma, como nos quadros de imunossupressão, o tratamento com a AZA pode desencadear alteração na resposta imunológica do cão frente à infecção chagásica. Sabe-se que umas das principais vias que levam ao desencadeamento de uma resposta imune Th1 é a via co-estimulatória CD28 (Tiede *et al.*, 2003). Assim, o tratamento com a AZA parece ter conduzido ao desequilíbrio da resposta imune durante a infecção experimental no modelo canino pelo *T. cruzi*.

Os resultados mostram um quadro de resposta imunológica distinto entre os grupos avaliados. Especula-se que a infecção por formas TS poderá desencadear piora clínica em relação à infecção por formas TM. Estudos

realizados em camundongos revelaram maiores níveis de expressão do TNF- α e IFN- γ no grupo infectado por formas TS. Já os camundongos inoculados por formas TM apresentaram maiores níveis do IFN- γ e da IL-10, mostrando assim uma imunomodulação da resposta imune (Vieira *et al.*, 2012). A avaliação de cães durante a fase aguda e crônica mostrou que o balanço entre a resposta Th1 e Th2 é importante para o controle da forma cardíaca da doença de Chagas, revelando que a presença das citocinas IFN- γ e IL-10 é de suma importância para evitar a forma cardíaca durante a fase crônica (Guedes *et al.*, 2009). Esses trabalhos mostram a importância da IL-10 na infecção pelo *T. cruzi*, como perfil de citocinas imunomodulatória, permitindo o desenvolvimento da resposta imune menos exacerbada. Nesse contexto, espera-se que o TGF- β 1 possa ter funções semelhantes a IL-10 no modelo canino, visto que esses trabalhos não avaliaram esta citocina.

A ação da AZA culmina no bloqueio da Rac1 e consequente inibição de mecanismos de transdução do sinal para NF- κ B e STAT-3. Estes eventos pertencem à via de sinalização mediada pelo co-estimulador CD28, sendo esta a via de sinalização celular preferencialmente usada para desencadear uma resposta imunológica Th1 (Tiede *et al.*, 2003). Verificou-se no presente estudo que o uso da AZA pode ter desencadeado o aumento do processo inflamatório no grupo TMA, devido às alterações nos mecanismos co-estimulatórios e que consequentemente levou ao aumento da replicação parasitária, o qual foi acompanhado do aumento da expressão de todas citocinas aqui avaliadas, chamando a atenção para a IL-4, podendo assim caracterizar perfil de resposta Th2 (Redmond *et al.*, 2009). O tratamento com a AZA frente à forma de inóculo TS não levou ao aumento do número de células inflamatórias, comparando TSA *versus* TS. No entanto, há de se lembrar que o perfil de expressão das citocinas, como: IL-12p40, TNF- α , IFN- γ , IL-4 e TGF- β 1, encontrava-se aumentado mesmo sem a ação do fármaco no grupo TS, assim como o processo inflamatório.

Esses dados mostram que a AZA pode ter desencadeado algumas alterações na resposta imune dos cães. A princípio, a AZA é um fármaco capaz de diminuir a resposta imunológica. No entanto, a sua ação nesse trabalho

levou ao aumento da inflamação e de todas citocinas avaliadas no grupo TMA, assim como aumento da IL-10 no grupo TSA. No primeiro caso, sabe-se que a resposta imune frente ao inóculo por formas TM é de cunho focal e voltada para o controle do parasitismo tecidual. A inoculação dos cães por formas TM, acompanhado pela ação da AZA, levou ao aumento do parasitismo, desencadeando maior migração leucocitária, ampliando a resposta imune. O bloqueio da via co-estimulatória CD28 parece (ou pode) ter inibido a resposta tipo Th1, podendo apresentar assim perfil Th2 da resposta imune no grupo TMA, dificultando o controle do parasitismo com consequente aumento da exposição antigênica pelas APCs, que no intuito de combater o parasitismo, mantém a apresentação antigênica e liberação de citocinas, assim como o recrutamento celular para os sítios de infecção (Minoprio *et al.*, 1986, 1989; Bryan *et al.*, 2010). Ainda, é preciso lembrar que os dados apresentados referem-se à expressão de citocinas, o que permite especular se nos cães dos grupos TMA e TSA houve de fato produção da citocina ou se ocorreu apenas expressão do seu mRNA, já que o bloqueio da via CD28 pode ter causado alterações intracelulares ao ponto de não permitir a sua síntese.

O efeito do tratamento com a AZA no grupo TS levou ao aumento do parasitismo, mas no que diz respeito ao número de células inflamatórias no tecido muscular cardíaco, não se constatou diferenças entre os grupos TS *versus* TSA. No entanto, ressalta-se o fato do intenso processo inflamatório encontrado nos cães infectados por formas TS mesmo na ausência do fármaco. Dessa forma, as formas TS (sob o tratamento com a AZA ou não) levam ao aumento na migração das células imunes, mas, ao mesmo tempo, parece que há desequilíbrio do sistema imune e não conseguem desencadear atividade antiparasitária.

A produção de citocinas nos grupos TMA e TSA pode estar relacionada a diversos fatores. Nesse sentido, alguns estudos apontam para células T, que quando expostas a antígenos em células APCs, que não possuem as moléculas co-estimulatórias B7-1 ou B7-2, se tornam responsivas, sugerindo a não necessidade do segundo sinal de ativação (Lespagnard *et al.*, 1998). Na infecção de camundongos por *Staphylococcus aureus*, ocorreu anergia das

células T CD3⁺, e parece estar relacionada ao mecanismo co-estimulatório CD28 (Ziegler *et al.*, 2011). No entanto, nos grupos TMA e TSA, houve produção de citocinas e quimiocinas, assim com expressão de receptores, que provavelmente foi desencadeada por outras vias, não CD28.

Alguns estudos em artrite reumatoide e síndrome coronária aguda apontam diferenças entre as células CD4⁺CD28⁺ e CD4⁺CD28⁻, sendo que estas produzem altos níveis de IFN- γ . Além disso, a expressão de moléculas citolíticas, como as granzimas e perforinas, geralmente encontradas em células T CD8⁺ e NK, também tem sido mostrada nesse grupo de células em pacientes com artrite reumatoide. Estes fatos podem estar diretamente relacionados à outra via de ativação das células T, não CD28. Pacientes com dermatomiosite e polimiosite apresentam maiores números de células T CD4⁺CD28⁻ e CD8⁺CD28⁻ em meio ao infiltrado muscular, podendo ocorrer alguma correlação entre essas células e a progressão dessas doenças (Fasth *et al.*, 2009). Neste contexto, surgem outros receptores de co-estimulação membros da família do Fator de Necrose Tumoral (TNFR), o OX40 e 4-1BB, sendo que estes podem ter sido ativados nos cães submetidos ao tratamento com a AZA (Pawlik *et al.*, 2003; Thewissen *et al.*, 2007; Dumitriu *et al.*, 2012). Evidências sugerem que esta via, OX40, pode desencadear uma resposta Th2, tanto em camundongos em estudos da asma, quanto em pacientes com essa doença (Kaur e Brightling, 2011). Este quadro é apoiado principalmente no grupo TMA, visto que o aumento da expressão da IL-4, em conjunto com a ausência de expressão da IL-12p40, pode ter implicações ativação da via OX40 e consequentemente desencadear resposta Th2 (Michailowsky *et al.*, 2001; Redmond *et al.*, 2009).

De acordo com os resultados apresentados, levanta-se a hipótese de que a produção de citocinas nos grupos TMA e TSA foi desencadeada por outras vias, não CD28, ou mesmo pelas células da resposta imune inata. Considerando que a via CD28 é fundamental no contexto da resposta Th1, voltada para o controle da infecção pelo *T. cruzi*, especula-se que a exacerbação da resposta imune desencadeada nesses grupos, tenha sido

ativada pelos co-estimuladores da família dos TNFR, contribuindo assim para uma resposta inflamatória intensa e difusa com destruição tecidual exacerbada.

Diante do exposto, elaboraram-se modelos esquemáticos da resposta imune a fim de mostrar as diferenças imunológicas observadas nos animais infectados por diferentes formas do *T. cruzi*, e também perante o tratamento com a AZA (Figura 28). Evidenciou-se que os animais infectados por formas TM apresentam um balanço favorável à expressão relativa da IL-12p40 e dos receptores TLR2 e TLR4. Estes achados parecem ser de fundamental importância para resposta imunomodulada, e para o baixo parasitismo apresentado, visto a íntima relação entre estes receptores e o processo de maturação do fagossomo (Zhang *et al.*, 2012).

Entretanto, verifica-se nos animais infectados por formas TS maior expressão relativa de citocinas, quimiocinas e dos receptores CCR5 e TLR9, sendo que a expressão destes parâmetros não levou ao controle do parasitismo. Estes dados dão suporte à hipótese que as formas TS são potentes em exacerbar o sistema imune, porém a resposta imunológica desencadeada não é capaz de controlar a replicação parasitária, promovendo maior processo inflamatório.

Ao verificar a resposta imune dos animais infectados por formas TM e submetidos ao tratamento com a AZA, constata-se que ocorre mudança no perfil imunológico que pode ter sido originada pela ação do fármaco, e por consequência permitiu a replicação parasitária, podendo ser o fator inicial para a inflamação, a expressão de citocinas (exceto IL-12p40), CCL3/MIP-1 α e TLR9. Dessa forma, nota-se que a ação da AZA pode ter implicações na ausência de expressão dos fatores importantes para o controle do parasitismo, como a IL-12p40, TLR2 e TLR4.

Interessante notar que, a avaliação do grupo TSA não evidenciou expressão desses mediadores imunológicos, com exceção da IL-10, porém ocorreu aumento do parasitismo. Sabe-se que a AZA pode levar ao bloqueio da via co-estimulatória CD28. Dessa forma, sugere-se que em ambos os grupos submetidos a AZA ocorreu o bloqueio desta via. No entanto, nota-se que as respostas imunológicas desencadeadas são distintas nos dois grupos. Porém, o bloqueio da via CD28 pode ter levado à ativação de outras vias do sistema

imune, não eficazes para o controle do parasitismo em ambos os grupos.

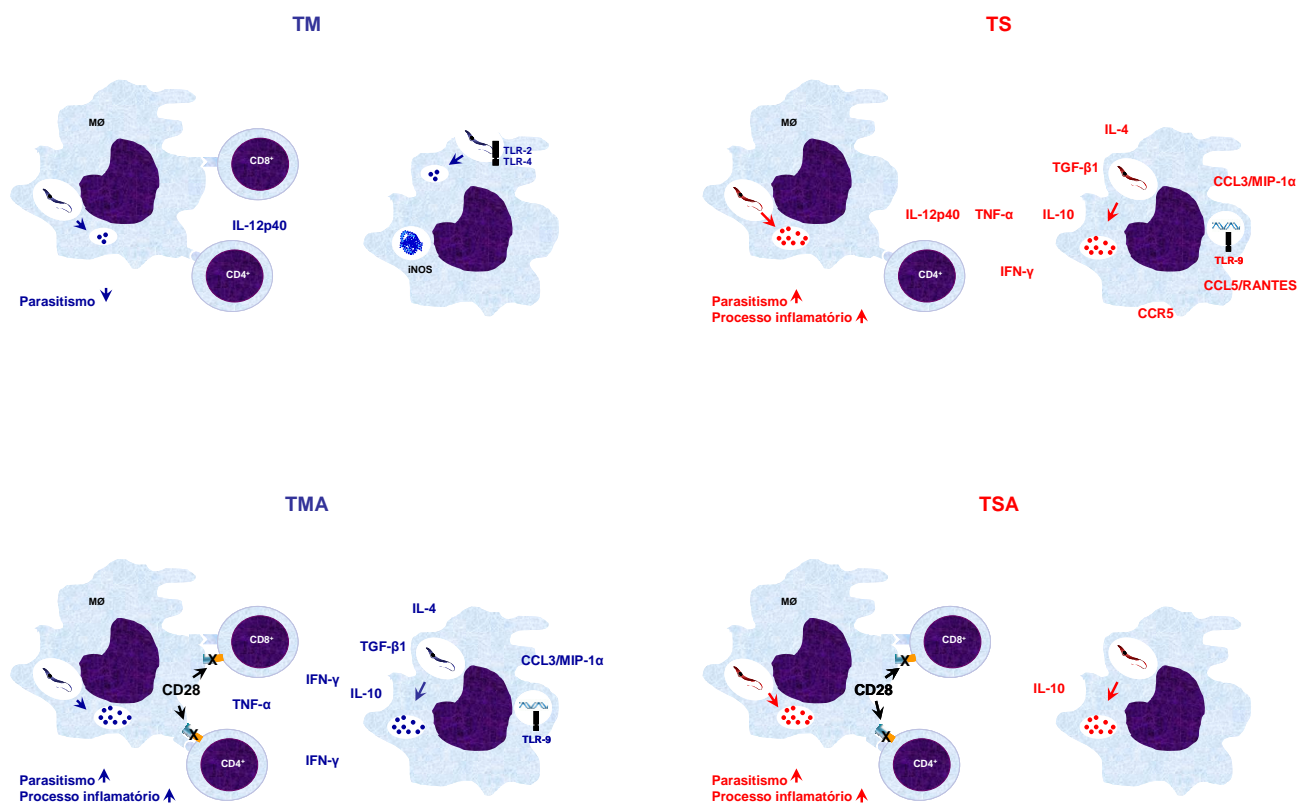


Figura 28: Resposta imune no tecido cardíaco de cães após infecção por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) da cepa Berenice 78 do *Trypanosoma cruzi* eutanasiados durante a fase aguda, tratados com a Azatioprina ou não.

10. Conclusões

A infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas, durante a fase aguda da doença de Chagas, leva a distintos parâmetros parasitológicos e imunológicos no modelo canino:

1. Ocorre aumento da razão da expressão das citocinas IL-12p40/IL-10 e IL-12p40/TGF- β 1 nos cães infectados por formas TM;
2. Os aspectos histopatológicos encontram-se mais bem preservados nos cães infectados por formas TM;
3. Há aumento da expressão relativa de mRNA dos receptores *Toll-like*: TLR2 e TLR4 nos cães infectados por formas TM;
4. O parasitismo está aumentado nos cães infectados por formas TS;
5. Existe intenso processo inflamatório maior nos cães infectados por formas TS;
6. Há aumento da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias IL-12p40, TNF- α , IFN- γ ; Th2, IL-4; imunomodulatórias IL-10 e TGF- β 1 nos cães infectados por formas TS;
7. Há aumento da expressão das quimiocinas CCL3/MIP-1 α e CCL5/RANTES, e do receptor CCR5 nos cães infectados por formas TS;
8. Há aumento da expressão de TLR9 nos cães infectados por formas TS;

A ação da Azatioprina sobre o curso da infecção pelas formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas, durante a fase aguda da doença de Chagas, evidencia mudanças no comportamento imunológico no modelo canino:

1. Aumento do processo inflamatório em ambos os grupos: TMA e TSA em comparação ao grupo NIA;
2. Aumento da expressão relativa de mRNA das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ ; Th2, IL-4; imunomodulatória TGF- β 1 nos cães do grupo TMA;
3. Aumento da expressão relativa de mRNA da quimiocina CCL3/MIP-1 α e de seu receptor, CCR5 nos cães do grupo TMA;
4. Aumento da citocina imunomodulatória IL-10 no grupo TSA;
5. Aumento do receptor TLR9 no grupo TSA;

A ação da Azatioprina frente às formas de infecção tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas, durante a fase aguda da doença de Chagas, mostra um impacto no perfil parasitológico e imunológico no modelo canino.

Nos grupos TM *versus* TMA, verifica-se:

1. Aumento do parasitismo no grupo TMA;
2. Aumento das citocinas pró-inflamatórias TNF- α , IFN- γ ; Th2, IL-4; imunomodulatórias IL-10 e TGF- β 1 nos cães do grupo TMA;
3. Aumento da quimiocina CCL3/MIP-1 α e do receptor TLR9 nos cães do grupo TMA;

Nos grupos TS *versus* TSA, verifica-se:

1. Aumento do parasitismo no grupo TSA.

Em linhas gerais, concluímos neste trabalho que, ao avaliar o parasitismo e a resposta imune no coração de cães, infectados por formas TM e TS, que os cães infectados por formas TM apresentam aspecto histopatológico mais preservado, com baixo parasitismo, um balanço favorável à expressão relativa da IL-12p40 e maior expressão dos receptores TLR2 e TLR4. Em contrapartida, os cães infectados por formas TS apresentam destruição tecidual, alto parasitismo, intenso processo inflamatório e elevada expressão de citocinas, quimiocinas e TLR9.

Ao submeter os animais ao efeito do fármaco Azatioprina e à infecção por diferentes formas do *T. cruzi*, verifica-se que ocorreu desequilíbrio na resposta imune, promovendo aumento do processo inflamatório no grupo TMA, sendo que este fator pode ser determinante nas gênese das lesões da fibra muscular cardíaca. Em suma, a ação da Azatioprina leva à distinta resposta imune nos animais infectados pelo *T. cruzi*, culminando em piora dos aspectos histopatológicos.

Estes dados nos chamam a atenção, visto que a Azatioprina é um fármaco utilizado em terapias imunossupressoras em indivíduos chagásicos que porventura necessitem de transplantes de órgãos. Dessa forma, sugerimos mais estudos relacionados à ação desta droga perante o sistema imune.

Todo caminho da gente é resvaloso. Mas também, cair não prejudica demais. A gente levanta, a gente sobe, a gente volta! ... O correr da vida embrulha tudo, a vida é assim: esquenta e esfria, aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta. O que ela quer da gente é coragem. Ser capaz de ficar alegre e mais alegre no meio da alegria, e ainda mais alegre no meio da tristeza...

João Guimarães Rosa.

11. Referências bibliográficas

Acosta-Rodríguez, E.V., Montes, C.L., Motrán, C.C., Zuniga, E.I., Liu, F.T., Rabinovich, G.A., Gruppi, A. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 172, 493-502 (2004).

Acosta Rodriguez E.V, Zuñiga E, Montes C.L, Gruppi A. Interleukin-4 biases differentiation of B cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice and restrains their fratricide: role of Fas ligand down-regulation and MHC class II-transactivator up-regulation. *J Leukoc Biol.* 73(1):127-36 (2003)

Abel, L.C., Rizzo, L.V., Ianni, B., Albuquerque, F., Bacal, F., Carrara, D., Bocchi E.A., Teixeira H.C., Mady, C, Kalil, J, Cunha-Neto, E. Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN-gamma response to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of autoimmunity* 17, 99-107 (2001).

Abrahamsohn, I.A., da Silva, A.P. & Coffman, R.L. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity* 68, 1975-1979 (2000).

Aliberti, J.C., Cardoso, M.A., Martins, G.A., Gazzinelli, R.T., Vieira, L.Q., Silva, J.S., Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and immunity* 64, 1961-1967 (1996).

Aliberti, J.C., Machado, F.S., Gazzinelli, R.T., Teixeira, M.M. & Silva, J.S. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infection and immunity* 67, 2810-2814 (1999).

Aliberti, J.C., Souto, J.T., Marino, A.P., Lannes-Vieira, J, Teixeira, M.M., Farber, J, Gazzinelli, R.T., Silva, J.S., Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *The American journal of pathology* 158, 1433-1440 (2001).

Almeida, D.R., Carvalho, A.C., Branco, J.N., Pereira, A.P., Correa, L, Vianna, P.V., Buffolo, E, Martinez, E.E. Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. *J Heart Lung Transplant* 15, 988-992 (1996).

Almeida, I.C., Camargo, M.M., Procopio, D.O., Silva, L.S., Mehlert, A., Travassos, L.R., Gazzinelli, R.T. Ferguson, M.A. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *The EMBO journal* 7. 1476-85 (2000).

Almeida, E.A., Silva, E.L., Guariento, M.E., Souza, M.L., Aoki, F.H., Pedro, Rde.J. Fatal evolution of Chagas'disease/Aids co-infection: diagnostic difficulties between myocarditis reactivation and chronic chagasic cardiomyopathy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42, 199-202 (2009).

Amato, J.G., *et al.* [Cutaneous lesions as the only manifestations of reactions to *Trypanosoma cruzi* infection in a recipient of a kidney transplant]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30, 61-63 (1996).

Amato, M.S., Amato Neto, V. & Uip, D.E. [Evaluation of the quality of life in patients with Chagas' disease undergoing a heart transplant]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 30, 159-160 (1997).

Andrade, S.G., Andrade, Z.A. & Sadigursky, M. Combined treatment with a nitrofurazone and a corticoid in experimental Chagas' disease in the dog. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 29, 766-773 (1980).

Andrade, S.G., Pimentel, A.R., de Souza, M.M. & Andrade, Z.A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 63, 64-70 (2000).

Andrade, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 71-80 (1999).

Andrade, Z.A. & Andrade, S.G. [Pathology of experimental Chagas disease in dogs]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 75, 77-95 (1980).

Andrade, Z.A., Andrade, S.G., Sadigursky, M. & Lima, J.A. Experimental Chagas disease in dogs. Morphologic and electrocardiographic relations in the acute phase of the infection. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 35, 485-490 (1980).

Araújo-Jorge, T.C., Waghbi, M.C., Hasslocher-Moreno, A.M., Xavier, S.S., Higuchi, M.L., Keramidas, M., Bailly, S., Feige, J.J. Implication of transforming growth factor-beta1 in Chagas disease myocardopathy. *The Journal of infectious diseases* 186, 1823-1828 (2002).

Araújo-Jorge, T.C., Waghbi, M.C., Soeiro, Mde.N., Keramidas, M., Bailly, S., Feige, J.J. Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic myocardopathy. *Cytokine & growth factor reviews* 19, 405-413 (2008).

Araya, J.E., Cano, M.I., Yoshida, N. & da Silveira, J.F. Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and biochemical parasitology* 65, 161-169 (1994).

Bafica, A., Santiago, H.C., Goldszmid, R., Ropert, C., Gazzinelli, R.T., Sher, A. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol* 177, 3515-3519 (2006).

Bahia, M.T., Tafuri, W.L., Caliari, M.V., Veloso, V.M., Carneiro, C.M., Coelho, G.L., Lana, M. Comparison of *Trypanosoma cruzi* infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via

intraperitoneal and conjunctival routes. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 35, 339-345 (2002).

Bahia-Oliveira, L.M., Gomes, J.A., Rocha, M.O., Moreira, M.C., Lemos, E.M., Luz, Z.M., Pereira, M.E., Coffman, R.L., Dias, J.C., Cançado, J.R., Gazzinelli, G., Corrêa-Oliveira, R. IFN-gamma in human Chagas' disease: protection or pathology.

Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al 31, 127-131 (1998).

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

Bart, A., Hodiamont, C.J., Grobusch, M.P., van den Brink, R.B., Smout, A.J., van Gool, T. Chagas disease in the Netherlands: an estimate of the number of patients. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* 155, A3170 (2011).

Bellio, M., Liveira, A.C., Mermelstein, C.S., Capella, M.A., Viola, J.P., Levraud, J.P., Dosreis, G.A., Previato, J.O., Mendonca-Previato, L. Costimulatory action of glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*: increased interleukin 2 secretion and induction of nuclear translocation of the nuclear factor of activated T cells 1. *Faseb J.* 12. 1627-36 (1999).

Bern, C., Verastegui, M., Gilman, R.H., Lafuente, C., Galdos-Cardenas, G., Calderon, M., Pacori, J., Del Carmen, A.M., Aparicio, H., Brady, M.F., Ferrufino, L., ângulo, N., Marcus, S., Sterling, C., Maguire, J.H. Congenital *Trypanosoma cruzi* transmission in Santa Cruz, Bolivia. *Clin Infect Dis* 49, 1667-1674 (2009).

Blander, J.M., Medzhitov, R. Regulation of phagosome maturation by signals from toll-like receptors. *Science.* 304. 5673. 1014-8 (2004).

Borges, C.R., Rodrigues Junior, V., dos Reis, M.A., Castellano, L.R., Chica, J.E., Pereira, S.A., Santos, E.S., Rodrigues, D.B. Role of nitric oxide in the development of cardiac lesions during the acute phase of experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42, 170-174 (2009).

Brener, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 4. 389-96 (1962)

Brener, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann Trop Med Parasitol*. 63. 2. 215-20 (1969)

Brener, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual review of microbiology* 27, 347-382 (1973).

Brener, Z. e Gazzinelli, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*. v. 114(2), p. 103-110 (1997).

Bryan, M.A., Guyach, S.E., Norris, K.A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. *PLoS Negl Trop Dis*. 4. 7. e733 (2010).

Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. A 120-kDa alkaline peptidase from *Trypanosoma cruzi* is involved in the generation of a novel Ca(2+)-signaling factor for mammalian cells. *The Journal of biological chemistry* 270, 5172-5180 (1995a).

Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual review of microbiology* 49, 175-200 (1995b).

Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Current opinion in microbiology* 1, 461-465 (1998).

Burleigh, B.A., Caler, E.V., Webster, P. & Andrews, N.W. A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *The Journal of cell biology* 136, 609-620 (1997).

Burr, J.S., Savage, N.D., Messah, G.E., Kimzey, S.L., Shaw, A.S., Arch, R.H., Green, J.M. Cutting edge: distinct motifs within CD28 regulate T cell proliferation and induction of Bcl-XL. *J Immunol* 166, 5331-5335 (2001).

Caetano, B.C., Carmo, B.B., Melo, M.B., Cerny, A., Santos, S.L., Bartholomeu, D.C., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. Requirement of UNC93B1 reveals a critical role for TLR7 in host resistance to primary infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol* 187. 4. 1903-11 (2011).

Caldas, S., Caldas, I.S., Diniz, L.F., Lima, W.G., Oliveira, R.P., Cecílio, A.B, Ribeiro, I., Talvani, A., Bahia, M.T. Real-time PCR strategy for parasite quantification in blood and tissue samples of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Acta tropica* (2012).

Caler, E.V., Morty, R.E., Burleigh, B.A. & Andrews, N.W. Dual role of signaling pathways leading to Ca(2+) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity* 68, 6602-6610 (2000).

Caliari, M.V., do Pilar Machado, R., de Lana, M., Caja, R.A., Carneiro, C.M., Bahia, M.T., dos Santos C.A., Magalhaes, G.A., Sampaio, I.B., Tafuri, W.L. Quantitative analysis of cardiac lesions in chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 44, 273-278 (2002).

Caliari, M.V., Lana, M., Leite, V.H. & Tafuri, W.L. Morphological and morphometric study of atrial specific granules and other secretory components in dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *International journal of experimental pathology* 76, 299-307 (1995).

Calzada, J.E., Nieto, A., Beraun, Y. & Martin, J. Chemokine receptor CCR5 polymorphisms and Chagas' disease cardiomyopathy. *Tissue antigens* 58, 154-158 (2001).

Campos, M.A., Almeida, I.C., Takeuchi, O., Akira, S., Valente, E.P., Procópio, D.O., Travassos, L.R., Smith, J.A., Golenbock, D.T., Gazzinelli, R.T. Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. *J Immunol* 167, 416-423 (2001).

Campos, S.V., Strabelli, T.M, Amato, Neto, V., Silva, C.P., Bacal, F., Bocchi, E.A., Stolf, N.A. Risk factors for Chagas' disease reactivation after heart transplantation. *J Heart Lung Transplant* 27, 597-602 (2008).

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 Sao Paulo*. v. 48(5), p. 287-289 (2006).

Carneiro, C.M., Martins-Filho, O.A., Reis, A.B., Veloso, V.M., Araújo, F.M., Bahia, M.T., de Lana, M., Machado-Coelho, G.L., Gazzinelli, G., Correa-Oliveira, R., Tafuri, W.L. Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Acta tropica* 101, 120-129 (2007).

Carrera-Silva, E.A., Guinazu, N., Pellegrini, A., Cano, R.C., Arocena, A., Aoki, M.P., Gea, S. Importance of TLR2 on hepatic immune and non-immune cells to attenuate the strong inflammatory liver response during *Trypanosoma cruzi* acute infection. *PLoS Negl Trop Dis*. 4. 11. e863 (2010).

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

Centers for Disease Control and Prevention (<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/epi.html>) (acessado em 2014).

Centers for Disease Control and Prevention

(<http://www.cdc.gov/parasites/chagas/publications.html>)

Chin-Hong, P.V., Schwartz, B.S., Bern, C., Montgomery, S.P., Kontak, S., Kubak, B., Morris, M.I., Nowicki, M., Wright, C., Ison, M.G. Screening and treatment of chagas disease in organ transplant recipients in the United States: recommendations from the chagas in transplant working group. *Am J Transplant* 11, 672-680 (2011).

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 Suppl 3, 113-117 (2006).

Coura, J.R., Anunziato, N. & Willcox, H.P. [Chagas' disease morbidity. I - Study of cases originating in various states of Brazil, observed in Rio de Janeiro]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 78, 363-372 (1983).

Coura, J.R. e Dias, J.C. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 31-40 (2009).

Coura, J.R., Junqueira, A.C., Boia, M.N., Fernandes, O., Bonfante, C., Campos, J.E., Santos, L., Devera, R. Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 44, 159-165 (2002a).

Coura, J.R., Junqueira, A.C., Fernandes, O., Valente, S.A. & Miles, M.A. Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. *Trends in parasitology* 18, 171-176 (2002b).

Coura-Vital, W., Carneiro, C.M., Martins, H.R., de Lana, M., Veloso, V.M., Teixeira-Carvalho, A., Bahia, M.T., Corrêa-Oliveira, R., Martins-Filho, O.A., Tafuri, W.L, Reis, A.B. *Trypanosoma cruzi*: immunoglobulin isotype profiles during the acute phase of canine experimental infection with metacyclic or blood trypomastigotes. *Experimental parasitology* 120, 269-274 (2008).

Couto, C.A., Bittencourt, P.L., Farias, A.Q., Lallee, M.P., Cançado, E.L., Massarollo, P.C., Mies, S. Human polyclonal anti-hepatitis B surface antigen immunoglobulin reduces the frequency of acute rejection after liver transplantation for chronic hepatitis B. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 43, 335-337 (2001).

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

Cunha-Neto, E., Rizzo, L.V., Albuquerque, F., Abel, L., Guilherme, L., Bocchi, E., Bacal, F., Carrara, D., Ianni, B., Mady, C., Kalil, J. Cytokine production profile of heart-infiltrating T cells in Chagas' disease cardiomyopathy. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica ... [et al* 31, 133-137 (1998).

Cummings, K.L., Tarleton, R.L. Inducible nitric oxide synthase is not essential for control of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infect Immun.* 72. 7. 4081-9 (2004).

Dumitriu, I.E, Baruah, P., Finlayson, C.J., Loftus, I.M., Antunes, R.F., Lim, P., Bunce, N., Kaski, J.C. High levels of costimulatory receptors OX40 and 4-1BB characterize CD4+CD28null T cells in patients with acute coronary syndrome. *Circ Res.* 2012 16;110(6):857-69 (2012).

d'Imperio Lima, M.R., Eisen, H., Minoprio, P., Joskowicz, M. & Coutinho, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *J Immunol* 137, 353-356 (1986).

Docampo, R., Scott, D.A., Vercesi, A.E. & Moreno, S.N. Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. *The Biochemical journal* 310 (Pt 3), 1005-1012 (1995).

Dorta, M.L., Ferreira, A.T., Oshiro, M.E. & Yoshida, N. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Molecular and biochemical parasitology* 73, 285-289 (1995).

DosReis, G.A., Peçanha, L.M., Bellio, M., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L. Glycoinositol phospholipids from *Trypanosoma cruzi* transmit signals to the cells of the host immune system through both ceramide and glycan chains. *Microbes Infect.* 4. (9):1007-13 (2002).

Dutra, W.O., Luz, Z.M., Cançado, J.R., Pereira, M.E., Brigido-Nunes, R.M., Galvão, L.M., Colley, D.G., Brener, Z., Gazzinelli, G., Carvalho-Parra, J.F. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite immunology* 18, 579-585 (1996).

Espira, L. & Czubryt, M.P. Emerging concepts in cardiac matrix biology. *Canadian journal of physiology and pharmacology* 87, 996-1008 (2009).

Engman, D.M. & Leon, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. *Acta tropica* 81, 123-132 (2002).

Fasth, A.E., Dastmalchi, M., Rahbar, A., Salomonsson, S., Pandya, J.M., Lindroos E., Nennesmo, I., Malmberg, K.J., Söderberg-Nauclér, C., Trollmo, C., Lundberg, I.E., Malmström, V. T cell infiltrates in the muscles of patients with dermatomyositis and polymyositis are dominated by CD28null T cells. *J Immunol.* 183(7). 4792-9 (2009).

Ferraz, M.L., Gazzinelli, R.T., Alves, R.O., Urbina, J.A. & Romanha, A.J. Absence of CD4⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes, or B lymphocytes has different effects on the efficacy of posaconazole and benznidazole in treatment of experimental acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 53, 174-179 (2009).

Ferreira, D., Cortez, M., Atayde, V.D. & Yoshida, N. Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. *Infection and immunity* 74, 5522-5528 (2006).

Ferreira, M.S. Chagas disease and immunosuppression. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 325-327 (1999).

Ferreira, M.S., Nishioka, S.A., Silvestre, M.T., Borges, A.S., Nunes-Araújo, F.R., Rocha, A. Reactivation of Chagas' disease in patients with AIDS: report of three new cases and review of the literature. *Clin Infect Dis* 25, 1397-1400 (1997).

Fuenmayor, C., Higuchi, M.L., Carrasco, H., Parada, H., Gutierrez, P., Aiello, V., Palomino, S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. *Acta cardiologica* 60, 33-37 (2005).

Fuenmayor, C., Higuchi, M.L., Carrasco, H., Parada, H., Gutierrez, P., Aiello, V., Palomino, S. Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. 60(1). 33-7 (2005).

Gascón, J., Albajar, P., Cañas, E., Flores, M., Gómez, i Prat J., Herrera, R.N., Lafuente, C.A., Luciardi, H.L., Moncayo, A., Molina, L., Muñoz, J., Puente, S., Sanz, G., Treviño, B., Sergio-Salles, X. Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic. *Revista española de cardiología* 60, 285-293 (2007).

Gascon, J., Bern, C., Pinazo, M.J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. *Acta Trop.* 115, 22-7 (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, 2501-2506 (1992).

Giordano, R., Fouts, D.L., Tewari, D., Colli, W., Manning, J.E., Alves, M.J. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *The Journal of biological chemistry* 274, 3461-3468 (1999).

Girones, N., Cuervo, H. & Fresno, M. *Trypanosoma cruzi*-induced molecular mimicry and Chagas' disease. *Current topics in microbiology and immunology* 296, 89-123 (2005).

Girones, N. & Fresno, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? *Trends in parasitology* 19, 19-22 (2003).

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, 1185-1193 (2003).

Grellier, P., Vendeville, S., Joyeau, R., Bastos, I.M., Drobecq, H., Frappier, F., Teixeira, A.R., Schrével, J., Davioud-Charvet, E., Sergheraert, C., Santana, J.M. *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *The Journal of biological chemistry* 276, 47078-47086 (2001).

Guedes, P.M., Urbina, J.A., de Lana, M., Afonso, L.C., Veloso, V.M., Tafuri, W.L., Machado-Coelho, G.L., Chiari, E., Bahia, M.T. Activity of the new triazole derivative albaconazole against *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi* in dog hosts. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 48, 4286-4292 (2004).

Guedes, P.M., Veloso, V.M., Afonso, L.C., Caliari, M.V., Carneiro, C.M., Diniz, L.F., Marques-da-Silva, E.A., Caldas, I.S., Do Valle Matta, M.A. Souza, S.M., Lana, M.,

Chiari, E., Galvao, L.M. e Bahia, M.T. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. *Veterinary immunology and immunopathology* 130, 43-52 (2009).

Guedes, P.M., Veloso, V.M., Caliari, M.V., Carneiro, C.M., Souza, S.M., Lana, M., Chiari, E., Bahia, M.T., Galvão, L.M.C. *Trypanosoma cruzi* high infectivity in vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 102, 141-147 (2007).

Guedes, P.M., Veloso, V.M., Gollob, K.J., Afonso, L.C., Caldas, I.S., Vianna, P., Lana, M., Chiari, E., Bahia, M.T., Galvao, L.M. IgG isotype profile is correlated with cardiomegaly in Beagle dogs infected with distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *Veterinary immunology and immunopathology* 124, 163-168 (2008).

Guedes, P.M., Veloso, V.M., Tafuri, W.L., Galvao, L.M., Carneiro, C.M., Lana, M., Chiari, E., Ataíde Soares, K., Bahia, M.T. The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta tropica* 84, 9-17 (2002).

Guedes, P.M., Veloso, V.M., Talvani, A., Diniz, L.F., Caldas, I.S., Do-Valle-Matta, M.A., Santiago-Silva, J., Chiari, E., Galvão, L.M., Silva, J.S., Bahia, M.T. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. *Veterinary immunology and immunopathology* 138, 106-113 (2010).

Hansen, D.S., Villacres-Eriksson, M., Akerblom, L., Hellman, U., Segura, E., Carlomagno, M., Morein, B. An immunoaffinity-purified *Trypanosoma cruzi* antigen suppresses cellular proliferation through a TGF-beta-mediated mechanism. *Scandinavian journal of immunology* 47, 509-516 (1998).

Hardison, J.L., Wrightsman, R.A., Carpenter, P.M., Kuziel, W.A., Lane, T.E., Manning, J.E. The CC chemokine receptor 5 is important in control of parasite replication and acute cardiac inflammation following infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity* 74, 135-143 (2006).

Higuchi, M.D., Ries, M.M., Aiello, V.D., Benvenuti, L.A., Gutierrez, P.S., Bellotti, G., Pileggi, F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 56, 485-489 (1997).

Higuchi, M.L., Gutierrez, P.S., Aiello, V.D., Palomino, S., Bocchi, E., Kalil, J., Bellotti, G., Pileggi, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 423, 157-60 (1993).

Higuchi M.L., Benvenuti, L.A., Martins Reis, M. & Metzger, M. Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovascular research* 60, 96-107 (2003).

Higuchi, M.L. Chagas disease. Importance of the parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 64, 251-254 (1995).

Hoft, D.F., Schnapp, A.R., Eickhoff, C.S. & Roodman, S.T. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity* 68, 197-204 (2000).

Hoft, D.F. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 55, 360-364 (1996).

Huibregtse, I.L., van Lent, A.U. & van Deventer, S.J. Immunopathogenesis of IBD: insufficient suppressor function in the gut? *Gut* 56, 584-592 (2007).

Jackson, Y., Angheben, A., Carrilero Fernandez, B., Jansa, i Lopez del Vallado, J.M., Jannin, J.G., Albajar-Viñas, P. Management of Chagas disease in Europe. Experiences and challenges in Spain, Switzerland and Italy. *Bull Soc Pathol Exot.* 102, 326-9 (2009).

Kalil, J. & Cunha-Neto, E. Autoimmunity in chagas disease cardiomyopathy: Fulfilling the criteria at last? *Parasitology today (Personal ed 12, 396-399 (1996).*

Kaur ,D., Brightling, C. OX40/OX40 ligand interactions in T-cell regulation and asthma. *Chest. 141, 494-9 (2012).*

Kayama H, Koga R, Atarashi K, Okuyama M, Kimura T, Mak T.W, Uematsu S, Akira S, Takayanagi H, Honda K, Yamamoto M, Takeda K. NFATc1 mediates Toll-like receptor-independent innate immune responses during *Trypanosoma cruzi* infection. *PLoS Pathog. 5, e1000514 (2009).*

Kierszenbaum, F. Autoimmunity in Chagas' disease. *The Journal of parasitology 72, 201-211 (1986).*

Kierszenbaum, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. *Clinical microbiology reviews 12, 210-223 (1999).*

Kierszenbaum, F. Views on the autoimmunity hypothesis for Chagas disease pathogenesis. *FEMS immunology and medical microbiology 37, 1-11 (2003).*

Kierszenbaum, F. Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease? *Trends in parasitology 21, 513-516 (2005).*

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

Kroll-Palhares, K., *et al.* TNF/TNFR1 signaling up-regulates CCR5 expression by CD8+ T lymphocytes and promotes heart tissue damage during *Trypanosoma cruzi* infection: beneficial effects of TNF-alpha blockade. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz 103, 375-385 (2008).*

Koga, R., Hamano, S., Kuwata, H., Atarashi, K., Ogawa, M., Hisaeda, H., Yamamoto, M., Akira, S., Himeno, K., Matsumoto, M., Takeda, K. TLR-

dependent induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 177, 7059-66 (2006).

Kulkarni, R., Behboudi, S., Sharif, S. Insights into the role of Toll-like receptors in modulation of T cell responses. *Cell Tissue Res.* 343, 141-52 (2011).

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

Lana, M., Chiari, E. & Tafuri, W.L. Experimental Chagas' disease in dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 87, 59-71 (1992).

Lana, M., da Silveira Pinto A., Barnabé, C., Quesney, V, Noël, S., Tibayrenc, M. *Trypanosoma cruzi*: compared vectorial transmissibility of three major clonal genotypes by *Triatoma infestans*. *Experimental parasitology* 90, 20-25 (1998).

Lana, M. & Chiari, C.A. Comparative biological characterization of Berenice and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 81, 247-253 (1986).

Laranja, F.S. [Clinical aspects of Chagas' disease]. *Revista brasileira de medicina* 10, 482-491 (1953).

Laranja, F.S. & Andrade, Z.A. Chronic cardiac form of chagas disease in dogs. *Arquivos brasileiros de cardiologia* 35, 377-380 (1980).

Leiby, D.A., Herron, R.M.Jr., Read, E.J., Lenes, B.A., Stumpf, R.J. *Trypanosoma cruzi* in Los Angeles and Miami blood donors: impact of evolving donor demographics on seroprevalence and implications for transfusion transmission. *Transfusion.* Volume 42, Issue 5, pages 549–555 (2002)

Leon, J.S. & Engman, D.M. Autoimmunity in Chagas heart disease. *International journal for parasitology* 31, 555-561 (2001).

Leon, J.S., Godsel, L.M., Wang, K. & Engman, D.M. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infection and immunity* 69, 5643-5649 (2001).

Lespagnard, L., Mettens, P., De Smedt, T., Bazin, H., Urbain, J., Leo, O., Moser, M. The immune response induced in vivo by dendritic cells is dependent on B7-1 or B7-2, but the inhibition of both signals does not lead to tolerance. *Int Immunol.* 10, 295-304 (1998).

Letterio, J.J. & Roberts, A.B. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function. *Clinical immunology and immunopathology* 84, 244-250 (1997).

Lima, E.C., Garcia, I., Vicentelli, M.H., Vassalli, P. & Minoprio, P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Infection and immunity* 65, 457-465 (1997).

Machado, F.S., Koyama, N.S., Carregaro, V., Ferreira, B.R., Milanezi, C.M., Teixeira, M.M., Rossi, M.A., Silva, J.S. CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *The Journal of infectious diseases* 191, 627-636 (2005).

Mahadevan, U., Loftus, E.V.Jr., Tremaine, W.J., Pemberton, J.H., Harmsen, W.S., Schleck, C.D., Zinsmeister, A.R., Sandborn, W.J. Azathioprine or 6-mercaptopurine before colectomy for ulcerative colitis is not associated with increased postoperative complications. *Inflammatory bowel diseases* 8, 311-316 (2002).

Malaga, S. & Yoshida, N. Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. *Infection and immunity* 69, 353-359 (2001).

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. *Archives of oral biology* 49, 443-450 (2004).

Maltzman, J.S. & Koretzky, G.A. Azathioprine: old drug, new actions. *The Journal of clinical investigation* 111, 1122-1124 (2003).

Manzullo, E.C. & Chuit, R. Risk of death due to chronic chagasic cardiopathy. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 94 Suppl 1, 317-320 (1999).

Marchiori, P.E., Alexandre, P.L., Britto, N., Patzina, R.A., Fiorelli, A.A., Lucato, L.T., Rosemberg, S., Pereira, S.L., Stolf, N.G., Scaff, M. Late reactivation of Chagas' disease presenting in a recipient as an expansive mass lesion in the brain after heart transplantation of chagasic myocardopathy. *J Heart Lung Transplant.* ;26, 1091-6 (2007).

Marino, A.P., da Silva, A., dos Santos, P., Pinto, L.M., Gazzinelli, R.T., Teixeira, M.M., Lannes-Vieira, J. Regulated on activation, normal T cell expressed and secreted (RANTES) antagonist (Met-RANTES) controls the early phase of *Trypanosoma cruzi*-elicited myocarditis. *Circulation* 110, 1443-1449 (2004).

Martin, D. & Tarleton, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunological reviews* 201, 304-317 (2004).

Martin, D.L., Postan, M., Lucas, P., Gress, R. & Tarleton, R.L. TGF-beta regulates pathology but not tissue CD8+ T cell dysfunction during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *European journal of immunology* 37, 2764-2771 (2007).

Medeiros, M.M., Peixoto, J.R., Oliveira, A.C., Cardilo-Reis, L., Koatz, V.L., Van Kaer, L., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Nobrega, A., Bellio, M. Toll-like receptor 4 (TLR4)-dependent proinflammatory and immunomodulatory properties of the glycoinositolphospholipid (GIPL) from *Trypanosoma cruzi*. *J Leukoc Biol.* 82, 488-96 (2007).

Michailowsky, V., Silva, N.M., Rocha, C.D., Vieira, L.Q., Lannes-Vieira, J., Gazzinelli, R.T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during

Trypanosoma cruzi infection. *The American journal of pathology* 159, 1723-1733 (2001).

Ming, M., Ewen, M.E. & Pereira, M.E. Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell* 82, 287-296 (1996).

Minoprio, P.M., Coutinho, A., Joskowicz, M., D'Imperio Lima, M.R., Eisen, H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scand J Immunol.* 24, 669-79 (1986).

Minoprio, P.M., Eisen, H., Forni, L., D'Imperio Lima, M.R., Joskowicz, M., Coutinho, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol.* 24, 661-8 (1986).

Minoprio, P., Bandeira, A., Pereira, P., Mota Santos, T. & Coutinho, A. Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *International immunology* 1, 176-184 (1989).

Molina, H.A. & Kierszenbaum, F. Interaction of human eosinophils or neutrophils with *Trypanosoma cruzi* in vitro causes bystander cardiac cell damage. *Immunology* 66, 289-295 (1989).

Moncayo, A. Chagas disease: current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone countries. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 98, 577-591 (2003).

Moncayo, A.L. & Cooper, P.J. Geohelminth infections: impact on allergic diseases. *The international journal of biochemistry & cell biology* 38, 1031-1035 (2006).

Morato, M.J., Colley, D.G. & Powell, M.R. Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. *Brazilian journal of medical and biological research. Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 31, 123-125 (1998).

Muller, U., *et al.* 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, 70-78 (2003).

Neira, I., Ferreira, A.T. & Yoshida, N. Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *International journal for parasitology* 32, 405-414 (2002).

Neto, M. P., Alves, A.N.L., Fortini, A.S., Burattini, M.N., Sumita, N.M., Srougi, M., ocair, P.R. Monitoração terapêutica da azatioprina: uma revisão. *Bras Patol Med Lab* v. 44 - n. 3 - p. 161-167 (2008).

Noireau, F. Wild *Triatoma infestans*, a potential threat that needs to be monitored. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* 104 Suppl 1, 60-64 (2009).

Okkenhaug, K., Wu, L., Garza, K.M., La Rose J., Khoo, W., Odermatt, B., Mak, T.W., Ohashi, P.S., Rottapel, R. A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nature immunology* 2, 325-332 (2001).

Oliveira, A.C., Peixoto, J.R., de Arruda, L.B., Campos, M.A., Gazzinelli, R.T., Golenbock, D.T., Akira, S., Previato, J.O., Mendonça-Previato, L., Nobrega, A., Bellio, M. Expression of functional TLR4 confers proinflammatory responsiveness to *Trypanosoma cruzi* glycoinositolphospholipids and higher resistance to infection with *T. cruzi*. *J Immunol* 173, 5688-5696 (2004).

Oliveira, A.C., de Alencar, B.C., Tzelepis, F., Klezewsky, W., da Silva, R.N., Neves, F.S., Cavalcanti, G.S., Boscardin, S., Nunes, M.P., Santiago, M.F., Nóbrega, A., Rodrigues, M.M., Bellio, M. Impaired innate immunity in Tlr4(-/-) mice but preserved CD8+ T cell responses against *Trypanosoma cruzi* in Tlr4, Tlr2-, Tlr9- or Myd88-deficient mice. *PLoS pathogens* 6, e1000870 (2010).

Okkenhaug, K., Wu, L., Garza, K.M., La Rose, J., Khoo W, Odermatt B, Mak TW, Ohashi P.S, Rottapel R. A point mutation in CD28 distinguishes proliferative signals from survival signals. *Nat Immunol.* 2, 325-32 (2001).

Ouaissi, A., Guilvard, E., Delneste, Y., Caron, G., Magistrelli, G., Herbault, N., Thieblemont, N., Jeannin, P. The *Trypanosoma cruzi* Tc52-released protein induces human dendritic cell maturation, signals via Toll-like receptor 2, and confers protection against lethal infection. *J Immunol* 168, 6366-6374 (2002).

Pacheco, C.M., Queiroz, C.M.Jr., Maltos, K.L., Caliari, M.V., Rocha, O.A., Francischi, J.N. Local opioids in a model of periodontal disease in rats. *Archives of oral biology* 52, 677-683 (2007).

Padilla, A.M., Bustamante, J.M., Tarleton, R.L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol.* 21, 385-90 (2009).

Padilla, A., Xu D, Martin, D., Tarleton, R. Limited role for CD4+ T-cell help in the initial priming of *Trypanosoma cruzi*-specific CD8+ T cells. *Infect Immun.* 75, 31-5 (2007).

Paiva, C.N., Souto-Padron, T., Costa, D.A., Gattass, C.R. High expression of a functional cruzipain by a non-infective and non-pathogenic *Trypanosoma cruzi* clone. *Parasitology* 117 (Pt 5), 483-490 (1998).

Parada, H., Carrasco, H.A., Anez, N., Fuenmayor, C. & Inglessis, I. Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *International journal of cardiology* 60, 49-54 (1997).

Pawlik, A., Florczak, M., Masiuk, M., Dutkiewicz, G., Machalinski, B., Rozanski, J., Domanski, L., Gawrońska-Szklarz, B. The expansion of CD4+CD28- T cells in patients with chronic kidney graft rejection. *Transplant Proc.* 35, 2902-4 (2003).

Pinto, A.M., Sales, P.C., Camargos, E.R. & Silva, A.M. Tumour necrosis factor (TNF)-mediated NF-kappaB activation facilitates cellular invasion of non-professional phagocytic epithelial cell lines by *Trypanosoma cruzi*. *Cellular microbiology* 13, 1518-1529 (2011).

Pirmez, C. e Ribeiro dos Santos, R. Autoreactivity in chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Ciência e Cultura*. v. 46, p. 418-422 (1994).

Pittella, J.E. Central nervous system involvement in Chagas' disease. An updating. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*. v. 35(2), p. 111-116 (1993).

Prata, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *The Lancet infectious diseases* 1, 92-100 (2001).

Puigbó, J.J., Acquatella, H., Giordano, H. e Suárez, C. Análisis de los factores de riesgo en la cardiopatía crônica. Em: Madorey, R., Madorey, C., e Cámara, M.L. (orgs). *Actualizaciones em la Enfermedad de Chagas*. Congresso Nacional de Medicina. P. 57-78. Buenos Aires (1993).

Ramirez, L.E., Lages-Silva, E., Soares Junior, J.M. & Chapadeiro, E. [Experimental hamster infection by *Trypanosoma cruzi*: the chronic phase]. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 26, 253-254 (1993).

Ramos Junior, A.N., Correia, D., Almeida, E.A. & Shikanai-Yasuda, M.A. History, current issues and future of the brazilian network for attending and studying *Trypanosoma cruzi*/HIV coinfection. *Journal of infection in developing countries* 4, 682-688 (2010)

Reis, D.D., Jones, E.M., Tostes, S.Jr., Lopes, E.R., Gazzinelli, G., Colley, D.G, McCurley, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg.* 48, 637-44 (1993).

Reis, M.M., Higuchi Mde, L., Aiello, V.D. & Benvenuti, L.A. Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 33, 509-518 (2000).

Riera, C., Guarro, A., Kassab, H.E., Jorba, J.M., Castro, M., Angrill, R., Gállego, M., Fisa, R., Martín, C., Lobato, A., Portús, M. Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 75, 1078-1081 (2006).

Rinkardt, N.E., Kruth, S.A. & Kaushik, A. The effects of prednisone and azathioprine on circulating immunoglobulin levels and lymphocyte subpopulations in normal dogs. *Canadian journal of veterinary research = Revue canadienne de recherche vétérinaire* 63, 18-24 (1999).

Rodriguez, A., Rioult, M.G., Ora, A. & Andrews, N.W. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *The Journal of cell biology* 129, 1263-1273 (1995).

Rodrigues, D.B., Correia, D., Marra, M.D, Giraldo, L.E., Lages-Silva. E., Silva-Vergara, M.L., Barata, C.H., Rodrigues Juni, V. Cytokine serum levels in patients infected by human immunodeficiency virus with and without *Trypanosoma cruzi* coinfection. *Rev Soc Bras Med Trop.* 38, 483-7 (2005).

Roffe, E., Oliveira, F., Souza, A.L., Pinho, V., Souza, D.G., Souza, P.R., Russo, R.C., Santiago, H.C., Romanha, A.J., Tanowitz, H.B., Valenzuela, J.G., Teixeira, M.M. Role of CCL3/MIP-1alpha and CCL5/RANTES during acute *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 12, 669-676 (2010).

Ropert, C., Ferreira, L.R., Campos, M.A., Procópio, D.O., Travassos, L.R., Ferguson, M.A., Reis, L.F., Teixeira, M.M., Almeida, I.C., Gazzinelli, R.T. Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Microbes and infection / Institut Pasteur* 4, 1015-1025 (2002).

Roport, C., Almeida, I.C., Closel, M., Travassos, L.R., Ferguson, M.A., Cohen, P., Gazzinelli, R.T. Requirement of mitogen-activated protein kinases and I kappa B phosphorylation for induction of proinflammatory cytokines synthesis by macrophages indicates functional similarity of receptors triggered by glycosylphosphatidylinositol anchors from parasitic protozoa and bacterial lipopolysaccharide. *J Immunol.* 166, 3423-31 (2001).

Rossi, M.A. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int J Cardiol.* 66, 183-94 (1998).

Rottenberg, M.E., Bakhiet, M., Olsson T., Kristensson, K., Mak, T., Wigzell, H., Orn, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. *Infect Immun.* 61, 5129-33 (1993).

Rottenberg, M.E., Sporrang, L., Persson, I., Wigzell, H., Orn, A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. *Scand J Immunol.* 41, 164-70 (1995).

Rottenberg, M.E., Riarte, A., Sporrang, L., Altcheh, J., Petray, P., Ruiz, A.M., Wigzell, H., Orn, A. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. *Immunol Lett.* 45, 53-60 (1995).

Sardinha, L.R., Elias, R.M., Mosca, T., Bastos, K.R., Marinho, C.R., D'Império Lima, M.R., Alvarez, J.M. Contribution of NK, NK T, gamma delta T, and alpha beta T cells to the gamma interferon response required for liver protection against *Trypanosoma cruzi*. *Infect Immun.* 74, 2031-42 (2006).

Sartori, A.M., Lopes, M.H., Benvenuti, L.A., Caramelli, B., di Pietro, A., Nunes, E.V., Ramirez, L.P., Shikanai-Yasuda, M.A. Reactivation of Chagas' disease in a human immunodeficiency virus-infected patient leading to severe heart disease with

a late positive direct microscopic examination of the blood. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 59, 784-786 (1998a).

Sartori, A.M., Shikanai-Yasuda, M.A., Amato Neto, V. & Lopes, M.H. Follow-up of 18 patients with human immunodeficiency virus infection and chronic Chagas' disease, with reactivation of Chagas' disease causing cardiac disease in three patients. *Clin Infect Dis* 26, 177-179 (1998b).

Sato, M.N., Yamashiro-Kanashiro, E.H., Tanji, M.M., Kaneno, R., Higuchi, M.L., Duarte, A.J. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Infect Immun.* 60, 1024-30 (1992).

Shoda, L.K., Kegerreis, K.A., Suarez, C.E., Mwangi, W., Knowles, D.P., Brown, W.C. Immunostimulatory CpG-modified plasmid DNA enhances IL-12, TNF-alpha, and NO production by bovine macrophages. *J Leukoc Biol.* 70, 103-12 (2001).

Silva, J.S., Twardzik, D.R. & Reed, S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor beta (TGF-beta). *The Journal of experimental medicine* 174, 539-545 (1991).

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, 627-634 (2005).

Silverio, J.C., Pereira, I.R., Cipitelli, M.C., Vinagre, N.F., Rodrigues, M.M., Gazzinelli, R.T., Lannes-Vieira, J. CD8(+) T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS pathogens* 8, e1002645 (2012).

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, 703-709 (2001).

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*. Dissertação em Ciências Biológicas (Imunobiologia de Protozoários – Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas, Universidade Federal de Ouro Preto (2010).

Souza, S.M., Vieira, P.M., Roatt, B.M., Reis, L.E., Fonseca K.S., Nogueira, N.C., Reis, A.B., Tafuri, W.L., Carneiro, C.M. Dogs infected with the blood trypomastigote form of *Trypanosoma cruzi* display an increase expression of cytokines and chemokines plus an intense cardiac parasitism during acute infection. *Mol Immunol.* 58, 92-7 (2014).

Strasen, J., Williams, T., Ertl, G., Zoller, T., Stich, A., Ritter, O. Epidemiology of Chagas disease in Europe: many calculations, little knowledge. *Clin Res Cardiol.* 103, 1-10 (2014).

Stuart, K., Brun, R., Croft, S., Fairlamb, A., Gürtler, R.E., McKerrow, J., Reed, S., Tarleton, R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *The Journal of clinical investigation* 118, 1301-1310 (2008).

Sun J, Tarleton R.L. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg.* 48, 161-9 (1993).

Tafuri, W.L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. Light and electron microscope studies. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 19, 405-417 (1970). Tafuri, W.L. Pathogenesis of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo* 29, 194-199 (1987).

Talvani, A., Rocha, M.O., Ribeiro, A.L., Correa-Oliveira, R. & Teixeira, M.M. Chemokine receptor expression on the surface of peripheral blood mononuclear cells in Chagas disease. *The Journal of infectious diseases* 189, 214-220 (2004).

Tarleton, R.L. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Research in immunology* 142, 130-133 (1991).

Tarleton, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *International journal for parasitology* 31, 550-554 (2001).

Tarleton, R.L., Sun, J., Zhang, L. & Postan, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infection and immunity* 62, 1820-1829 (1994).

Tarleton, R.L. & Zhang, L. Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence. *Parasitology today (Personal ed)* 15, 94-99 (1999).

Teixeira, V.P., Hial, V., Gomes, R.A., Castro, E.C., Reis, M.G., Rodrigues M.L., Guimaraes, J.V., Dos Reis, M.A. Correlation between adrenal central vein parasitism and heart fibrosis in chronic chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg.* 56, 177-80 (1997).

Tzelepis, F., Alencar, B.C., Penido, M.L., Gazzinelli, R.T., Persechini, P.M., Rodrigues, M.M. Distinct kinetics of effector CD8+ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infect Immun.* 74, 2477-81 (2006).

Thewissen, M., Somers, V., Hellings, N., Fraussen, J., Damoiseaux, J., Stinissen, P. CD4+CD28null T cells in autoimmune disease: pathogenic features and decreased susceptibility to immunoregulation. *J Immunol.* 179, 6514-23 (2007).

Tiede, I., Fritz, G., Strand, S., Poppe, D., Dvorsky, R., Strand, D., Lehr, H.A., Wirtz, S., Becker, C., Atreya, R., Mudter, J., Hildner, K., Bartsch, B., Holtmann, M., Blumberg, R., Walczak, H., Iven, H., Galle, P.R., Ahmadian, M.R., Neurath, M.F.

CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. *J Clin Invest.* 111, 1133-45 (2003).

Tostes Junior, S., Lopes, E.R., Pereira, F.E.L. e Chapadeiro, E. Miocardite chagásica crônica humana: estudo quantitativo dos linfócitos T CD4+ e dos CD8+ no exsudato inflamatório. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical.* v. 27, p. 127-134 (1994).

Todorov, A.G., Einicker-Lamas, M., de Castro, S.L., Oliveira, M.M. & Guilherme, A. Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *The Journal of biological chemistry.* 275, 32182-32186 (2000).

Vago, A.R., Macedo, A.M., Adad, S.J., Reis, D.D. & Correa-Oliveira, R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet.* 348, 891-892 (1996).

Vago, A.R., Macedo, A.M., Oliveira, R.P., Andrade, L.O., Chiari, E., Galvão, L.M., Reis, D., Pereira, M.E., Simpson, A.J., Tostes, S., Pena, S.D. Kinetoplast DNA signatures of *Trypanosoma cruzi* strains obtained directly from infected tissues. *The American journal of pathology.* 149, 2153-2159 (1996).

Valente, S.A., da Costa Valente, V., das Neves Pinto, A.Y., de Jesus Barbosa César, M., dos Santos, M.P., Miranda, C.O., Cuervo, P., Fernandes, O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.* 103, 291-297 (2009).

Veloso, V.M., Guedes, P.M., Andrade, I.M., Caldas, I.S., Martins, H.R., Carneiro, C.M., Machado-Coelho, G.L., de Lana, M., Galvão, L.M., Bahia, M.T., Chiari, E. *Trypanosoma cruzi*: blood parasitism kinetics and their correlation with heart parasitism intensity during long-term infection of Beagle dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz.* 103, 528-534 (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, 5177-5182 (1994).

Vieira, P.M., Francisco, A.F., Souza, S.M., Malaquias, L.C., Reis, A.B., Giunchetti, R.C., Veloso, V.M, de Lana, M., Tafuri, W.L., Carneiro, C.M. *Trypanosoma cruzi*: Serum levels of nitric oxide and expression of inducible nitric oxide synthase in myocardium and spleen of dogs in the acute stage of infection with metacyclic or blood trypomastigotes. *Experimental parasitology* 121, 76-82 (2009).

Vieira, P.M, Francisco, A.F, Machado, E.M, Nogueira, N.C, Fonseca, K.S, Reis, A.B, Teixeira-Carvalho, A, Martins-Filho, O.A, Tafuri, W.L, Carneiro, C.M. Different infective forms trigger distinct immune response in experimental Chagas disease. *PLoS One*. 7, e32912 (2012).

Visse, E., Inostroza, J., Cabello, G. & Parra, E. The MAP kinases are differently utilized by CD28 and CD2 adhesion pathways in superantigen-activated Jurkat T cells. *Biological research* 36, 263-278 (2003).

Wallace, J.A, Miller, L, Beavis, A, Baptista, C.A. Chagas disease: a proposal for testing policy for solid-organ transplant in the United States. *Prog Transplant*. 23, 272-7 (2013).

World Health Organization (WHO), "Chagas disease."
(<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>) (acessado em 2013).

Yoshida, N., Favoreto, S., Jr., Ferreira, A.T. & Manque, P.M. Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Brazilian journal of medical and biological research = Revista brasileira de pesquisas medicas e biologicas / Sociedade Brasileira de Biofisica [et al]* 33, 269-278 (2000).

Yoshida, N. Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc.* 78, 87-111 (2006).

Younès-Chennoufi, A.B., Said, G., Eisen, H., Durand, A., Hontebeyrie-Joskowicz, M. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4+). *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 82, 84-9 (1988).

Ziegler, C., Goldmann, O., Hobeika, E., Geffers, R., Peters, G., Medina, E. The dynamics of T cells during persistent *Staphylococcus aureus* infection: from antigen-reactivity to in vivo anergy. *EMBO Mol Med.* 3, 652-66 (2011).