

Sheler Martins Souza

**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***

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto – 2010

Sheler Martins Souza

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

Orientadora: Prof^ª Cláudia Martins Carneiro

Universidade Federal de Ouro Preto

Ouro Preto – 2010

Dedico este trabalho ao meu filho Gabriel, fonte de luz, força e superação. Aos meus pais Jardir Feliciano de Souza e Marilza Martins Fonseca de Souza, por doar suas vidas em prol da família e da educação.

À professora Cláudia, a oportunidade, confiança e acima de tudo a amizade. Durante os sete anos trabalhando juntos, me surpreendo a cada dia com sua competência e desenvoltura,

A Maria Chaves, os ensinamentos técnicos histopatológicos e pela amizade,

Ao professor Wanderson, as suas críticas e sugestões foram fundamentais para a realização deste trabalho,

À Paula, cuja parceria foi de extrema importância desde o início desta dissertação,

Ao professores, Alexandre e Rodolfo sempre dispostos a esclarecer as dúvidas,

À Dr^a. Andréa Teixeira de Carvalho, a orientação e oportunidade,

Ao professor Marcelo Vidigal Caliari, os ensinamentos morfométricos,

Ao Dr. Paulo Guedes e a Professora Vanja Veloso, a oportunidade de trabalhar ao lado de vocês durante a iniciação científica,

Aos amigos (as) do Laboratório de Imunopatologia, aqueles que passaram e aqueles presentes, o meu muito obrigado pelos momentos de aprendizado e de descontração, é muito bom trabalhar com uma equipe de qualidade como vocês,

Às professoras Maria Terezinha Bahia e Marta de Lana, o aprendizado,

À UFOP/NUPEB, o ensino de excelência,

À Cida, sempre prestativa e disposta a nos ajudar,

Ao grande amigo Marcus Vinicius da Silva, presente em todos os momentos,

À minha irmã Shiara, sempre presente,

Aos meus pais; Jardir e Marilza o apoio incondicional a minha opção, por caminharem sempre a meu lado e ao exemplo de vida.

Ao Gabriel, fonte de luz, força e superação,

"A ignorância afirma ou nega veementemente. A ciência duvida." (*Voltaire*)

Nosso grupo vem estudando a infecção experimental de cães pelo *Trypanosoma cruzi* ao longo dos últimos 30 anos. Semelhante ao observado em humanos, no modelo canino verifica-se um infiltrado inflamatório predominantemente constituído por células mononucleares durante a fase aguda da doença. A identificação destas células é uma estratégia importante para a compreensão dos mecanismos imunopatológicos desencadeados pelo parasito ao longo da infecção. Neste contexto, fez-se necessário a padronização de reações imuno-histoquímicas para caracterização do fenótipo das principais células presentes no infiltrado inflamatório (linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, macrófagos CD14⁺ e neutrófilos). As células envolvidas na infecção experimental aguda de cães por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *T. cruzi* foram quantificadas por análise morfométrica, no parênquima e no foco inflamatório, tanto no átrio direito quanto no septo interventricular. Observou-se que em ambos os fragmentos cardíacos, o processo inflamatório foi maior no grupo infectado por formas tripomastigotas sanguíneas. A quantificação do fenótipo celular mostrou que os linfócitos T CD4⁺ são predominantes no foco inflamatório nos animais infectados por ambas as formas, tanto no átrio direito quanto no septo interventricular. No átrio direito, os linfócitos T CD8⁺ foram observados em maior quantidade nos grupos infectados em relação ao grupo controle. Já os macrófagos CD14⁺ prevalecem apenas no grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas em relação ao grupo controle. No septo intraventricular, os linfócitos T CD8⁺ e os macrófagos CD14⁺ encontram-se em elevado número no grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas em relação ao grupo controle e ao grupo infectado por formas tripomastigotas sanguíneas. Os neutrófilos estão presentes em menor número em relação às demais células analisadas, mas são encontrados em maior número no átrio direito de ambos os grupos infectados. O quadro histopatológico mais preservado observado no grupo infectado por formas tripomastigota metacíclico pode estar diretamente relacionado à interação entre os linfócitos T CD8⁺ e os macrófagos CD 14⁺, pois estas são potentes produtoras de interleucina-12, uma citocina que estimula a produção de interferon-gama pelos linfócitos T CD8⁺. Esta citocina é fundamental para o processo de resistência à infecção pelo *T. cruzi* durante a fase aguda por estimular a síntese de óxido nítrico pelos macrófagos. A quantificação celular realizada de modo aleatório evidenciou melhor as diferenças entre os grupos. Contudo, a quantificação focal do processo inflamatório distinguiu melhor as porcentagens das populações e subpopulações celulares. Os resultados obtidos mostraram que as formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas, apresentam perfil celular distinto no átrio direito e no septo intraventricular, sendo a resposta elaborada durante a infecção com as formas tripomastigotas metacíclicas mais eficiente e menos lesiva ao hospedeiro.

In the last 30 years our group has been studying experimental infection of dogs with *Trypanosoma cruzi*. Similarly to the observed in humans, dogs present an inflammatory infiltrate predominantly mononuclear during the acute phase of infection. The identification of these cells is an important strategy for to understand the immunopathological mechanisms triggered by the parasite during infection. In this context, it was necessary to standardize the immunohistochemical reactions to characterize the phenotype of the main cells in the inflammatory infiltrate ($CD4^+$ and $CD8^+$, $CD14^+$ cells/macrophages and neutrophils). Therefore, the cells involved in acute experimental infection of dogs by metacyclic or blood trypomastigotes of Berenice-78 *T. cruzi* were quantified by morphometric analysis in the parenchyma and inflammatory foci in both, right atrium and interventricular septum. It was observed that in both heart fragments the inflammatory process was higher in the group infected with blood trypomastigotes forms. Quantification of cell phenotype showed that $CD4^+$ T lymphocytes are predominant in the inflammatory foci in animals infected with both forms and both tissue sections. On the right atrium the $CD8^+$ T lymphocytes were more present in the infected groups in comparison to the control group. However, $CD14^+$ /macrophages cells were prevalent only in animals infected with metacyclic trypomastigotes when compared to the control group. In the interventricular septum the $CD8^+$ T lymphocytes and the $CD14^+$ /macrophage cells were found in large numbers in the group infected with metacyclic trypomastigotes when compared to control and the group infected with blood trypomastigotes. Neutrophils are present in less number if compared to the other cells analyzed, but were found in greater numbers in the right atrium of both infected groups. The better preserved histopathological picture observed in the animals infected with metacyclic trypomastigote may be directly related to the interaction between $CD8^+$ T lymphocytes and $CD14^+$ /macrophages because they are potent producers of interleukin-12, a cytokine that stimulates the production of interferon-gamma by $CD8^+$ T lymphocytes. This cytokine is crucial in the process of infection resistance by *T. cruzi* during the acute phase via stimulation of nitric oxide synthesis by the macrophages. Cellular quantification randomly performed better showed differences between the groups studied. However, the quantification of focal inflammation distinguished better the percentages of cell populations and subpopulations. The results showed that the infective forms, blood or metacyclic trypomastigotes, have distinct cellular profile in the right atrium and interventricular septum. Moreover the immunological response produced during infection with metacyclic trypomastigotes was more efficient and less harmful for the host.

LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS	X
LISTA DE ABREVIATURAS	XI
LISTA DE SÍMBOLOS.....	XIII
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 - A DOENÇA DE CHAGAS	2
1.2 - IMUNOLOGIA E IMUNOPATOLOGIA DA INFECÇÃO PELO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	4
1.3 - A INTERAÇÃO <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> – CÉLULA HOSPEDEIRA	7
1.4 - IMUNO-HISTOQUÍMICA	9
1.5 - O MODELO CANINO NO ESTUDO DA DOENÇA DE CHAGAS.....	11
1.6 - JUSTIFICATIVA	12
2. OBJETIVOS	14
2.1 - OBJETIVO GERAL	15
2.2 - OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	15
3. MATERIAIS E MÉTODOS	16
3.1 - ATIVIDADES PREVIAMENTE REALIZADAS	18
3.1.1 - Animais, infecção e avaliação <i>in vivo</i>	18
3.1.2 - Necropsia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica.....	19
3.2 - ATIVIDADES REALIZADAS NESTE ESTUDO	19
3.2.1 - Coloração pela Hematoxilina Eosina.....	19
3.2.2 - Imuno-histoquímica para detecção de linfócitos T ($CD4^+$, $CD8^+$), macrófagos $CD14^+$ e neutrófilos	20
3.2.3 - Quantificação morfométrica do processo inflamatório cardíaco na infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i>	26
3.2.4 - Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios.....	26
3.3 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	28
4. RESULTADO	29
4.1 - AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO	30
4.1.1 - Análise histopatológica de cortes corados pela Hematoxilina e Eosina	30
4.1.2 - Análise histopatológica de cortes submetidos a reações de imuno-histoquímica.....	32
4.1.3 - Análise morfométrica realizada de forma aleatória	34
4.1.3.1 - Quantificação dos núcleos celulares.....	34
4.1.3.2 - Quantificação de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), macrófagos $CD14^+$ e neutrófilos.....	35
4.1.3.3 - Razão dos linfócitos $TCD4^+/CD8^+$	37
4.1.3.4 - Porcentagem de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), macrófagos $CD14^+$ e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas.....	37
4.1.5 - Análise morfométrica realizada no foco inflamatório	40
4.1.5.1 - Quantificação de núcleos celulares	40
4.1.5.2 - Quantificação das células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), macrófagos $CD14^+$ e neutrófilos.....	41
4.1.5.3 - Razão dos linfócitos $TCD4^+/CD8^+$	43
4.1.5.4 - Porcentagem de células T ($CD4^+$ e $CD8^+$), macrófagos $CD14^+$ e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas.....	43
4.1.6 - Estimativa de células marcadas por imuno-histoquímica considerando a captura realizada de forma aleatória em relação ao número total de núcleos nos cortes corados pela Hematoxilina e Eosina.....	46
4.1.7 - Estimativa de células marcadas por imuno-histoquímica considerando a captura realizada no foco em relação ao número total de núcleos nos cortes corados pela Hematoxilina e Eosina... ..	49
5. DISCUSSÃO	52
6. CONCLUSÕES.....	61
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	63

Lista de Figuras

- Figura 1 - Fotomicrografias submetidos a reações imuno-histoquímicas (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos), de cortes histológicos do linfonodo de cães controle. 23
- Figura 2 - Fotomicrografias de cortes histológicos do septo interventricular, submetidos a reações imuno-histoquímicas (CD4⁺, CD8⁺, macrófagos CD14⁺ e Neutrófilos), de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda.. 25
- Figura 4 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados pela Hematoxilina Eosina do átrio direito e septo interventricular de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda, em comparação a cães controle 31
- Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos, submetidos a reações imuno-histoquímicas (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos), do átrio direito ou do septo interventricular de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda..... 33
- Figura 6 – Análise morfométrica do infiltrado inflamatório realizada de forma aleatória em cortes histológicos corados pela Hematoxilina Eosina do átrio direito ou do septo interventricular de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda, em comparação a cães controle, eutanasiados com a mesma faixa etária..... 34
- Figura 7 - Análise morfométrica das células do infiltrado inflamatório (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos) realizada de forma aleatória em cortes histológicos do átrio direito ou do septo interventricular de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda, em comparação a cães controle eutanasiados com a mesma faixa etária. 36
- Figura 8 - Análise morfométrica do infiltrado inflamatório realizada no foco inflamatório em cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina do átrio direito ou do septo interventricular de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda..... 40
- Figura 9 - Análise morfométrica das células do infiltrado inflamatório (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos) realizada nos focos inflamatórios em cortes histológicos do átrio direito ou do septo interventricular de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou tripomastigotas sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda.. 42

Figura 10 - 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.. 57

Lista de Tabelas

- Tabela 1 – Razão entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quantificados de forma aleatória no átrio direito e septo interventricular de cães pertencentes aos grupos controle e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas 37
- Tabela 2 - Porcentagem de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas no átrio direito e septo interventricular dos animais pertencentes aos grupos controle e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas, da cepa Be-78 do *T. cruzi*. 39
- Tabela 3 – Razão entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quantificados no foco inflamatório no átrio direito e septo interventricular de cães pertencentes aos grupos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas, da cepa Be-78 do *T. cruzi*. 43
- Tabela 4 – Porcentagem de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas no átrio direito e septo interventricular dos animais pertencentes aos grupos controle e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas. 45
- Tabela 5 - Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios, estimativa celular e estimativa de células inflamatórias não marcadas no AD e SI de animais pertencentes aos grupos controle, infectado por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas realizada a partir do somatório de núcleos celulares (Hematoxilina e Eosina) e de células marcadas (imuno-histoquímica) quantificados em 15 imagens capturadas de forma aleatória. 48
- Tabela 6 - Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios, estimativa celular e estimativa de células inflamatórias não marcadas no AD e SI de animais pertencentes aos grupos controle, infectado por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas realizada a partir do somatório de núcleos celulares (Hematoxilina e Eosina) e de células marcadas (imuno-histoquímica) quantificados em 15 imagens capturadas do foco inflamatório..... 51

Lista de Abreviaturas

ACms	Anticorpos monoclonais
AD	Átrio Direito
Akt	Serina/treonina kinase
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclico
APC	Células apresentadoras de antígenos profissionais
Be-78	Berenice-78
BZ	Benzonidazol
C	Controle
CD14 ⁺	Marcador de superfície celular de leucócitos
CD4 ⁺	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T auxiliares
CD8 ⁺ citotóxicos	Marcador de superfície celular da subpopulação de linfócitos T
CI	Estimativa de células observadas nos grupos infectados
CINM	Estimativa de células inflamatórias não marcadas
CM	Células marcadas por imuno-histoquímica
CSA	Sistema catalisador de sinal
DAB	Diaminobenzidine
DAÍ	Dia após infecção
DC	Doença de Chagas
EUA	Estados Unidos da América
gp	Glicoproteínas
HE	Hematoxilina e Eosina
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
Ig	Imunoglobulinas
IHQ	Imuno-histoquímica
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina-12
IL-4	Interleucina 4
iNOS	Enzima induzível do óxido nítrico sintase
IP ₃	Inositol-1,4,5-trifosfato
KO	Nocaute
LVC	Leishmaniose Visceral Canina
MEC	Matriz extracelular
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MSP	Monócitos no sangue periférico
NC	Núcleos celulares
NCNI	Núcleos celulares não inflamatórios
NK	Natural killer
NO	Óxido nítrico
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
PCL	Fosfolipase
PI-3K	Phosfatidilinositol – 3 Kinase
PIP ₃	Fosfatidilinositol -3,4,5- fosfato

POP	Oligopeptidase
SI	Septo interventricular
TBS-T	<i>Tris-Buffered Saline Tween-20</i>
TGF- β	Fator de crescimento tumoral beta
TLR	Receptores "Toll Like"
TM	Tripomastigotas metacíclicas
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TS	Tripomastigotas sang

Lista de Símbolos

%	Porcentagem
µm	Micrômetros
µm ²	Micrômetros quadrados
Ca ²⁺	Cálcio
H	Hidrogênio
Kg	Quilograma
mL	Mililitros
°C	Graus Célsius
pH	Potencial de hidrogênionico
µl	Microlítros

1. Introdução

1.1 - A doença de Chagas

A tripanossomíase americana, enfermidade causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é popularmente conhecida como doença de Chagas (DC) (Chagas, 1909). Esta protozoonose possui ampla distribuição geográfica nas Américas, atingindo a população desde o sul dos Estados Unidos da América (EUA) até ao sul da América do Sul (Noireau *et al.*, 2009).

A principal forma de transmissão da DC é a vetorial, através dos insetos hematófagos dos gêneros *Panstrongylus*, *Triatoma* e *Rhodnius*. Nestes, são encontrados diversas formas do parasito, desde as arredondadas denominadas epimastigotas responsáveis pela multiplicação do parasito no inseto vetor, até as formas infectantes, designadas tripomastigotas metacíclicas, encontradas na porção final do tubo digestivo. Ao realizar o repasto sanguíneo, no hospedeiro vertebrado, esses insetos defecam nas proximidades liberando o parasito junto às fezes e/ou urina. Dessa forma, os parasitos liberados podem entrar em contato com as células do hospedeiro vertebrado, a partir do tecido lesado ou das mucosas e iniciar a infecção. (Brenner, 1973).

Durante a década passada, implantaram-se medidas de controle vetorial em muitas áreas endêmicas, reduzindo consideravelmente a transmissão vetorial e, conseqüentemente, a incidência da DC na América Latina. Em 1990, estudos epidemiológicos estimavam a existência de 16-18 milhões de indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, já em 2006 essa estimativa caiu para nove milhões (Noireau *et al.*, 2009), podendo variar entre oito e 11 milhões (CDC, 2009).

O segundo mecanismo de maior prevalência de transmissão da DC consiste na forma transfusional, com grande relevância em países da Europa (Riera *et al.*, 2006) e nos EUA (Gascon *et al.*, 2007). Este fato está diretamente associado ao fluxo de imigrantes latino-americanos infectados pelo *T. cruzi* e à falta de exames clínicos para a detecção da DC em bancos de sangue nestes países (CDC, 2007). Também podem ocorrer 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 em laboratórios e a transmissão congênita (Prata, 2001).

A DC caracteriza-se por apresentar duas fases distintas no curso da infecção: fase aguda e fase crônica. A fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* pode apresentar-se assintomática ou sintomática com quadro clínico comum a outras infecções, dificultando o diagnóstico precoce da doença. A presença de miocardite, alterações eletrocardiográficas, linfadenopatia e hepatoesplenomegalia também podem ser observadas, além de meningoencefalite, que, quando aguda pode levar a morte na maioria dos casos devido às lesões cerebrais. Este período da infecção dura cerca de dois a três meses (Pitella, 1993; Parada *et al.*, 1997; Morato *et al.*, 1998; Higuchi *et al.*, 2003; Almeida *et al.*, 2009).

Durante a fase aguda da infecção podem ser observadas lesões, que estão diretamente relacionadas à cepa, inóculo, re-infecções e presença do parasito, bem como ao *status* nutricional e imunológico do hospedeiro (Higuchi, 1995).

Após esta fase, o indivíduo evolui para a fase crônica indeterminada da DC, onde desaparecem os sintomas de fase aguda e os exames clínicos apresentam-se normais. Porém, cerca de 20-30% dos indivíduos nesta fase da infecção, após 10 a 30 anos, podem apresentar sintomas cardiovasculares (Puigbó *et al.*, 1993; Guimarães, 1997) e os chamados megas, megacólon e/ou megaesôfago (Moncayo, 2003). Estes, provavelmente provenientes de danos nos neurônios que contribuem para a denervação dos plexos entéricos (Köberle, 1957; Tafuri *et al.*, 1970; Coura *et al.*, 1983; Silveira *et al.*, 2005).

Os mecanismos de defesa do hospedeiro convergem para um processo inflamatório, constituído predominantemente por células mononucleares, principalmente no tecido cardíaco, provocando quadros degenerativos das fibras cardíacas que podem progredir para morte tecidual e, conseqüentemente, fibrose (Parada, 1997; Andrade *et al.*, 2000; Caliari *et al.*, 2002; Higuchi *et al.*, 2003; Machado *et al.*, 2005). Diferentes estudos demonstraram predomínio de linfócitos T CD8⁺ em relação aos linfócitos T CD4⁺ na miocardite chagásica crônica (Higuchi *et al.*, 1993; Tostes Junior *et al.*, 1994; Reis *et al.*, 2000). Portanto, a presença dos linfócitos T CD8⁺ no tecido cardíaco pode estar associada à lesão tecidual, devido à ação imunopatogênica dos linfócitos T CD8⁺ contra as células do hospedeiro, podendo assim causar citólise com destruição da miofibra cardíaca (Cuña e Cuña, 1995). Entretanto, os linfócitos T

CD8⁺ podem ter papel protetor, principalmente durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton, 1991, 1994; Dutra *et al.*, 1997; Brener e Gazzinelli, 1997).

1.2 - Imunologia e imunopatologia da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Após um século da descoberta da DC, ainda persistem várias dúvidas a respeito dos aspectos imunopatológicos e mecanismos envolvidos na gênese e perpetuação da miocardite chagásica. Durante as últimas décadas, questionamentos sobre a participação do parasito e seus antígenos neste processo foram negligenciados devido à hipótese de que os mecanismos autoimunes seriam os principais responsáveis pela miocardite chagásica crônica (Pirmez e Ribeiro dos Santos, 1994; Cunha Neto, 1996). Entretanto, alguns trabalhos têm evidenciado que a presença dos linfócitos T CD8⁺ está correlacionada à persistência do parasito e seus antígenos, sugerindo a influência direta do parasito no desenvolvimento da miocardite em pacientes chagásicos crônicos. Durante a década passada, estudos por imuno-histoquímica (IHQ) mostraram a presença do *T. cruzi* como fator determinante na gênese das lesões cardíacas no tecido muscular (Higuchi *et al.*, 1993, 1997; Tarleton *et al.*, 1999).

A presença do *T. cruzi* coloca o sistema imunológico do hospedeiro vertebrado em uma complexa mistura de antígenos do parasito que estimula a resposta imune celular e humoral. Além disso, a presença de linfócitos e macrófagos nos infiltrados inflamatórios pode estar diretamente relacionada à produção de citocinas que induziriam a destruição tecidual com a posterior indução de fatores de crescimento que ativam a formação de tecido fibroso cicatricial (Reis *et al.*, 1997; Waghbi *et al.*, 2002; Guedes *et al.*, 2007; 2009).

Ao fagocitar o *T. cruzi*, as células apresentadoras de antígenos profissionais (APCs) iniciam o processo de produção e liberação das citocinas e quimiocinas, auxiliando o processo de recrutamento, rolagem e adesão dos leucócitos nos capilares sanguíneos adjacentes a infecção e a consequente migração dos leucócitos. Além disso, as citocinas podem atuar como o segundo sinal no processo de ativação de linfócitos pelas APCs, que apresentam antígenos, via complexo principal de histocompatibilidade (MHC) de classe II para as células T CD4⁺ e via MHC de classe I para as células T

CD8⁺, sendo este processo essencial para o controle da infecção. Dessa forma, inicia-se a resposta imune adquirida contra o parasito, com produção de citocinas e amplificação da resposta imune inata no intuito de combater o parasito (Tarleton *et al.*, 1996).

Dentre os componentes da resposta imune inata, os monócitos/macrófagos, atuam como importante “elo” entre a resposta imune inata e adquirida, sendo uma importante célula no controle da infecção. Melo (2009), relata que em ratos infectados pelo *T. cruzi*, o aumento no número de monócitos no sangue periférico (MSP) a partir do primeiro dia após infecção (DAI), atingindo valores máximos no 12º DAI, sendo que no 20º DAI inicia-se o processo de declínio dos MSP. Já os números de eosinófilos e neutrófilos, não são diferentes do grupo controle.

Evidências *in vivo* e *in vitro*, demonstraram que na infecção chagásica humana e no modelo murino, as células da linhagem mononuclear são precursoras de citocinas pró-inflamatórias, como a interleucina-12 (IL-12), o interferon gama (IFN- γ) e o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), além da produção de intermediários reativos do nitrogênio, como o óxido nítrico (NO), que são importantes para o controle da parasitemia e do parasitismo. A produção de IL-12 pelos macrófagos estimula as células natural killer (NK) e linfócitos T a sintetizarem IFN- γ , que por sua vez, ativa os macrófagos promovendo uma interação entre a resposta imune inata e adquirida (Ropert *et al.*, 2002), ponto crucial no mecanismo de defesa contra o *T. cruzi*. Esta habilidade da resposta imune adquirida, de atuar sobre a resposta imune inata, é de suma importância no processo imunológico (Vitelli-Avelar *et al.*, 2006), visto que os macrófagos além de produzirem a IL-12 (Aliberti *et al.*, 1996), também têm a capacidade de responder a esta citocina, ação autócrina, sendo também conferida a esta célula a produção do IFN- γ (Bastos *et al.*, 2004).

Os linfócitos T CD4⁺ atuam na produção do TNF- α , importante para o processo de recrutamento de leucócitos, liberam também o IFN- γ fundamental na ativação de macrófagos e a IL-2 atuante na proliferação dos linfócitos T CD8⁺. Esta expansão parece ser de grande importância para o controle da infecção pelo *T. cruzi*, como mostrado em camundongos nocaute (KO) para linfócitos T CD4⁺ e para linfócitos T CD8⁺, sendo estes animais altamente susceptíveis a infecção (Ferraz *et al.*, 2009). Portanto, os linfócitos T CD8⁺, predominantes no infiltrado inflamatório (Higuchi *et al.*, 1993), poderiam atuar na eliminação da célula infectada, ativando mecanismos

apoptóticos pela via granzima/perforina (Muller, *et al.*, 2003). Além disso, a produção de IFN- γ estimula a transdução de sinal nos macrófagos, culminando na ativação de enzimas, como a enzima induzível do óxido nítrico sintase (iNOS) com posterior produção do NO, que pode controlar o parasitismo na 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).

Por muito tempo acreditou-se que a resposta imunológica tipo Th1, desencadeada frente à infecção pelo *T. cruzi*, levava ao controle da infecção e consequente eliminação do parasito (Hoft *et al.*, 2000; Ferraz *et al.*, 2009). Entretanto, recentemente tem-se mostrado que alguns componentes da resposta imune tipo Th2, como a IL-10 na fase aguda e a IL-4 na fase crônica, atuam de maneira sinérgica e benéfica no controle do processo inflamatório podendo reduzir o dano tecidual (O'Garra, 1998; Sales-Junior *et al.*, 2008; Guedes *et al.*, 2009).

De fato, a intensidade do processo inflamatório, na maioria das vezes oriundo de uma expansão policlonal dos linfócitos, não está diretamente relacionada ao controle do parasitismo (Minoprio *et al.*, 1989, 2001). O controle do parasitismo está diretamente relacionado a uma resposta imune voltada ao *T. cruzi*, por meio da presença dos linfócitos T e sua interação com a resposta imune inata, principalmente com os macrófagos e células NK (Cardillo *et al.*, 1996; Lieke *et al.*, 2004; 2006).

Durante a fase aguda da infecção de cães pelas formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou tripomastigotas sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 (Be-78) do *T. cruzi*, ocorre um predomínio dos linfócitos T CD8⁺ no sangue periférico no grupo TM em relação ao grupo TS e grupo controle (Carneiro *et al.*, 2007). Além disso, análises das diferentes regiões cardíacas verificaram maior expressão da enzima iNOS e maior produção de NO sérico neste mesmo grupo, quando comparado aos animais não infectados e infectados por formas TS. O aumento dos níveis de NO no grupo TM pode ser um dos fatores determinantes do menor parasitismo observado neste grupo. Por outro lado, no grupo TS houve um maior processo inflamatório cardíaco em relação ao TM (Abreu-Vieira *et al.*, 2009).

1.3 - A interação *Trypanosoma cruzi* – célula hospedeira

No curso da infecção pelo *T. cruzi*, a relação parasito-hospedeiro sofre modificações e adaptações que ora favorecem o hospedeiro, ora o parasito. O *T. cruzi*, apresenta características multifacetadas, colocando-o como protozoário que instiga e desafia a comunidade científica com as suas diversas cepas (Brenner e Chiari, 1963) e clones (Tibayrenc, 2003). Em seu ciclo biológico, este protozoário exibe um pleomorfismo em suas formas evolutivas, as quais se encontram adaptadas aos seus respectivos microambientes.

As formas TM e TS do *T. cruzi* apresentam características distintas. Em relação ao processo de infecção, a primeira é mais eficiente em penetrar a mucosa oral de camundongos (Hoff, 1996) e de cães (Bahia *et al.*, 2002).

O *T. cruzi* é capaz de penetrar em praticamente todas as células nucleadas dos mamíferos, e para isso, este protozoário apresenta uma gama de moléculas em sua membrana, aptas a interagir e se ligar à matriz extracelular (MEC) e a membrana da célula hospedeira. A interação deste parasito com a MEC inclui moléculas de superfície do parasito, como as glicoproteínas (Magdesian *et al.*, 2001; Yoshida, 2006). A enzima Fosfatidilinositol – 3 Kinase (PI-3K) regula o processo de transporte através das membranas, fusão lisossomal e reorganização do citoesqueleto (Downward, 2004) modulando a invasão celular associada aos microfilamentos de actina (Wilkowsky, 2001; Woolsey *et al.*, 2003).

De acordo com Andrews (1995) a elevação dos níveis intracelulares de cálcio, na célula hospedeira, promove o recrutamento de lisossomos para o sítio de entrada do parasito seguido por sua fusão com a membrana e formação do vacúolo parasitóforo. Entretanto, Burleigh (2005) em sua revisão, relata que o processo de interação e penetração do *T. cruzi* em células não fagocíticas tem uma contribuição pequena na rota dependente dos lisossomos. O processo de internalização do *T. cruzi* pode ocorrer de duas formas; sendo a primeira via lisossomo dependente, responsável por cerca de 20% da penetração deste parasito na célula hospedeira, e a segunda via PI-3K, que representa cerca de 70% do processo de penetração, ou via endossomo que representa 20% deste processo (Todorov *et al.*, 2000; Wilkowsky *et al.*, 2001; Woolsey *et al.*, 2003). As

trans-sialidasas transferem resíduos de ácido siálico, ligados a glicoproteínas e a glicolipídios, presentes na superfície da célula do hospedeiro, para a superfície do *T. cruzi*, fato importante para início do processo de adesão e para formação de vacúolos parasitóforos (Schenkman e Mortara, 1992).

As populações TM do *T. cruzi* que apresentam elevada 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, conseqüentemente, a geração de fosfatidilinositol -3,4,5- fosfato (PIP₃). Estes eventos culminam na mobilização de Ca²⁺ dos seus estoques intracelulares, provavelmente do retículo endoplasmático/endossomo, tendo um papel chave no processo de recrutamento de lisossomos e fusão na membrana celular. Além disso, gp82 induz o desagrupamento da actina auxiliando o processo de internalização muito 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 evolutivas TM, com menor capacidade de infecção, usam preferencialmente as glicoproteínas de superfície gp90 e gp35/50, ocorrendo à 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 gp 35/50, aciona 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 acidocalsiosomas, contendo um sistema de troca iônica Ca²⁺/H⁺ (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).

Estudos referentes ao processo de interação das formas TS do *T. cruzi* com as células hospedeiras, mostraram que estas possuem moléculas em suas superfícies como glicoproteínas da família das gp85, que contém sítios de ligação para a laminina e citoqueratina 18. A ação de enzimas, tais quais as serina proteinases oligopeptidasas (POP) Tc85 e Tc80 (80kDA) que hidrolisam componentes da MEC como o colágeno (tipo I e IV) e a fibronectina, auxiliando o processo de interação celular mediado

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 fator de crescimento tumoral beta (TGF-β), visto que experimentos avaliando a função do TGF-β no processo de invasão celular, utilizando células epiteliais de pulmão deficientes nos receptores para TGF-β, corroboram com a importância desta citocina, visto que o *T. cruzi* é incapaz de penetrar nessas células (Ming *et al.*, 1995).

A rota de sinalização e interação com as células do hospedeiro mediada principalmente pela oligopeptidase B, leva a mobilização de Ca²⁺ intracitoplasmático, mediado por IP₃, em fibroblastos e cardiomiócitos (Burleigh *et al.*, 1998). Outros estudos, também indicam que este grupo utiliza uma glicoproteína (70 – 200kDA), membro da família das trans-sialidases, que leva a mobilização de Ca²⁺ intracitoplasmático participando assim do processo de internalização do parasito. A gp85, uma molécula pertencente à família das trans-sialidases, possui ligantes para laminina e fibronectina e apresentam uma íntima relação com PI-3K, sendo que tratamentos que visam bloquear esta interação diminuem drasticamente o processo de penetração destas formas do *T. cruzi* na célula hospedeira (Todorov *et al.*, 2000; Yoshida, 2006).

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

1.4 - Imuno-histoquímica

A técnica de imuno-histoquímica (IHQ) é utilizada para a detecção de antígenos em cortes histológicos (fixados ou congelados), esfregaços e em suspensões celulares, pela ligação de anticorpos específicos ao seu determinante antigênico. Esta técnica permite a visualização *in situ*, através da marcação celular, da ligação antígeno anticorpo por microscopia óptica.

Em 1941, Conns *et al.*, descreveram a técnica de imunofluorescência para detectar antígenos celulares em secções de tecidos, dando início a técnica de IHQ.

Embora seja usado na pesquisa em patologia humana desde 1970, seu emprego na análise diagnóstica tem recentemente adquirido muito interesse, já estando estabelecida na rotina veterinária e nas doenças infecciosas e neoplásicas. (Tafari *et al.*, 2004; Stoica *et al.*, 2004; Neumann *et al.* 2006; Xavier *et al.*, 2006; Breaux *et al.*, 2007; Abreu-Vieira *et al.*, 2009). A maior dificuldade desta técnica na patologia veterinária tem sido a falta de anticorpos específicos para os tecidos animais. Diante disso, nas pesquisas referentes à marcação celular em modelo canino, frequentemente são utilizados anticorpos que apresentam reatividade com antígenos de humanos e de animais, principalmente de camundongos (Greenlee *et al.*, 1987; Aasted *et al.*, 1988; Ferrer *et al.*, 1992; Rossi *et al.*, 2000; Ramos-Vara, 2005).

O emprego de anticorpos monoclonais (ACms) na técnica de IHQ, permite a marcação de populações e subpopulações de leucócitos específicas. Portanto, muitos esforços têm visado à identificação de ACms específicos a antígenos de superfície de leucócitos caninos que permitam fenotipar as populações e subpopulações dessas células com a utilização da técnica de IHQ (Doveren *et al.*, 1985; Gebhard *et al.*, 1992; Moore *et al.*, 1992; Cobbold e Metcalfe, 1994; Voss *et al.*, 1994; Rabanal *et al.*, 1995; Gofflot *et al.*, 2008).

Entretanto, pouco êxito tem sido obtido, principalmente no que diz respeito a utilização de tecidos fixados em formol e processados rotineiramente. A maioria dos estudos utilizam tecidos congelados ou mesmo fixados em resina, devido à melhor preservação dos determinantes antigênicos presentes nas células, quando comparado ao tecido fixado em formalina, uma vez que este último método de fixação compromete a especificidade da ligação antígeno anticorpo (Williams *et al.*, 1999; Wunschmann *et al.*, 1999; Frost *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2001; Caliar *et al.*, 2002). No entanto, manter tecidos congelados a -70 °C requer custos e manutenção superiores àqueles tecidos fixados em formol. Dessa forma, o desenvolvimento de anticorpos que permitam a ligação a seu determinante antigênico em tecido canino fixado em formalina teria grande relevância.

Para tal, um avanço foi obtido com a produção de métodos para a recuperação antigênica e de sistemas de amplificação do sinal. Este tem como base a estreptavidina-biotina e a amplificação do sinal (CSA) que podem melhorar o resultado da reação IHQ pela utilização da proteína A. A realização de uma recuperação antigênica é necessária

uma vez que os cortes histológicos fixados em formol permitem a formação de ligações cruzadas entre os grupos aminos, além da formação de “pontes” de metileno entre os vários aminoácidos presentes nos peptídeos de uma determinada proteína e desta com as proteínas vizinhas, desta forma, podendo resultar em múltiplas ligações que bloqueiam o acesso do anticorpo ao seu determinante antigênico. O processamento rotineiro desses tecidos em histotécnico também pode comprometer a ligação antígeno anticorpo visto que o processamento pode atingir temperaturas em torno de 60 °C.

Estudos por IHQ na investigação imunopatológica no modelo cão, têm sido utilizados apesar dos entraves ocasionados pela falta de anticorpos específicos para este modelo. Caliari *et al.*, (2002) estudaram aspectos imunológicos da cardiomiopatia chagásica utilizando a técnica de IHQ em tecidos incluídos em metacrilato, para a quantificação leucocitária no tecido cardíaco de cães infectados pelo *T. cruzi*. Papadogiannakis *et al.*, (2005), conseguiram realizar a imunofenotipagem celular da dermatite esfoliativa em cães infectados por *Leishmania infantum*. Elwood *et al.*, (2007) realizaram um estudo qualitativo por IHQ das células T e MHC de classe II no intestino de cães. Paciello *et al.*, (2009), avaliaram a expressão do complexo de histocompatibilidade (MHC) I e II na miocardiopatia inflamatória canina associada a infecção por *L. infantum*. Porém, estes estudos utilizaram tecidos congelados. Assim sendo, a identificação de anticorpos específicos que permitam a realização da técnica de IHQ em tecidos de cães fixados em formol e incluídos em parafina é de fundamental importância, visto os diversos estudos já realizados por nosso grupo, tanto na infecção chagásica no modelo cão (Lana *et al.*, 1992; Guedes *et al.*, 2007, 2009) quanto para os estudos da Leishmaniose Visceral Canina (LVC), bem como em outras doenças caninas de interesse veterinário ou humano.

1.5 - O modelo canino no estudo da doença de Chagas

Um dos grandes problemas em elucidar os mecanismos patogênicos da DC, refere-se ao estabelecimento de um modelo que reproduza as alterações causadas nos seres humanos, durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Neste contexto, o modelo canino (*Canis familiaris*) tem demonstrado ser um bom modelo para o estudo da DC, 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; Guedes *et al.*, 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 aos 92 e 864 dias após a infecção. Dessa forma, o cão se evidenciou como excelente modelo para estudo da DC. Não obstante, Guedes *et al.*, (2002) demonstraram que o cão também apresenta resposta semelhante à humana frente ao tratamento com o benzonidazol (BZ).

Dessa forma, estes achados estimulam pesquisas nesse modelo, como forma de extrapolar e indicar proximidades entre a imunopatologia do cão com a humana, facilitando a interpretação de resultados e colaborando para prognósticos dentro da medicina, já que o cão se consolidou como um excelente modelo para estudo da infecção chagásica.

1.6 - Justificativa

A análise imunológica da infecção causada por formas TM e TS do *T. cruzi* é importante visto que a infecção por formas TM reflete a transmissão causada diretamente pelos triatomíneos enquanto a infecção por formas TS mimetiza o contágio transfusional, por acidentes de laboratório e congênito.

No final da década passada, Brener e Gazzinelli (1997), analisando a infecção com as duas formas, TM e TS, verificaram que ambas exibem características distintas em relação à resposta imune *in vitro* e *in vivo*. Carneiro *et al.* (2007) analisaram amostras do sangue periférico de cães infectados com as formas TM ou TS da cepa Be-

78 do *T. cruzi* por citometria de fluxo, observaram um aumento no percentual dos linfócitos T CD8⁺ nos animais infectados pelas formas TM. Abreu-Vieira *et al.*, (2009) analisando este mesmo grupo, encontraram maior produção de óxido nítrico sérico e maior expressão da enzima induzível do óxido nítrico no tecido cardíaco do grupo infectado por formas TM. Entretanto, o infiltrado inflamatório foi mais exacerbado no miocárdio do grupo infectado por formas TS.

A análise da infecção por formas TM e TS do *T. cruzi* em um modelo que reproduza a clínica observada em humanos instigou a realização deste trabalho e pode contribuir para o melhor entendimento da história natural da doença e seus mecanismos imunológicos, fenômenos de resistência e patogênese, sendo de suma importância para o prognóstico de pacientes chagásicos de forma que visem diminuir a mortalidade e a alta morbidade que envolve a doença de Chagas.

2. Objetivos

2.1 - Objetivo geral

Caracterizar o infiltrado inflamatório cardíaco (átrio direito e septo interventricular) durante a fase aguda da infecção experimental de cães por formas tripomastigotas metacíclicas ou sanguíneas da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.

2.2 - Objetivos específicos

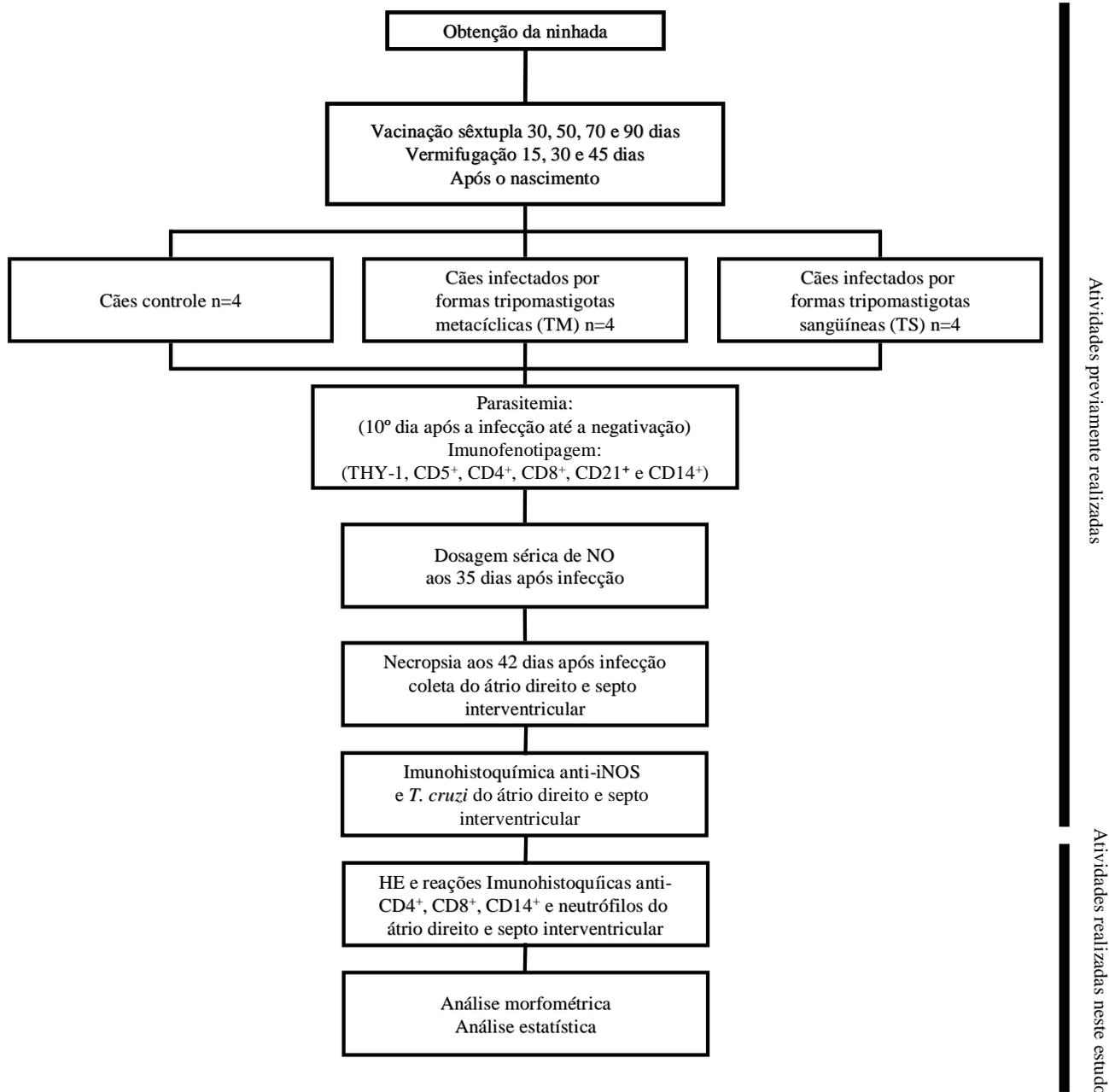
Quantificar os núcleos celulares no átrio direito e septo interventricular;

Identificar e quantificar as populações e as subpopulações de leucócitos presentes no infiltrado inflamatório cardíaco (átrio direito e septo interventricular):

 Linfócitos T CD4⁺;
 Linfócitos T CD8⁺;
 Macrófagos CD14⁺;
 Neutrófilos.

Identificar a melhor estratégia para captura de imagens do infiltrado inflamatório cardíaco.

3. Materiais e Métodos



Delineamento experimental explicitando as atividades previamente realizadas e aquelas realizadas neste trabalho.

3.1 - Atividades previamente realizadas

3.1.1 - Animais, infecção e avaliação *in vivo*

Foram utilizados 12 cães jovens sem raça definida, de ambos os sexos (seis machos e seis fêmeas) provenientes da Maternidade de Cães do Biotério Central 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.

Decorridos 120 dias de idade os animais foram distribuídos em três grupos experimentais, com número de quatro por grupo: controle (C), inoculados com as formas tripomastigotas metacíclicas (TM) e inoculados com as formas tripomastigotas sanguíneas (TS), obtidas de ninfas de *Triatoma infestans* e de camundongos, respectivamente, ambos infectados pela cepa Berenice 78 do *T. cruzi*. Esta cepa foi isolada por xenodiagnóstico em 1978 (Lana e Chiari, 1986) da paciente Berenice, infectada pelo *T. cruzi*, e primeiro caso humano da doença descrito na literatura (Chagas, 1909). Para o inóculo dos animais, foram utilizadas 2000 formas TM ou TS por quilograma (kg) de massa corporal dos cães.

O acompanhamento dos animais ocorreu diariamente, para verificar o estado físico e comportamental, avaliando-se os sinais e sintomas clínicos compatíveis com a fase aguda da DC.

A parasitemia também foi avaliada diariamente a partir do 10º dia após inóculo, através da coleta de cinco µl de sangue da veia marginal da orelha dos cães que eram examinados ao microscópio óptico para a quantificação dos parasitos utilizando a técnica de Brener (1962). O período pré-patente, período patente e o pico de parasitemia foram determinados com base nestes dados. Semanalmente (dia zero do experimento e aos sete, 14, 21, 28, 35 e 42 DAI) foram colhidos 20 ml de sangue para fenotipagem das células por citometria de fluxo (linfócitos T THY-1⁺, CD5⁺, CD4⁺, CD8⁺, linfócitos B CD21⁺ e monócitos CD14⁺) e cultura, na ausência e presença de antígeno, bem como

para realização da sorologia (Coura-Vital *et al.*, 2008) e determinação da concentração sérica de NO (Abreu-Vieira *et al.*, 2009) pela medida de nitritos (NO²) e nitratos (NO³) (Green *et al.*, 1982).

3.1.2 - Necropsia, coleta, fixação e processamento do material para microscopia óptica

Aos 42 dias após o inóculo, os cães foram eutanasiados (0,5 mL/Kg de massa corporal por via endovenosa de tiopental sódico – 0,03g/mL de solução salina 0,8%) com posterior necropsia e coleta dos fragmentos de diferentes tecidos, que foram fixados em formol a 4% em pH 7,2 - 7,4 bem como armazenados a -80 °C.

Para a realização deste trabalho foram avaliadas duas regiões cardíacas, átrio direito e septo interventricular. Fragmentos destas duas regiões foram processados rotineiramente e incluídos em blocos de parafina, que subsequentemente foram submetidos à microtomia para obtenção de cortes histológicos com a espessura de quatro micrômetros (µm) utilizados para diversas técnicas. Dois destes cortes foram submetidos a reações IHQ para a detecção da expressão da iNOS e parasitismo tecidual (Abreu-Vieira *et al.*, 2009).

3.2 - Atividades realizadas neste estudo

3.2.1 - Coloração pela Hematoxilina Eosina

Os cortes foram desparafinizados em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100, 90, 80 e 70%) e então lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina 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 e levados à estufa a 56 °C para secagem e montados com lamínula e Entellan.

3.2.2 - Imuno-histoquímica para detecção de linfócitos T (CD4⁺, CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos

A IHQ aplicada neste trabalho utilizou o sistema de reação para a amplificação do sinal CSA system, (Dako Corporation, Carpinteria, CA, USA), conjugado com a enzima peroxidase. Foram utilizados anticorpos primários monoclonais produzidos em camundongo anti-cão, os quais foram diluídos em diluente com componentes redutores de “*background*”. Nas lâminas referentes ao controle negativo, adicionou-se apenas o diluente do anticorpo.

Os cortes histológicos obtidos por microtomia foram estendidos em lâminas de vidro, previamente gelatinizadas, e permaneceram durante 12 horas em estufa a 56 °C, para melhor fixação dos mesmos. Posteriormente, foram imersos em dois banhos de xilol (durante 15 minutos/cada) para retirada da parafina. Em seguida, foram hidratados em concentrações decrescentes de álcool (absoluto, 90%, 80% e 70%, durante cinco minutos cada) e água.

Após hidratação, foram imersos em tampão TBS-T (cinco minutos). Procedeu-se então a recuperação dos sítios antigênicos, com imersão dos cortes histológicos em tampão fosfato/citrato pH 6,0 (20 minutos) em panela de pressão, que foi levada ao microondas, sendo os primeiros 10 minutos com a panela de pressão aberta e os 10 minutos restantes, com a panela de pressão fechada. Posteriormente, os cortes foram retirados e deixados à temperatura ambiente (uma hora), ainda imersos em tampão fosfato/citrato, para que ocorresse um resfriamento progressivo dos cortes histológicos, evitando assim que ocorresse um choque térmico e os cortes se soltassem das lâminas. Subsequentemente, as lâminas foram imersas em três banhos de TBS-T (cinco minutos cada).

Em seguida, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com a imersão das lâminas em peróxido de hidrogênio a 30% e álcool metílico (proporção de 1:10), em temperatura ambiente (30 minutos), seguido de três banhos com TBS-T (cinco minutos cada).

Realizou-se bloqueio dos sítios inespecíficos com soro normal de cavalo sendo os cortes incubados à temperatura ambiente (cinco minutos).

Após esta etapa, os cortes foram incubados com os anticorpos primários, durante 12-18 horas em câmara úmida (2–8°C) e posteriormente receberam três banhos em TBS-T (cinco minutos cada). Em seguida, adicionou-se o anticorpo secundário biotilado (15 minutos) à temperatura ambiente, seguido de três banhos em TBS-T (cinco minutos cada). Adicionou-se o complexo estreptoavidina-biotina, com a incubação à temperatura ambiente (15 minutos), seguida de três banhos em TBS-T (cinco minutos cada). Neste momento, foi aplicada sobre os cortes a proteína para amplificar a reação, sendo os mesmos incubados à temperatura ambiente (15 minutos), seguida de três banhos em TBS-T (cinco minutos cada). Aplicou-se então o complexo estreptoavidina-peroxidase, permanecendo as lâminas incubadas neste complexo à temperatura ambiente (15 minutos), sendo em seguida imersas em três banhos de TBS-T (cinco minutos cada).

A marcação celular foi revelada pela ação da enzima peroxidase, que age sobre o seu substrato 3,3'-diaminobenzidina (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 100mg de DAB, a solução foi filtrada em papel filtro e acrescida de um mL de peróxido de hidrogênio 30% na cuba usada para a revelação. Os cortes foram imersos nesta solução (cinco minutos) à temperatura ambiente. Em seguida, as lâminas permaneceram (cinco minutos) imersas em água corrente com o objetivo de bloquear a ação da enzima peroxidase. Para contraste, utilizou-se Hematoxilina de Harris (cinco segundos) e novamente os cortes foram imersos em água corrente (cinco minutos), imersos em álcool absoluto (um minuto), levados a estufa de secagem (56 °C) e montados com Entellan e lamínula. Durante o procedimento da técnica, em cada bateria de IHQ, foram utilizados como controle positivo e negativo dois cortes histológicos do septo interventricular (SI) de cão infectado pela cepa Be-78 do *T. cruzi* anteriormente utilizado no processo de padronização das reações, no qual se observou marcação positiva para as células em estudo. Além disso, foi realizado um controle negativo de cada fragmento cardíaco para garantir a qualidade da técnica. Para padronização das reações imuno-histoquímicas foram realizadas diluições sucessivas, sendo este processo

aplicado a diferentes tecidos (baço, linfonodo, átrio e septo interventricular). Na Figura 1 são mostradas fotomicrografias do linfonodo de cão controle e nas Figuras 2 e 3, são mostradas fotomicrografias de duas regiões distintas do SI de cão infectado por formas TM da cepa Be-78 do *T. cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda da infecção. Também foi realizada análise morfométrica das células marcadas utilizando-se as diferentes diluições no intuito de verificar se haviam diferenças entre a quantidade de células ocasionada pela diluição do anticorpo.

Figura 1 - Fotomicrografias submetidos a reações imuno-histoquímicas (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos), de cortes histológicos do linfonodo de cães controle. **Observa-se controle negativo (A), marcações para os linfócitos T CD4⁺ (B) e CD8⁺ (C), macrófagos CD14⁺ (D) e neutrófilos (E). Barra = 50 micrômetros.**

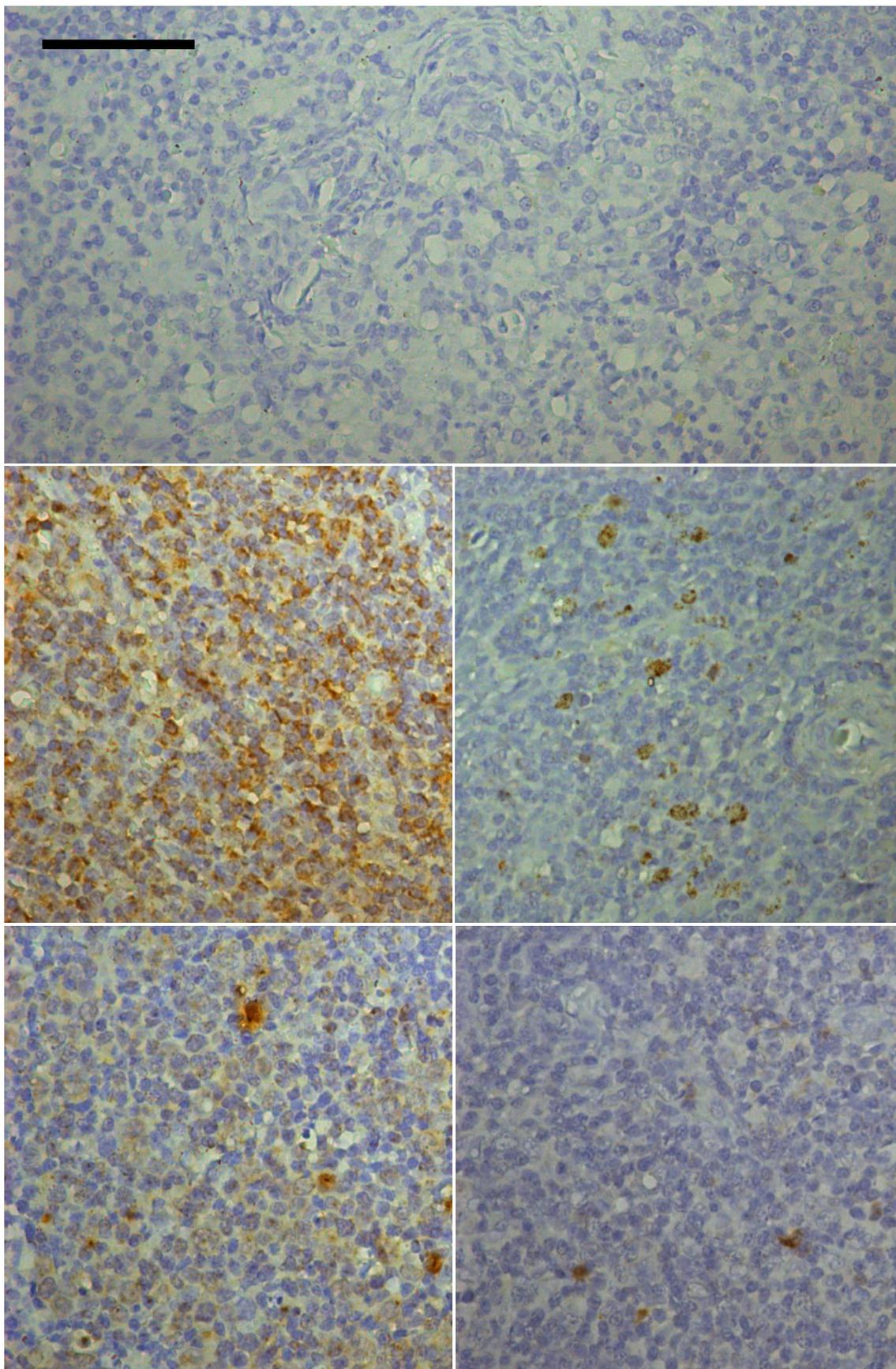


Figura 2 - Fotomicrografias de cortes histológicos do septo interventricular, submetidos a reações imuno-histoquímicas (CD4⁺, CD8⁺, macrófagos CD14⁺ e Neutrófilos), de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. Em 2 (A) os controles negativos da reação; (B) observam-se numerosos linfócitos T CD4⁺; (C) linfócitos T CD8⁺ ausentes; (D) macrófagos CD14⁺ ausentes e (E) os neutrófilos ausentes. Barra = 50 micrômetros.

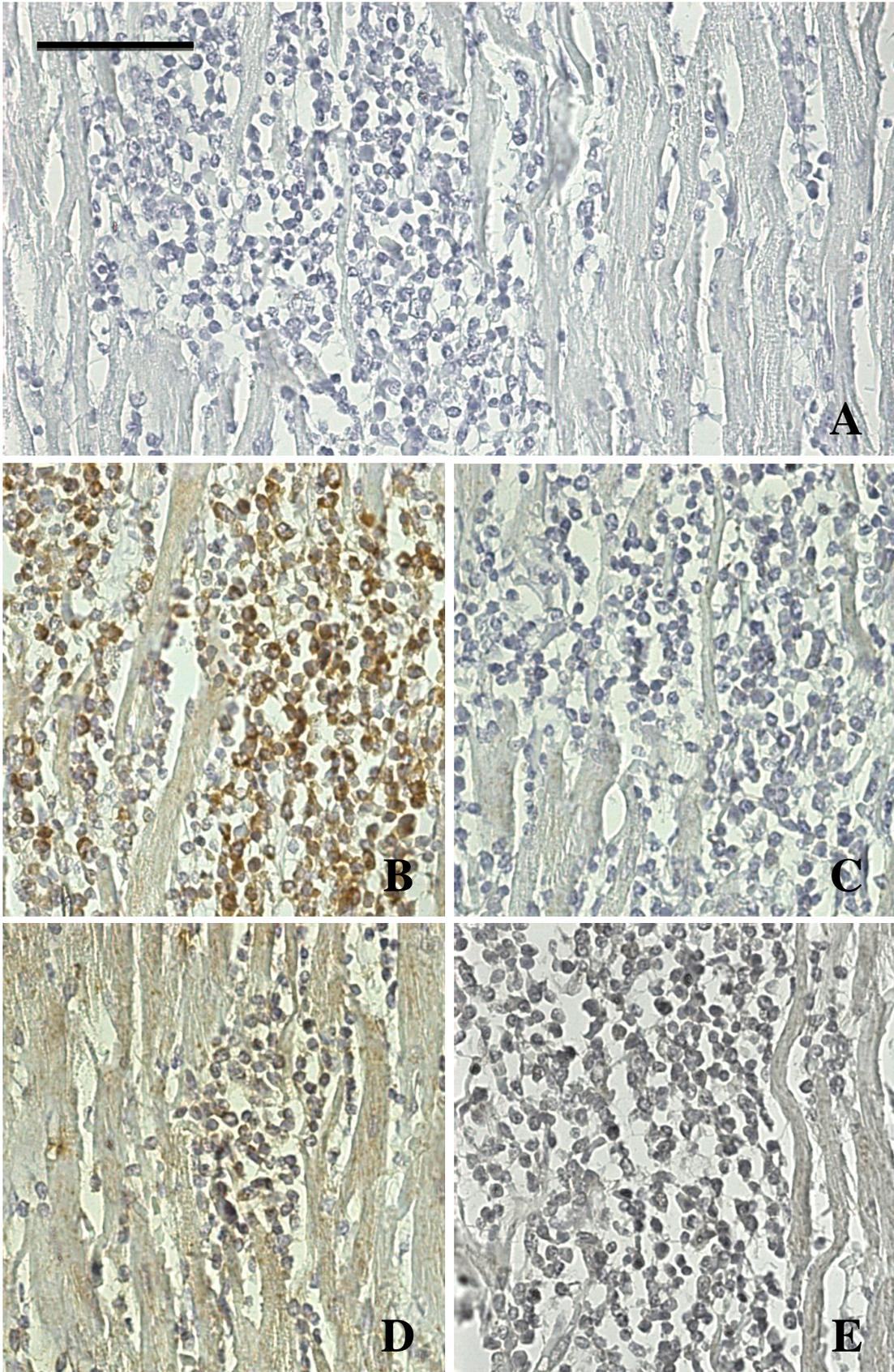
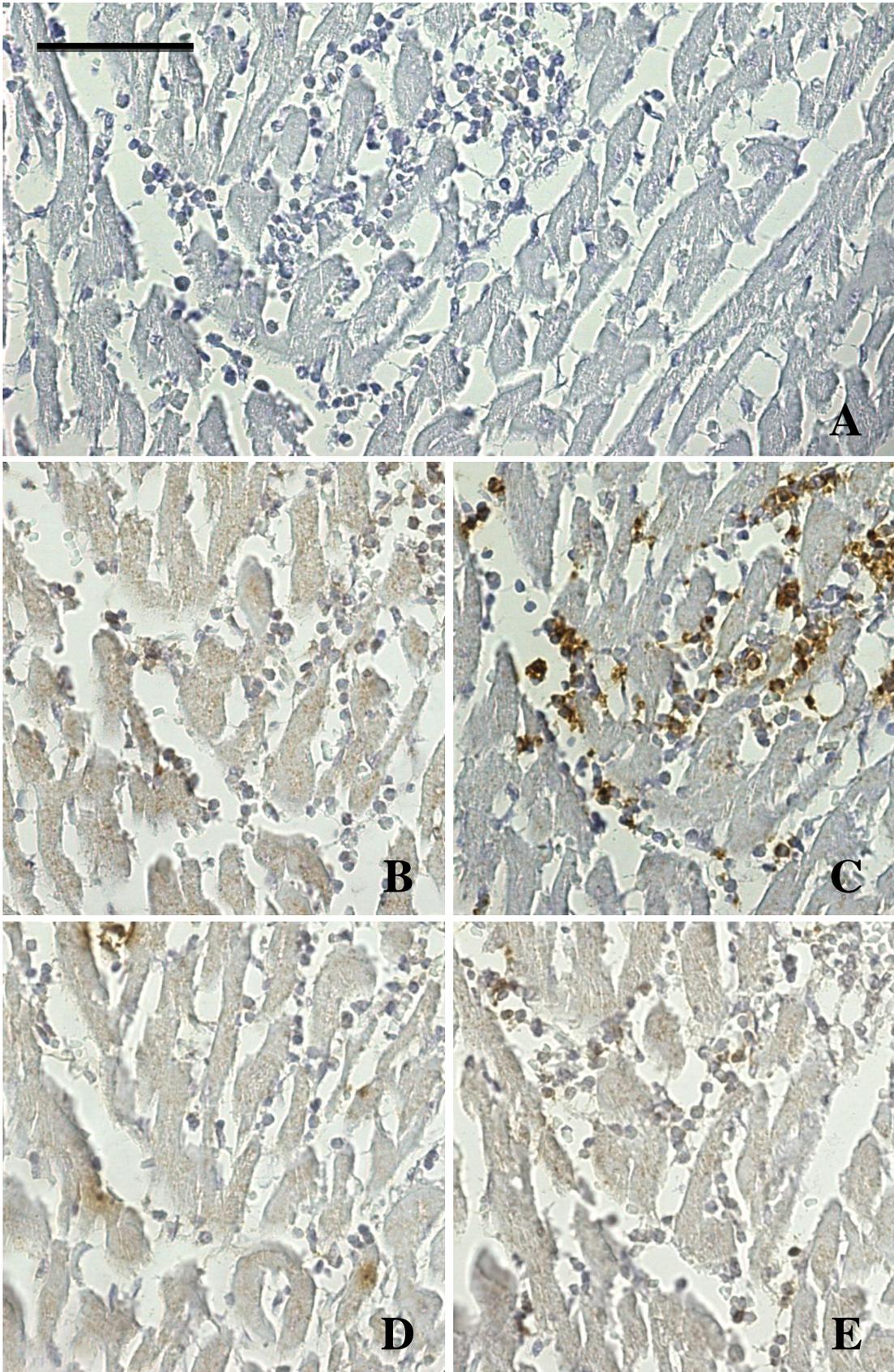


Figura 3 - Fotomicrografias de cortes histológicos do septo interventricular, submetidos a reações imuno-histoquímicas (CD4⁺, CD8⁺, macrófagos CD14⁺ e Neutrófilos), de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. Em 2 (A) os controles negativos da reação; (B) observam-se linfócitos T CD4⁺, sendo escassos; (C) linfócitos T CD8⁺, sendo numerosos; (D) macrófagos CD14⁺ ausentes e (E) os neutrófilos estão presentes. Barra = 50 micrômetros.



3.2.3 - Quantificação morfométrica do processo inflamatório cardíaco na infecção aguda pelo *T. cruzi*.

O processo inflamatório foi avaliado nos cortes histológicos dos fragmentos do átrio direito (AD) e SI submetidos à técnica de coloração pela Hematoxilina e Eosina (HE) bem como a IHQ para cada tipo celular.

Para tanto, os núcleos celulares presentes nos cortes histológicos corados pela HE e todas as células marcadas nas diferentes reações IHQ foram quantificadas a partir de duas estratégias: (a) 15 imagens (campos) aleatórias obtidas do tecido como um todo ou (b) 15 imagens (campos) obtidas especificamente em campos microscópicos que continham focos inflamatórios (área total percorrida igual a $1,125 \times 10^6 \mu\text{m}^2$, em ambas as situações). Este número foi definido através da elaboração de uma curva de estabilidade.

As imagens foram visualizadas através da objetiva de 40 vezes do microscópio *Leica DM5000B*, digitalizadas utilizando-se a câmara *Leica DFC340 FX* e o programa *Leica Application Suite* (Versão 2.4.0 R1). Para a análise das imagens obtidas foi utilizado o programa *Leica QWin V3*.

As imagens obtidas das lâminas coradas pela HE foram submetidas à quantificação semi-automática dos núcleos celulares (Maltos *et al.*, 2004; Pacheco *et al.*, 2007). Realizou-se a contagem total dos núcleos celulares em 15 imagens (campos) por fragmento cardíaco avaliado.

As imagens obtidas das lâminas marcadas por IHQ foram submetidas à contagem manual para cada célula que continha marcação visualizada na tela do computador, sendo levada em consideração a morfologia celular. Realizou-se a contagem total e a média das marcações celulares em 15 imagens (campos) por fragmento cardíaco avaliado.

3.2.4 - Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios

A estimativa de núcleos celulares não inflamatórios (ENCNI), cardiomiócitos, fibroblastos, células endoteliais entre outras, foi determinada subtraindo-se do número total de núcleos celulares (NC), observados nos cortes histológicos, corados pela HE, do

AD e SI dos animais controles, o número total de células marcadas por IHQ (CIM) (CD4 + CD8 + CD14 + neutrófilos) presentes nos respectivos fragmentos, que foi extrapolada para os grupos infectados (TM e TS).

$$ENCNI_c = NC_c (HE) - CIM_c (IHQ)$$

ENCNI_c = Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios; *NC_c* = núcleos celulares (HE); *CIM_c* = células inflamatórias marcadas (IHQ); *c* = grupo controle.

De posse da estimativa de núcleos celulares não inflamatórios no grupo controle, pode-se inferir o número de células não inflamatórias observado nos animais infectados, desconsiderando-se a eventual perda de algumas células cardíacas substituídas por infiltrado inflamatório/morte celular.

Portanto, a estimativa de células observadas nos grupos infectados (EC) foi determinada pelo somatório da estimativa de núcleos celulares não inflamatórios ao número total de células marcadas por IHQ nos cortes histológicos do AD e SI dos animais pertencentes aos grupos TM e TS.

$$EC_i = ENCNI_c + CIM_i (IHQ)$$

EC_i = Estimativa de células observadas nos grupos infectados, *i* = grupo infectado

Dessa forma pode ser inferido o número de células inflamatórias não marcadas (ECINM) por IHQ, subtraindo-se do número total de núcleos celulares, observado na quantificação dos cortes histológicos do AD e SI corados pela HE, a estimativa celular do grupo infectado.

$$ECINM_i = NC_i - EC_i$$

ECINM_i = Estimativa de células inflamatórias não marcadas

3.3 - Análise estatística

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5.0 (Prism Software, Irvini, CA, USA).

Para comparação dos grupos controle e infectados foi feita análise de variância (ANOVA one-way), utilizando o pós-teste de Tukey, para determinar as diferenças específicas entre as médias. Para avaliar a diferença entre os grupos infectados utilizou-se o *teste t* para as amostras não pareadas e pareadas.

Diferenças para ambas as análises foram consideradas com valores de *P* menores que 0,05.

4. Resultado

4.1 - Avaliação do processo inflamatório

4.1.1 - Análise histopatológica de cortes corados pela Hematoxilina e Eosina

Na Figura 4 estão apresentados os aspectos histopatológicos observados nos cortes histológicos do AD e SI corado pela HE dos animais pertencentes aos grupos C, TM ou TS. Em 4A e B, cortes histológicos do AD e SI, respectivamente, pertencentes a animal do grupo controle destacando padrão histológico compatível com quadro de normalidade. Nas Figuras 4C e D destaca-se o padrão de infiltrado inflamatório observado respectivamente, no AD e SI dos animais do grupo TM. Em 3E e F destaca-se o padrão de infiltrado inflamatório observado no AD e SI, respectivamente; dos animais dos grupos TS. Nota-se para o grupo TM, um infiltrado inflamatório difuso e moderado, causando pequeno espaçamento em meio às fibras cardíacas. Dentre os quatro cães avaliados, um destes apresentava discreto infiltrado inflamatório, com poucos focos inflamatórios comparado aos demais animais. No grupo TS, nota-se processo inflamatório difuso ou focal e intenso, ocorrendo destruição e espaçamento das fibras cardíacas. Em ambos os grupos infectados, o padrão celular é caracteristicamente de células mononucleares, apresentando morfologia compatível com a de linfócitos.

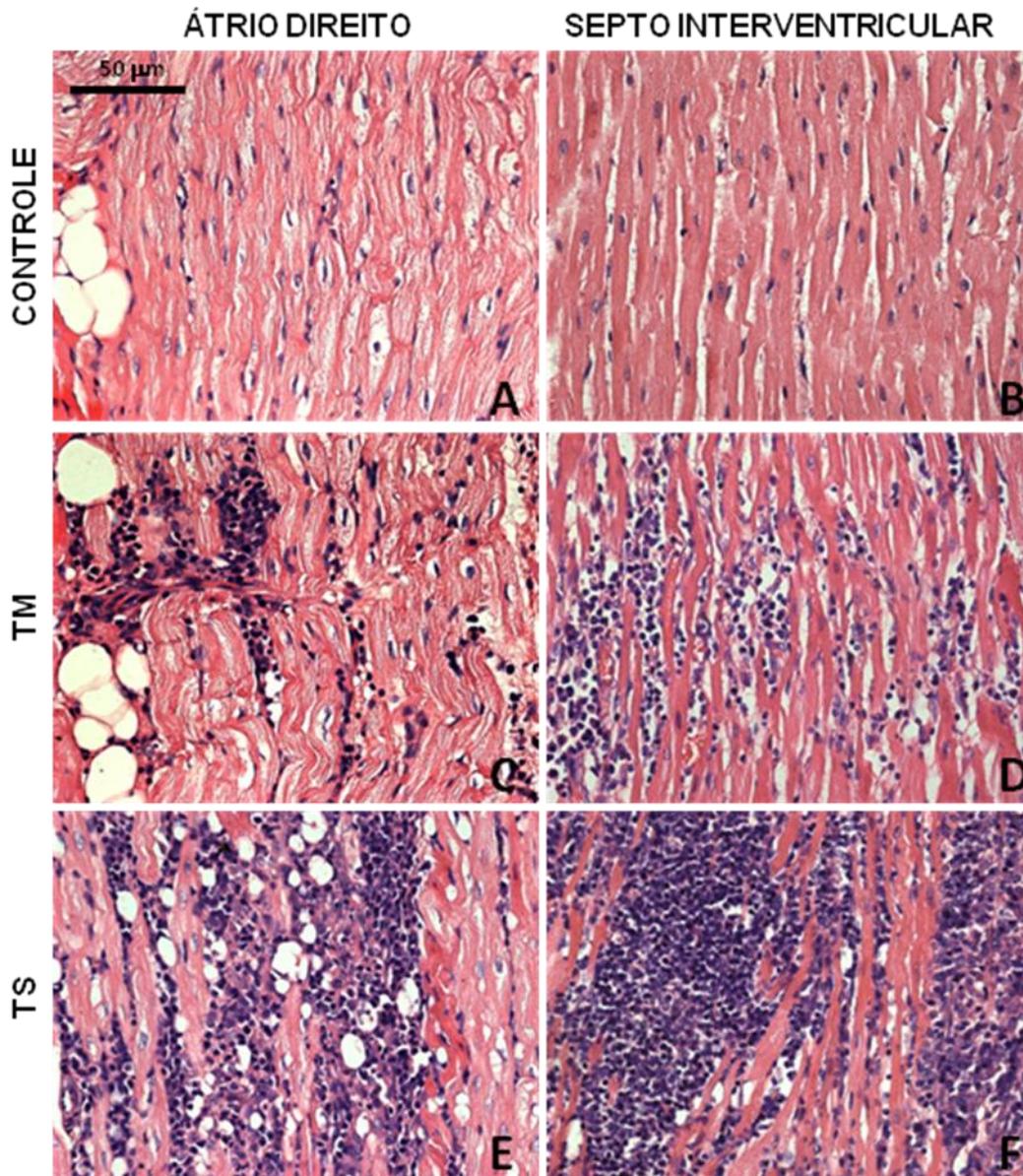


Figura 4 – Fotomicrografias de cortes histológicos corados pela Hematoxilina Eosina do átrio direito-AD (C e E) septo interventricular-SI (D e F) de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou tripomastigotas sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda, em comparação a cães controle-C (A e B), eutanasiados com a mesma faixa etária. Em 3A e B nota-se padrão histológico compatível com quadro de normalidade no grupo controle. Em 3C e D destaca-se o padrão de infiltrado inflamatório mononuclear moderado com distribuição difusa no grupo TM e em E e F intenso com distribuição difusa e focal no grupo TS, respectivamente. Barra = 50 micrômetros

4.1.2 - Análise histopatológica de cortes submetidos a reações de imuno-histoquímica

Na Figura 5 estão representados os padrões de marcações celulares observados nos cortes histológicos do AD ou SI submetidos a reações de IHQ, dos animais pertencentes aos grupos infectados (TM ou TS).

Nas Figuras 5A e B, observam-se os padrões de marcações para os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, respectivamente, em cortes histológicos do SI. A marcação celular para os linfócitos T CD4⁺ apresentou-se sob o aspecto de células isoladas, distribuídas difusamente e/ou agrupadas focalmente no infiltrado inflamatório (Figura 5A). Os linfócitos T CD8⁺ (Figura 5B) também foram observados distribuídos de forma isolada, difusa e/ou agrupada focalmente no infiltrado inflamatório. Nota-se um menor número destes, quando comparado aos linfócitos T CD4⁺.

Nas Figuras 5C e D (linfócitos T CD4⁺) e nas figuras 5E e F (linfócitos T CD8⁺) nota-se a presença das células em meio ao tecido adiposo (5C e E) e permeando vasos sanguíneos (5D e F).

Os macrófagos CD14⁺ (Figura 5G), mostraram-se em menor número quando comparados aos linfócitos, distribuídos de forma isolada ou difusa, mas também presentes em meio ao foco inflamatório.

Os neutrófilos (Figura 5H) encontravam-se em pequena quantidade, distribuídos de modo disperso no tecido cardíaco.

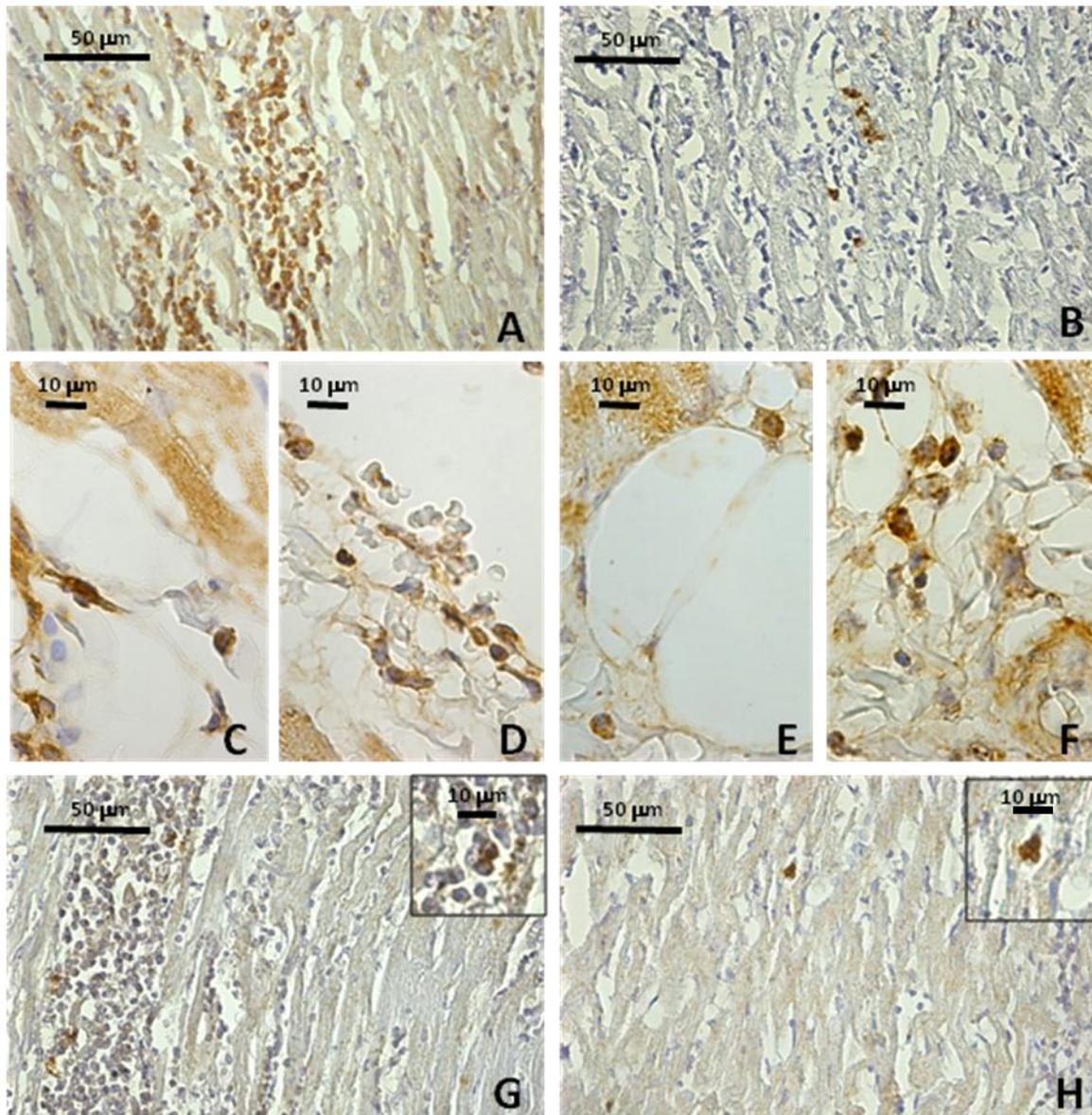


Figura 5 - Fotomicrografias de cortes histológicos, submetidos a reações imuno-histoquímicas (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos), do átrio direito (AD) ou do septo interventricular (SI) de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. Em 4 (A, C e D) observam-se linfócitos T CD4⁺, distribuídos de forma isolada, difusa e/ou agrupada (B, E e F) linfócitos T CD8⁺, distribuídos de forma isolada e/ou focal, tanto no parênquima (4 A e B) quanto permeando tecido adiposo e vasos sanguíneos (4 C e D) (4 E e F). Nota-se maior quantidade de linfócitos T CD4⁺. Em 4G macrófagos CD14⁺ e em 4H neutrófilos, em ambos os casos, escassamente distribuídos. A, B, G e H: barra = 50 micrômetros; C, D, E, F e detalhes: barra = 10 micrômetros.

4.1.3 - Análise morfométrica realizada de forma aleatória

4.1.3.1 - Quantificação dos núcleos celulares

A análise morfométrica mostrou aumento significativo de núcleos celulares no grupo TS em relação ao grupo C e TM no AD e SI (Figura 6). No grupo TM as diferenças ocorreram no AD apenas para o grupo TS e no SI para o grupo C e TS.

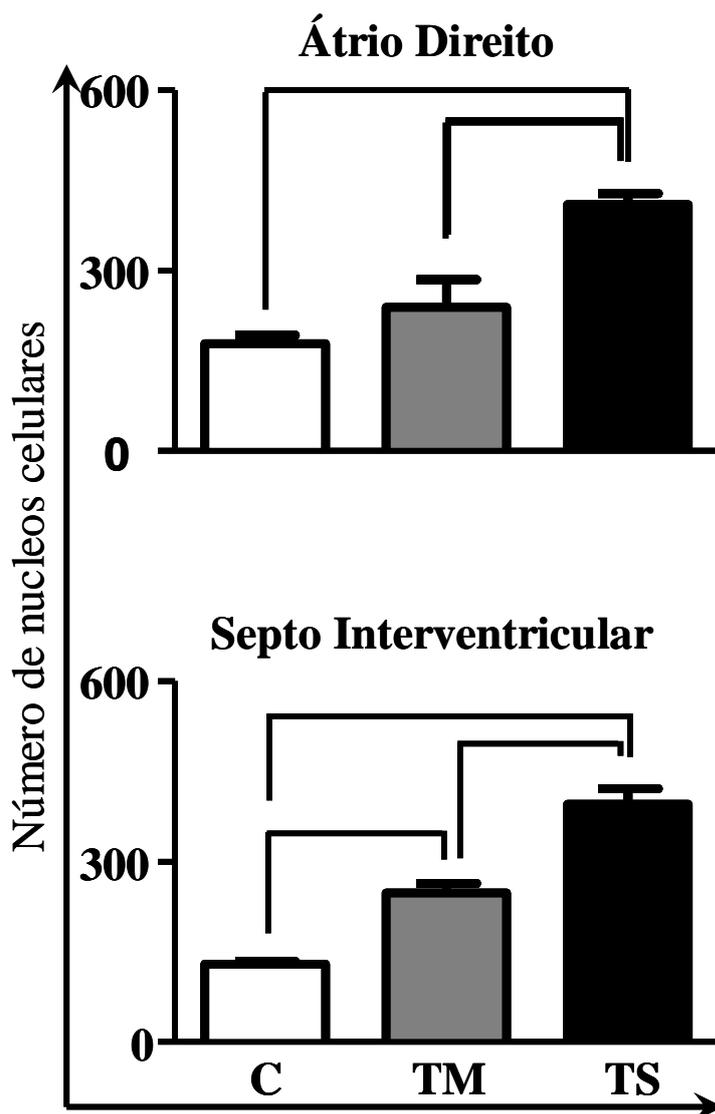


Figura 6 – Análise morfométrica do infiltrado inflamatório realizada de forma aleatória em cortes histológicos corados pela HE do átrio direito (AD) ou do septo interventricular (SI) de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou tripomastigotas sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda, em comparação a cães controle (C), eutanasiados com a mesma faixa etária. Observa-se o número médio de células inflamatórias no átrio direito e no septo interventricular quantificados em uma área total de $1,25 \times 10^6$ micrômetros quadrados. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o número médio de células inflamatórias entre os grupos (C, TM e TS) no AD ou SI.

4.1.3.2 - Quantificação de células T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos

Para quantificação dos tipos celulares presentes no parênquima cardíaco, as imagens foram capturadas de forma aleatória e as células marcadas quantificadas, sendo os resultados expressos em número médio de células marcadas por grupo (Figura 7), para cada marcação celular (CD4, CD8, CD14 e neutrófilos), em cortes histológicos do AD e SI dos animais pertencentes aos grupos C, TM e TS.

Nas Figuras 7A e B encontram-se representados os resultados da quantificação dos linfócitos T CD4⁺ realizada no AD e SI, respectivamente. Apesar do número médio maior de células T CD4⁺ nos animais infectados em relação aos animais do grupo C, não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos analisados ou mesmo em relação ao número médio dos linfócitos T CD8⁺.

No AD (Figura 7C) observou-se um aumento significativo de linfócitos T CD8⁺ nos grupos infectados em relação ao grupo C. Contudo, no SI (Figura 7D), apenas o grupo TM apresentou maior número de células T CD8⁺ em relação ao grupo C, sendo também maior do que o grupo TS, que apresentou valores semelhantes aos observados nos animais do grupo C.

Observou-se também um aumento significativo dos macrófagos CD14⁺ no AD do grupo TM (Figura 7E) em relação ao grupo C. De forma semelhante ao encontrado para as células CD8⁺ no SI do grupo TM (Figura 7D), verificou-se um aumento significativo dos macrófagos CD14⁺ em relação aos grupos C e TS (Figura 7F).

Apesar do baixo número de neutrófilos, estes mostraram-se em maior quantidade no AD dos grupos infectados (TM e TS) em relação ao grupo C (Figura 7G). Entretanto, no SI (Figura 7H) não foram observadas diferenças significativas entre os três grupos avaliados.

A comparação do número de células observado no AD em relação ao SI dentro do mesmo grupo, buscando avaliar diferenças entre distintas câmaras cardíacas, mostrou que os linfócitos T CD8⁺, macrófagos e neutrófilos estavam aumentados no AD do grupo TS. No grupo TM, apenas os neutrófilos estavam aumentados no AD em relação ao SI.

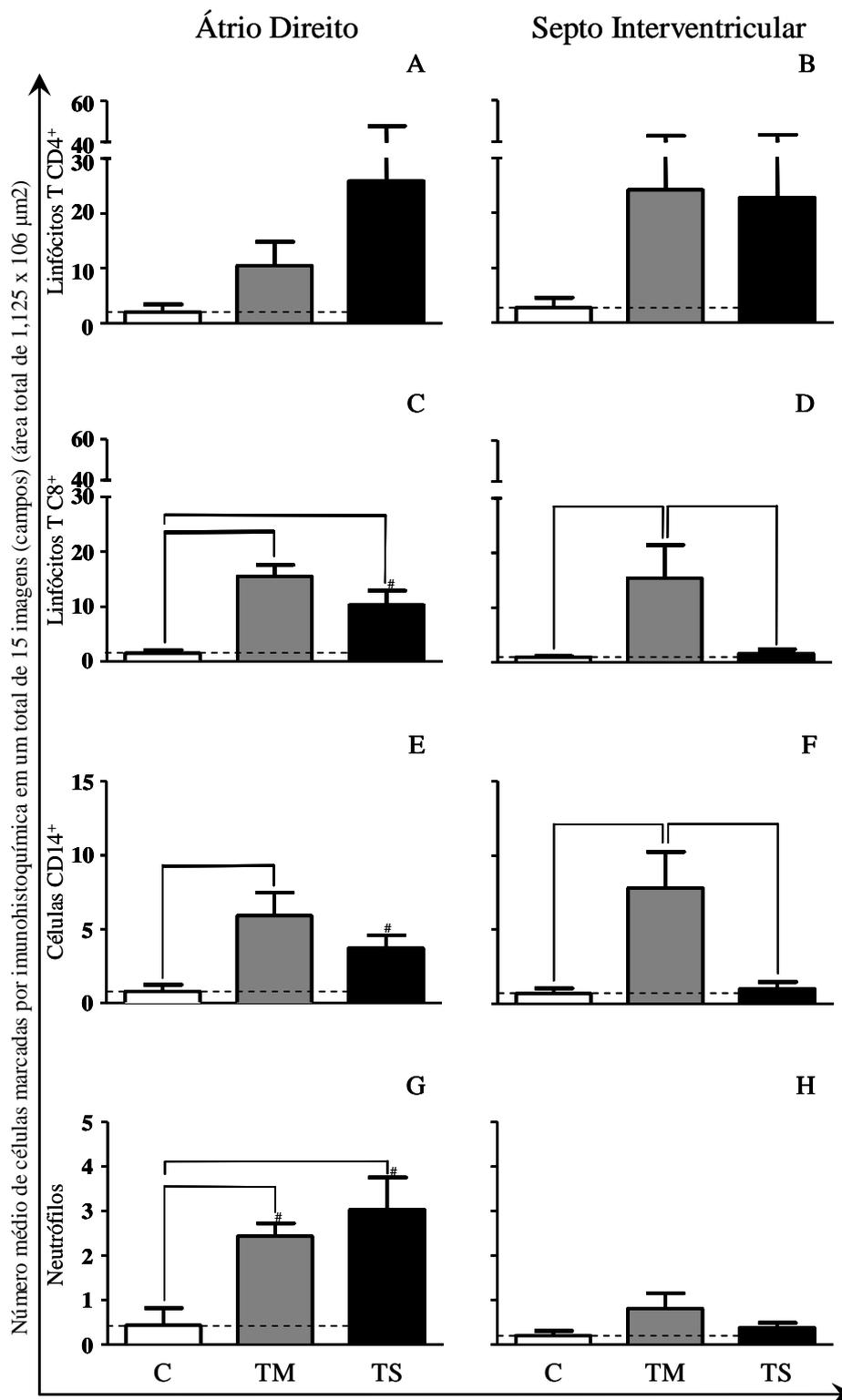


Figura 7 - Análise morfológica das células do infiltrado inflamatório (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos) realizada de forma aleatória em cortes histológicos do átrio direito (AD) ou do septo interventricular (SI) de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou tripomastigotas sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda, em comparação a cães controle (C) eutanasiados com a mesma faixa etária. (A e B) mostra o número médio de linfócitos T CD4⁺, (C e D) de linfócitos T CD8⁺, (E e F) de células CD14⁺ e (G e H) de neutrófilos marcados por imuno-histoquímica e quantificados em uma área total de 1,125 x 10⁶ μm². Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o número médio de células marcadas entre os grupos (C, TM e TS) no AD ou SI; # indicam diferenças significativas para o número médio de células marcadas entre o AD e SI dentro dos grupos C, TM ou TS.

4.1.3.3 - Razão dos linfócitos TCD4⁺/CD8⁺

A Tabela 1 mostra a razão dos linfócitos T CD4⁺/CD8⁺, obtidas através da soma do número total de células CD4⁺ marcadas por IHQ e dividido pelo número total de linfócitos T CD8⁺ em 15 imagens capturadas de forma aleatória totalizando uma área de 1,125 x 10⁶ μm² nas secções histológicas do AD e SI dos animais pertencentes aos grupos C e infectados por formas TM ou TS.

A razão de linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ mostrou, no AD dos animais do grupo TM, o mesmo número de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, no SI do grupo TM e do grupo TS verificou maior número de linfócitos T CD4⁺ e no AD do grupo TS observa maior número de linfócitos T CD8⁺.

Tabela 1 – Razão entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quantificados de forma aleatória no átrio direito e septo interventricular de cães pertencentes aos grupos controle (C) e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS).

Razão CD4/CD8	C	TM	TS
	AD	0,8	1,0
SI	0,9	1,8	2,8

4.1.3.4 – Porcentagem de células T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas

A Tabela 2 apresenta a porcentagem de células T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos), no átrio direito e septo interventricular dos animais pertencentes aos grupos C e infectados por formas TM ou TS.

Grupo controle

O número total de células marcadas (100%) por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) no AD do grupo C foram 412 (Tabela 2). A partir deste somatório foi definido o percentual de cada fenótipo celular.

Estas células marcadas por IHQ no parênquima cardíaco do grupo C representam o repertório de células imunes observadas em trânsito em tecidos normais.

Dessa forma, ao avaliar as marcações celulares obtidas, pode-se ainda estabelecer que dentre as células imunes em trânsito no AD, 30% (122) representam linfócitos T CD4⁺, 40% (164) linfócitos T CD8⁺, 24% (99) macrófagos CD14⁺ e 6% (27) neutrófilos.

No SI, por sua vez, de um total de 143 células do grupo C, verificou-se 21% (31) de linfócitos T CD4⁺, 40% (57) de linfócitos T CD8⁺, 30% (42) de macrófagos CD14⁺ e 9% (13) de neutrófilos, valores estes, em percentual, muito próximos do observado no AD.

Grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas

A partir do número total de células marcadas por IHQ (1148 = 100%) no AD do grupo TM foram definidos os percentuais de cada marcação: 19% (216) de linfócitos T CD4⁺, 62% (714) de linfócitos T CD8⁺, 17% (137) de macrófagos CD14⁺ e 2% (81) de neutrófilos (Tabela 2).

No SI observou-se um total de 2670 células marcadas por IHQ sendo o percentual de linfócitos T CD4⁺ de 54% (1452), de linfócitos T CD8⁺ de 26% (701), de macrófagos CD14⁺ de 18% (468) e de neutrófilos de 2% (49) (Tabela 2).

Grupo infetado por formas tripomastigotas sanguíneas

Do total de células marcadas por IHQ no AD do grupo TS (1349) também foram obtidos os percentuais de cada fenótipo celular: 38% (511) de linfócitos T CD4⁺, 42% (565) de linfócitos T CD8⁺, 10% (135) de macrófagos CD14⁺ e 10% (38) de neutrófilos.

No SI, de um total de 1637 células marcadas por IHQ verificou-se 82% (1334) de linfócitos T CD4⁺, 13% (217) de linfócitos T CD8⁺, 4% (64) de macrófagos CD14⁺ e 1% (22) de neutrófilos.

Tabela 2 - Porcentagem de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), células CD14⁺ (macrófagos) e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas no átrio direito e septo interventricular dos animais pertencentes aos grupos controle (C) e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS), da cepa Be-78 do *T. cruzi*.

	Átrio Direito			Septo Interventricular		
	C % (n)	TM % (n)	TS % (n)	C % (n)	TM % (n)	TS % (n)
Total de células marcadas	100 (412)	100 (1148)	100 (1349)	100 (143)	100 (2670)	100 (1637)
CD4 ⁺	30 (122)	19 (216)	38 (511)	21 (31)	54 (1452)	82 (1334)
CD8 ⁺	40 (164)	62 (714)	42 (565)	40 (57)	26 (701)	13 (217)
CD4 ⁺ + CD8 ⁺	70 (286)	81 (930)	80 (1076)	61 (88)	80 (2153)	95 (1551)
CD14 ⁺	24 (99)	17 (137)	10 (135)	30 (42)	18 (468)	4 (64)
Neutrófilos	6 (27)	2 (81)	10 (138)	9 (13)	2 (49)	1 (22)

4.1.5 - Análise morfométrica realizada no foco inflamatório

4.1.5.1 - Quantificação de núcleos celulares

A análise morfométrica mostrou aumento significativo de núcleos celulares no grupo TS em relação ao grupo TM no AD, já no SI não ocorreram diferenças (Figura 8).

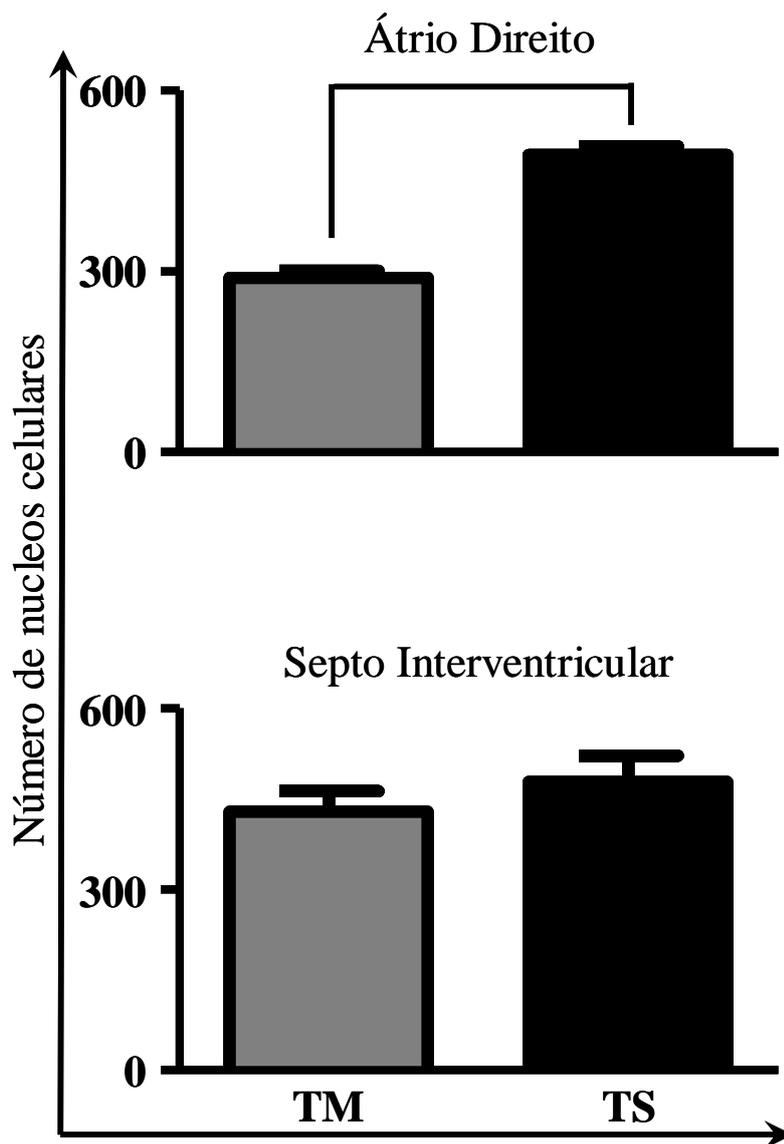


Figura 8 - Análise morfométrica do número de núcleos celulares realizada no foco inflamatório em cortes histológicos corados pela Hematoxilina e Eosina do átrio direito (AD) ou do septo interventricular (SI) de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou tripomastigotas sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. Mostra o número médio de células inflamatórias no átrio direito e no septo interventricular quantificado em uma área total de $1,125 \times 10^6 \mu\text{m}^2$. Linhas conectoras indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) para o número médio de células inflamatórias entre os grupos (TM e TS) no AD ou SI.

4.1.5.2 - Quantificação das células T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos

Para quantificação dos fenótipos celulares presentes no foco inflamatório, as imagens foram capturadas e as células marcadas, sendo os resultados expressos em número médio de células marcadas por grupo, para cada marcação celular (CD4, CD8, CD14 e neutrófilos), em cortes histológicos do AD e SI dos animais pertencentes aos grupos TM e TS (Figura 9).

Nas Figuras 9A e B encontram-se representados os resultados da quantificação dos linfócitos T CD4⁺ realizada no AD e SI, respectivamente. Não foram observadas diferenças significativas entre os dois grupos analisados.

O número médio de linfócitos T CD8⁺ nos grupos infectados não apresentaram diferenças, tanto no AD ou SI (Figura 9C e D). Contudo, nota-se que no SI, ocorre um padrão de gráfico das marcações semelhante ao observado durante a análise aleatória.

Para as macrófagos CD14⁺ no AD e SI (Figura 9E e F) não ocorreram diferenças. Mas, de forma semelhante ao encontrado para os linfócitos T CD8⁺ no SI, verificou-se também um padrão gráfico semelhante ao observado na análise aleatória.

Os neutrófilos mostraram-se em menor quantidade em relação aos linfócitos no AD e SI (Figura 9G e H). Quando se compara as duas formas de captura de imagens realizadas para a análise, aleatória ou focal, nota-se menor número de neutrófilos no foco inflamatório, revelando que este tipo celular, embora escasso em ambas as análises, é observado em maior escala disperso no parênquima cardíaco.

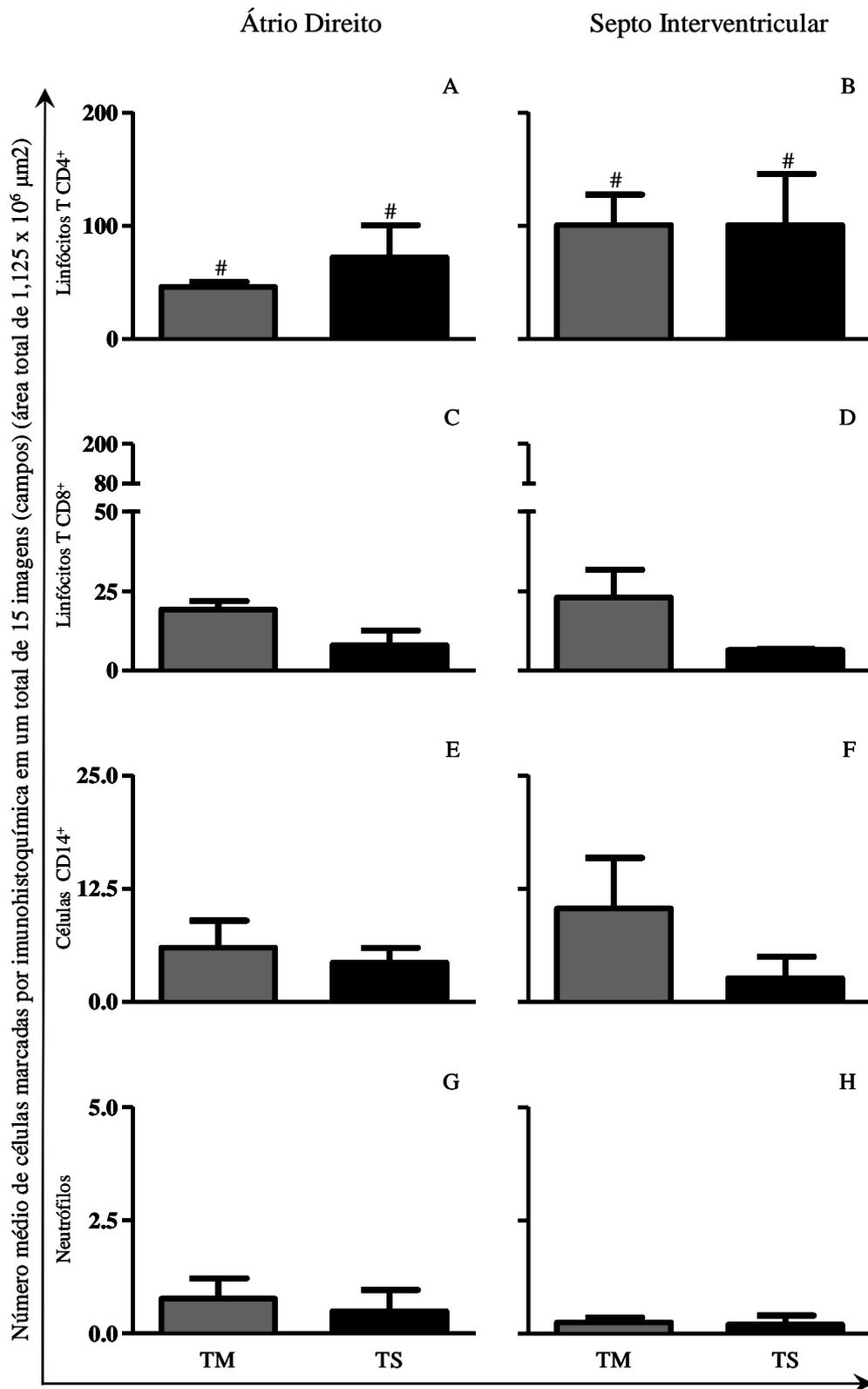


Figura 9 - Análise morfométrica das células do infiltrado inflamatório (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ e Neutrófilos) realizada nos focos inflamatórios em cortes histológicos do átrio direito (AD) ou do septo interventricular (SI) de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou tripomastigotas sanguíneas (TS) da cepa Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda. (A e B) mostra o número médio de linfócitos T CD4⁺, (C e D) de linfócitos T CD8⁺, (E e F) de células CD14⁺ e (G e H) de neutrófilos marcadas por IHQ e quantificadas em uma área total de 1,125 x 10⁶ μm². # indicam diferenças significativas entre o número médio de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ marcadas no AD e SI dentro dos grupos TM ou TS.

4.1.5.3 - Razão dos linfócitos T CD4⁺/CD8⁺

A Tabela 3 mostra a razão dos linfócitos T CD4⁺/CD8⁺, obtida através da soma do número total de células marcadas por IHQ (CD4 e CD8) em 15 imagens capturadas de forma focal totalizando uma área de 1,125 x 10⁶ μm² nas secções histológicas do AD e SI dos animais pertencentes aos grupos infectados por formas TM ou TS.

A razão linfócitos T CD4⁺/CD8⁺ no grupo TM para o AD e SI são, respectivamente, 2,4 e 5,4. Para o grupo TS verificou-se uma razão de 2,6 e 21, para o AD e SI, respectivamente, mostrando maior número dos linfócitos T CD4⁺.

Tabela 3 – Razão entre os linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ quantificados no foco inflamatório no átrio direito e septo interventricular de cães pertencentes aos grupos infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS), da cepa Be-78 do *T. cruzi*.

Razão CD4/CD8	TM	TS
AD	2,4	2,6
SI	5,4	21,0

4.1.5.4 - Porcentagem de células T (CD4⁺ e CD8⁺), macrófagos CD14⁺ e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas

Grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas

A partir do número total de células marcadas por IHQ (4078 = 100%) no AD do grupo TM foram definidos os percentuais de cada marcação: 67% (2751) de linfócitos T CD4⁺, 23% (920) de linfócitos T CD8⁺, 9% (360) de macrófagos CD14⁺ e 1% (47) de neutrófilos (Tabela 4).

No SI observou-se um total de 7661 células marcadas por IHQ, sendo o percentual de linfócitos T CD4⁺ 79% (6040), de linfócitos T CD8⁺ 15% (1138), de macrófagos CD14⁺ 5,5% (467) e de neutrófilos 0,5% (16) (Tabela 4).

Grupo infectado por formas tripomastigotas sanguíneas

Do total de células marcadas por IHQ no AD do grupo TS (5616) também foram obtidos os percentuais de cada fenótipo celular: 77% (4334) de linfócitos T CD4⁺, 18% (991) de linfócitos T CD8⁺, 4,5% (291) de macrófagos CD14⁺ e 0,5% (30) de neutrófilos (Tabela 4).

No SI, de um total de 6875 células marcadas por IHQ, verificou-se 87,8% (6028) de linfócitos T CD4⁺, 8% (557) de linfócitos T CD8⁺, 4% (277) de macrófagos CD14⁺ e 0,2% (13) de neutrófilos (Tabela 4).

Tabela 4 – Porcentagem de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), células CD14⁺ (macrófagos) e neutrófilos em relação ao número total de células marcadas no átrio direito e septo interventricular dos animais pertencentes aos grupos controle (C) e infectados por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS).

	Átrio Direito		Sépto interventricular	
	TM % (n)	TS % (n)	TM % (n)	TS % (n)
Total de células marcadas	100 (4078)	100 (5616)	100 (7661)	100 (6875)
CD4 ⁺	67 (2751)	77 (4334)	79 (6040)	87,8 (6028)
CD8 ⁺	23 (920)	18 (991)	15 (1138)	8 (557)
CD4 ⁺ + CD8 ⁺	90 (3671)	95 (5325)	94 (7178)	95,8 (6585)
CD14 ⁺	9 (360)	4,5 (261)	5,5 (467)	4 (277)
Neutrófilos	1 (47)	0,5 (30)	0,5 (16)	0,2 (13)

4.1.6 - Estimativa de células marcadas por imuno-histoquímica considerando a captura realizada de forma aleatória em relação ao número total de núcleos nos cortes corados pela Hematoxilina e Eosina

A Tabela 5 mostra a quantificação de células no AD e SI de animais pertencentes aos grupos C, TM e TS realizada através do somatório de núcleos celulares observados em 15 imagens capturadas de forma aleatória em cortes corados pela HE. Considerando esta quantificação, o processo inflamatório pode ser definido subtraindo-se do número de núcleos celulares observados nos grupos infectados o número de núcleos celulares detectados no grupo C.

Com a quantificação do número de células inflamatórias através da imuno-histoquímica, a definição de inflamação pode ser realizada ajustando-se no grupo C o número de células não inflamatórias, descontando-se do total de núcleos o número de células inflamatórias e só então utilizando este número para avaliar os grupos infectados.

Grupo controle

Na Tabela 5 observa-se que ao subtrair do número total de núcleos celulares no AD do grupo C (12520) o total de células marcadas por IHQ (412), obtêm-se o número de núcleos de células não inflamatórias, em sua maioria miocardiócitos, mas também fibroblastos e células endoteliais, que ocupam a área avaliada. Este número pode ser então definido como padrão para estimar o número de células inflamatórias observadas, de fato, nos grupos infectados. Também pode-se dizer que o número de células marcadas por IHQ observado (412) no grupo C trata-se de células imunes em trânsito no tecido normal.

No SI por sua vez, o número total de núcleos celulares foi igual a 7633 e o número total de células marcadas por IHQ foi 143. Portanto, para esta região cardíaca foi definido 7490 células como sendo a estimativa de células não inflamatórias.

Assim sendo, estes valores foram considerados como o esperado para AD e SI e utilizados para avaliar comparativamente os grupos infectados.

Grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas

Na Tabela 5 observa-se o número total de núcleos celulares no AD do grupo infectado por formas TM (13696) e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) 1148. A partir do número de núcleos de células não inflamatórias do grupo C (12108), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TM, sendo obtida a estimativa de células nesta região (13256). Neste sentido, pode-se inferir que as células inflamatórias não marcadas nesta secção histológica correspondem a 3,2% (440).

No SI observou-se um total de 14927 núcleos celulares do grupo infectado por formas TM e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) 2670. A partir do número de células não inflamatórias do grupo C (7490), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TM, sendo obtida a estimativa de células nesta região (10160). Neste sentido, pode-se inferir que as células inflamatórias não marcadas nesta secção histológica correspondem a 32% (4767).

Grupo infetado por formas tripomastigotas sanguíneas

Na Tabela 5 observa-se o número total de núcleos celulares no AD do grupo infectado por formas TS (24585) e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) 1349. A partir do número de células não inflamatórias do grupo C (12108), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TS, sendo obtida a estimativa de células nesta região (13457). Neste sentido, pode-se inferir que as células inflamatórias não marcadas nesta secção histológica correspondem a 55,2% (11128).

No SI observou-se um total de 21017 núcleos celulares do grupo infectado por formas TS e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) 1637. A partir do número de células não inflamatórias do grupo C (7490), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TS, sendo obtida a estimativa de células nesta região (9127). Neste sentido, pode-se inferir que as células inflamatórias não marcadas nesta secção histológica correspondem a 56,5% (11890).

Tabela 5 - Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios (ENCNI), estimativa celular (EC) e estimativa de células inflamatórias não marcadas (ECINM) no AD e SI de animais pertencentes aos grupos controle (C), infectado por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) realizada a partir do somatório de núcleos celulares (Hematoxilina e Eosina) e de células marcadas (imuno-histoquímica) quantificados em 15 imagens capturadas de forma aleatória.

	Átrio Direito			Septo Interventricular		
	C % (n)	TM % (n)	TS % (n)	C % (n)	TM % (n)	TS % (n)
Total de núcleos (NC)	100 (12520)	100 (13696)	100 (24585)	100 (7633)	100 (14927)	100 (21017)
Células inflamatórias marcadas (CIM)	3 (412)	8 (1148)	6 (1349)	2 (143)	18 (2670)	8 (1637)
Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios (ENCNI)	97 (12108)	88,5 (12108)	49,2 (12108)	98 (7490)	50,2 (7490)	35,6 (7490)
Estimativa celular (EC)	100 (12520)	96,8 (13256)	54,8 (13457)	100 (7633)	68 (10160)	43,5 (9127)
Estimativa de células inflamatórias não marcadas (ECINM)	0 (0)	3,2 (440)	55,2 (11128)	0 (0)	32 (4767)	56,5 (11890)

$ENCNI = NC_c - CIM_c (IHQ)$	$EC_i = ENCNI + CIM_i (IHQ)$	$ECINM_i = NC_i (HE) - EC_i$
------------------------------	------------------------------	------------------------------

4.1.7 - Estimativa de células marcadas por imuno-histoquímica considerando a captura realizada no foco em relação ao número total de núcleos nos cortes corados pela Hematoxilina e Eosina

Grupo controle

A Tabela 6 mostra a quantificação de células no AD e SI de animais pertencentes aos grupos C, TM e TS realizada através do somatório de núcleos celulares observados em 15 imagens capturadas nos focos inflamatórios (TM e TS) em cortes corados pela HE.

Considerando esta quantificação, o processo inflamatório pode ser definido subtraindo-se do número de núcleos celulares observados nos grupos infectados o número de núcleos celulares detectados no grupo C. Com a quantificação do número de células inflamatórias através da imuno-histoquímica, a definição de inflamação pode ser realizada ajustando-se no grupo controle o número de células não inflamatórias, descontando-se do total de núcleos celulares o número de células inflamatórias e só então utilizando este número para avaliar os grupos infectados.

Grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas

Na Tabela 6 observa-se o número total de núcleos celulares no AD do grupo infectado por formas TM (15233) e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) 4078. A partir do número de células não inflamatórias do grupo C (12108), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TM, sendo obtida a estimativa de células nesta região (16186). Dessa forma, verifica-se que a estimativa celular extrapolou o número de núcleos celulares. Neste sentido, pode-se inferir que todas as células inflamatórias presentes nos focos inflamatórios das secções histológicas do AD dos animais infectados por formas TM foram marcadas.

No SI observou-se um total de 25734 núcleos celulares no grupo infectado por formas TM e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) foram 7661. A partir do número de células não inflamatórias do grupo C (7490), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TM, sendo obtida a estimativa de células nesta região (15151). Neste sentido, pode-se inferir que as

células inflamatórias não marcadas nesta secção histológica correspondem a 40% (10538).

Grupo infectado por formas tripomastigotas sanguíneas

Na Tabela 6 observa-se o número total de núcleos celulares no AD do grupo infectado por formas TS (29595) e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) foram 5616. A partir do número de células não inflamatórias do grupo C (12108), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TS, sendo obtida a estimativa de células nesta região (17124). Neste sentido, pode-se inferir as células inflamatórias não marcadas nesta secção histológica 40% (11871).

No SI observou-se um total de 30747 núcleos celulares no grupo infectado por formas TS e o total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + Neutrófilos) foram 6875. A partir do número de células não inflamatórias do grupo C (7490), foi somado o número de células marcadas do grupo infectado por formas TS, sendo obtida a estimativa de células nesta região (14365). Neste sentido, pode-se inferir as células inflamatórias não marcadas nesta secção histológica 53% (16382).

Tabela 6 - Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios (ENCNI), estimativa celular (EC) e estimativa de células inflamatórias não marcadas (ECINM) no AD e SI de animais pertencentes aos grupos controle (C), infectado por formas tripomastigotas metacíclicas (TM) ou sanguíneas (TS) realizada a partir do somatório de núcleos celulares (Hematoxilina e Eosina) e de células marcadas (imuno-histoquímica) quantificados em 15 imagens capturadas do foco inflamatório.

	Átrio Direito			Septo Interventricular		
	C % (n)	TM % (n)	TS % (n)	C % (n)	TM % (n)	TS % (n)
Total de núcleos (NC)	100 (12520)	100 (15233)	100 (29595)	100 (7633)	100 (25734)	100 (30747)
Células inflamatórias marcadas (CIM)	3 (412)	27 (4078)	19 (5616)	2 (143)	30 (7661)	23 (6875)
Estimativa de núcleos celulares não inflamatórios (ENCNI)	97 (12108)	80 (12108)	41 (12108)	98 (7490)	29 (7490)	24 (7490)
Estimativa celular (EC)	100 (12520)	106 (16186)	60 (17124)	100 (7633)	59 (15151)	47 (14365)
Estimativa de células inflamatórias não marcadas (ECINM)	0 (0)	-6 (-953)	40 (11871)	0 (0)	40 (10583)	53 (16382)

$$ENCNI = NC_c - CIM_c (IHQ)$$

$$EC_i = ENCNI + CIM_i (IHQ)$$

$$ECINM_i = NC_i (HE) - EC_i$$

5. Discussão

Neste trabalho padronizou-se a técnica de IHQ para as células T (CD4⁺ e CD8⁺) CD14⁺ e neutrófilos, em diferentes tecidos de cão (coração, baço e linfonodo) fixados em formol e incluídos em parafina. Essa padronização foi aplicada para quantificação das células envolvidas no infiltrado inflamatório do AD e SI de cães infectados por formas TM ou TS da cepa Be-78 do *T. cruzi*, eutanasiados durante a fase aguda.

A escolha do AD baseou-se no fato, desta região cardíaca ser usada rotineiramente para estudos imunopatológicos no modelo canino na DC. Além disso, segundo Rossi, (1998), esta região, juntamente com o ventrículo esquerdo, são as mais afetadas na infecção pelo *T. cruzi*. O SI foi eleito para análise devido a resultados anteriores do nosso laboratório que demonstraram nos modelos de infecção por formas TM e TS, que esta a região cardíaca apresenta maior infiltrado inflamatório (Abreu-Vieira *et al.*, 2009).

As duas formas infectantes utilizadas neste trabalho, TM e TS, apresentam distintas características imunológicas, demonstradas por análises *in vivo* e *in vitro* (Brenner e Gazzinelli, 1997). As glicoproteínas tipo mucinas denominadas glicosilfosfatidilinositol (GPI mucinas) ancoradas na membrana das formas TS, promovem uma potente ativação do sistema imune, diferente do observado naquelas ancoradas em formas TM ou epimastigotas (Camargo *et al.*, 1997a,b; Almeida *et al.*, 2000; Ropert, 2002).

Neste contexto, a análise imunológica da infecção causada por formas TM, que refletem as transmissões causadas diretamente pelos triatomíneos, ou por formas TS, que mimetizam o contágio transfusional, por acidentes de laboratório ou congênito, é importante, justificando plenamente a realização deste trabalho. De fato, as análises dessas duas formas de infecção em um modelo que reflita a clínica observada em humanos poderá contribuir para o melhor entendimento da história natural da doença e de seus mecanismos imunológicos, fenômenos de resistência e patogênese. Neste sentido, extrapolações acerca dos mecanismos envolvidos na geração e manutenção das lesões cardíacas comparando aos demais modelos, murino e rato, bem como à infecção chagásica humana poderão ser estabelecidas.

Neste estudo, verificou-se que no AD dos grupos infectados por formas TM e TS, ocorre um aumento significativo de linfócitos T CD8⁺ em relação ao grupo controle. Também no AD os macrófagos CD14⁺ do grupo infectado por formas TM apresentaram em maior número em relação ao grupo controle. Além disso, no SI,

fragmento com maior infiltrado inflamatório, a quantificação dos linfócitos T CD8⁺ e macrófagos CD14⁺ no grupo infectado por formas TM mostraram em maior número, tanto em relação ao grupo controle quanto ao grupo infectado por formas TS. Chama a atenção à semelhança observada entre o grupo controle e o grupo infectado por formas TS no que diz respeito à quantificação destas células, principalmente no SI.

A ocorrência de um elevado número de linfócitos T CD8⁺ e macrófagos CD14⁺ no miocárdio dos animais do grupo infectado por formas TM em relação ao grupo infectado por formas TS, pode estar diretamente relacionado aos achados de Abreu-Vieira *et al.* (2009), que observaram também no grupo infectado por formas TM níveis elevados de NO sérico, aumento da expressão da iNOS no miocárdio e um menor parasitismo cardíaco. Estes dados sugerem um equilíbrio de resposta no grupo infectado por formas TM se comparado ao grupo infectado por formas TS, visto que a presença de maior número de linfócitos T CD8⁺ e dos macrófagos CD14⁺ parece acionar de melhor modo a maquinaria microbicida anti-*T. cruzi*, considerando o fato do NO ser importante para o controle da infecção durante a fase aguda da DC (Vespa *et al.*, 1994; Aliberti *et al.*, 1996; 1998; Hoft *et al.*, 2000; Martin e Tarleton, 2004; Borges *et al.*, 2009).

Apesar do maior processo inflamatório no grupo infectado por formas TS, isso não contribuiu para o controle da infecção chagásica. Dessa forma, sugere-se que as formas TS possam ativar o sistema imunológico desencadeando uma proliferação distinta da forma TM, mostrando um perfil celular e, provavelmente de citocinas, que pouco contribui para uma ação protetora. Tarleton *et al.*, (1994), verificaram na infecção chagásica aguda e crônica (200 dias após infecção) em camundongos, que receberam anticorpos anti-CD4 e/ou CD8 durante a fase aguda, ocorreu uma redução do processo inflamatório e alto nível de parasitemia. Porém, durante a fase crônica, verificou elevado processo inflamatório e parasitismo. Dentro deste raciocínio, pode-se inferir que o processo inflamatório exacerbado durante a infecção crônica pelo *T. cruzi*, não necessariamente é constituído de linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺.

Nossos resultados mostram que o grupo infectado por formas TM respondeu melhor a infecção pelo *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção. Estes achados se baseiam no balanço dos linfócitos T CD8⁺ e de macrófagos CD14⁺ no infiltrado inflamatório cardíaco. Pelo fato dos macrófagos CD14⁺, frente à infecção pelo *T. cruzi*, terem a capacidade de produzir a IL-12, uma citocina que induz a síntese de IFN- γ pelos linfócitos T CD8⁺ (Cardillo *et al.*, 1996; Costa *et al.*, 2006), mostrando a importância do IFN- γ no controle da infecção pelo *T. cruzi*, durante a fase aguda. Estes eventos

imunológicos estão diretamente ligados a produção e liberação de NO pelos macrófagos, que é uma importante molécula para o controle do parasitismo durante a fase aguda.

A quantificação dos linfócitos T CD4⁺, mostrou que essas células são predominantes no foco inflamatório em ambos os grupos infectados, TM e TS. Ressaltando a sua importância na ativação dos linfócitos T CD8⁺, células CD14⁺ e linfócitos B (Ferraz *et al.*, 2009). Pode-se sugerir que a função destas células é distinto da infecção por formas TM ou TS.

O maior processo inflamatório observado no grupo infectado por formas TS em relação ao grupo infectado por formas TM pode estar relacionado a divergências entre algumas citocinas em ambos os grupos (Figura 10). Entre estas, o TNF- α que é uma citocina importante para o processo de migração celular. A comprovação de altos níveis desta citocina pode levar a forma cardíaca da DC, e, neste sentido, esperam-se altos níveis desta citocina no grupo TS, assim como altos níveis do IFN- γ , pois ambas as citocinas podem estar em níveis exacerbados devido à presença dos linfócitos T CD4⁺ e a baixos níveis da IL-10 (Gomes *et al.*, 2003; Souza *et al.*, 2004). Estes aspectos estão sendo investigados.

Considerando o predomínio de células mononucleares no foco inflamatório, pode-se, ainda, sugerir a presença de células NK devido ao fato dos animais avaliados terem sido eutanasiados durante a fase aguda. Coura-Vital *et al.* (2008) avaliando os mesmos animais que nesta dissertação, verificaram altos níveis séricos das imunoglobulinas no grupo infectado por TS em relação ao grupo infectado por TM. Estes dados sugerem um maior número de linfócitos B no grupo infectado por formas TS em relação ao grupo infectado por formas TM.

Por outro lado, no grupo TM espera-se o encontro de elevados níveis da IL-10, devido ao fato de ser uma citocina regulatória do processo inflamatório (Guedes *et al.*, 2009), podendo ser produzida pelas células CD14⁺. Pode-se ainda esperar níveis de IFN- γ semelhantes aos de IL-10, devido à presença dos linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, sendo que a IL-10 estaria atuando sinergicamente à regulação da produção do IFN- γ (figura 10) (Cardillo *et al.*, 1996).

Esses dados podem implicar divergências na cardiopatia chagásica aguda da infecção por diferentes formas do *T. cruzi*. Sendo que as formas infectantes TS são mais agressoras ao tecido cardíaco e distinto da infecção por formas TM. Analisando a

infecção chagásica por transfusão sanguínea, pode-se surgir um quadro mais grave quando comparado a infecção “natural” pelo *T. cruzi*.

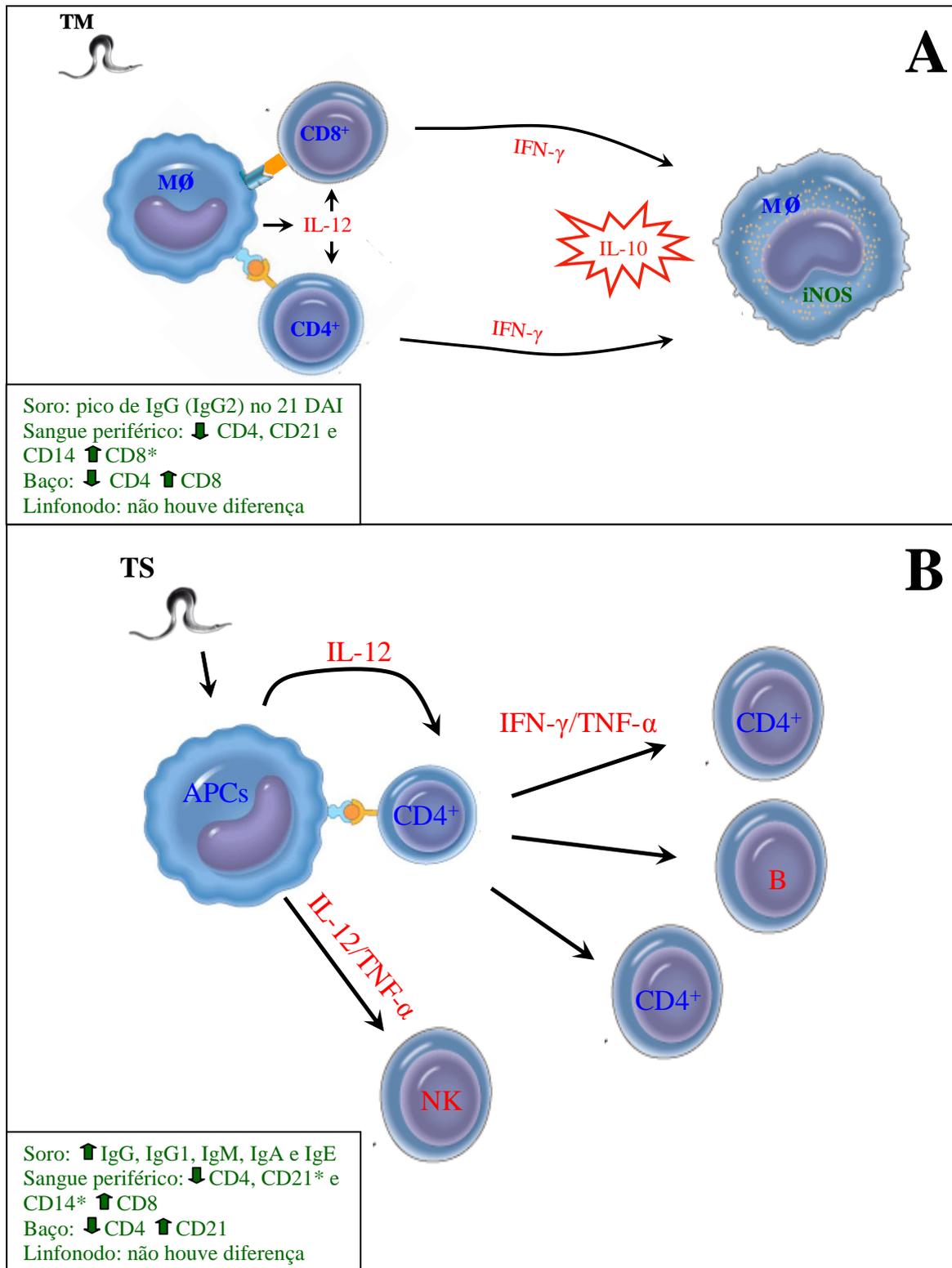


Figura 10 - Resposta imune no tecido cardíaco de cães após infecção por formas tripomastigotas metacíclicas-TM (A) ou sanguíneas-TS (B) da cepa Berenice 78 do *Trypanosoma cruzi* eutanasiados durante a fase aguda. Texto em branco indica informações obtidas nesta dissertação; em verde, dados obtidos em nosso laboratório até o momento e em vermelho, hipótese gerada a partir de todos os resultados. ↑ : indica aumento; ↓ : indica redução; * diferença entre TM e TS.

Caliari *et al.* (2002) investigando os aspectos imunopatológicos no AD de cães infectados por formas TM do *T. cruzi*, pela via conjuntival, durante a fase aguda da infecção (33 dias após inóculo), observou um predomínio dos linfócitos T CD8⁺ 58% em relação aos linfócitos T CD4⁺ 42% no AD. Estes resultados corroboram com este estudo, visto que foi observado no AD 62% de linfócitos T CD8⁺ *versus* 19% de linfócitos T CD4⁺. Entretanto, nas análises do SI de cães infectados pelas formas TM ou TS não foi verificado um predomínio de linfócitos T CD8⁺. Neste fragmento ocorre um aumento dos linfócitos T CD4⁺, porém não significativo, sendo que estes achados foram obtidos pela análise da forma de captura de imagens aleatória. Contudo, a quantificação dos linfócitos T CD8⁺ no grupo TM foi significativamente diferente do grupo infectado por formas TS, podendo este fato implicar em uma melhor resposta para o grupo infectado por formas TM. Estudos do fígado de camundongos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, revelaram que os linfócitos T CD8⁺ e os linfócitos T CD4⁺ são essenciais para o controle da infecção pelo *T. cruzi* (Sardinha *et al.*, 2006).

Considerando que a ação do IFN- γ e das perforinas é crítica para a sobrevivência de camundongos (Tzelepis *et al.*, 2006) o papel dos linfócitos T CD8⁺ foi evidenciado em diversos estudos que demonstraram a inabilidade do controle da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos KO para esta célula (revisado por Martin e Tarleton, 2004; Padilla *et al.*, 2009). Entretanto, os linfócitos T CD4⁺ são essenciais para o recrutamento, diferenciação e ativação dos linfócitos T CD8⁺ e B, assim como na produção de anticorpos e citocinas, tais como o IFN- γ (Ferraz *et al.*, 2009). Estudos realizados por Rottenberg *et al.* (1993 e 1995a,b) demonstram que a depleção dos linfócitos T CD4⁺ aumenta os níveis de parasitemia e da taxa de mortalidade em camundongos infectados pelo *T. cruzi*.

Alguns trabalhos vêm demonstrando o papel do sistema imune inato frente à infecção pelo *T. cruzi*. A importância das células natural killer (NK) para a produção do IFN- γ tem sido evidenciada (Cardillo *et al.*, 1996). Os macrófagos e células dendríticas através de receptores “Toll-like” (TLR) podem desencadear a resposta contra o *T. cruzi* através de duas rotas de sinalização, uma dependente do gene da resposta primária para a diferenciação mielóide (MyD88) e outra através de uma rota independente de Myd88, contendo domínio que induz o IFN- β (TRIF). Estudos em camundongos Myd88^{-/-} e TRIF^{-/-} sugerem a dependência de ambas as rotas para a resistência à infecção pelo *T. cruzi*, devido ao fato da primeira estar ligada a indução de citocinas inflamatórias como

IL-12 e TNF- α , sendo que a segunda via atua na indução do interferon tipo I ($\alpha\beta$ IFN) (Koga *et al.*, 2006; Tarleton, 2007).

Os constituintes do processo inflamatório na DC são diversos. Estudos por IHQ em roedores revelaram que os linfócitos T CD8⁺ são predominantes na miocardite chagásica aguda (Sun e Tarleton, 1993). Em outro trabalho, mostraram que os neutrófilos estão em maior número e entre os linfócitos, os linfócitos T CD4⁺ predominam (Younès-Chennoufi *et al.*, 1988). Em contraste, no modelo rato, os linfócitos T CD8⁺ e/ou células NK são predominantes no infiltrado celular (Sato *et al.*, 1992). Já na miocardite chagásica humana, os linfócitos T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺ são encontrados em similares proporções (Fuenmayor *et al.*, 2005).

Comparando as duas formas de aquisição de imagens, aleatória e focal, verificou-se que quando é analisado o número de células obtidas de forma focal, esta distingue melhor as proporções de células marcadas no fragmento do AD em relação ao SI dentro do mesmo grupo de infecção, sendo significativa a diferença entre os números de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, dado não obtido durante a análise das imagens de forma aleatória.

Estudos referentes à quantificação celular *in situ* adotam como critério, somente as marcações celulares obtidas pela IHQ no parênquima estudado. Porém, neste trabalho, na tentativa de identificar as proporções celulares presentes no infiltrado inflamatório, tomaram-se como padrão o grupo controle, o qual extrapolou-se o número de células não inflamatórias para os animais infectados, na tentativa de inferir o número de células inflamatórias e definir as proporções do fenótipo celular obtidos por IHQ, assim como as células inflamatórias não marcadas.

Neste sentido, observaram-se discrepâncias em relação ao total de células marcadas por IHQ (CD4 + CD8 + CD14 + neutrófilos) e o total de células inflamatórias não marcadas. Sendo que esta última apresenta um percentual celular alto em relação aquela, em ambos os métodos de captura de imagens, aleatório ou focal. Com a finalidade de identificar e resolver este problema fez-se necessárias diluições sucessivas e mais concentradas de anticorpos primários, no intuito de identificar diluições específicas para cada animal, devido ao alto ou baixo processo inflamatório. Neste contexto, verificou-se que não houve diferenças na quantificação celular para diferentes diluições dos anticorpos primários, apenas um aumento do *background*.

Na tentativa de identificar as principais células envolvidas na miocardite chagásica aguda ou crônica por IHQ, alguns estudos têm demonstrado a importância

dos linfócitos T (Higuchi *et al.*, 1993; Reis *et al.*, 1993; Machado *et al.*, 2005). Entretanto, não há uma preocupação em relação à identificação das proporções de células inflamatórias marcadas em relação às células inflamatórias não marcadas. Reis *et al.*, (2000) e Caliari *et al* (2002) realizaram uma análise qualitativa no tecido cardíaco do processo inflamatório e uma análise quantitativa das células marcadas por IHQ de humanos e cães chagásicos, respectivamente. Paciello *et al.*, (2009) avaliaram a miopatia inflamatória canina associada a infecção por *Leishmania infantum*, descreve o processo inflamatório e distingue o fenótipo celular de forma qualitativa, assim como Neumann e Bilzer (2005) analisando miosite do músculo mastigatório de cães. Neste contexto, diversos trabalhos têm colocado como principal ponto a identificação das células marcadas por IHQ presentes no infiltrado inflamatório, sem a preocupação de identificar suas proporções em relação ao total de células presentes no infiltrado (Elwood *et al.*, 1997; Wunschmann *et al.*, 1999; Rossi *et al.*, 2000; Lemburg *et al.*, 2004; Handl *et al.*, 2009; Medeiros *et al.*, 2009).

Com a finalidade de apontar as principais células envolvidas na miocardite chagásica aguda em suas proporções em relação ao total de células inflamatórias, percebeu-se que mesmo com o alto número de células não marcadas, os dados obtidos apresentaram diferenças entre os grupos. Este achado, aqui revelado pode ter implicações futuras na quantificação das células inflamatórias, visto que há grande importância em identificar as principais células inflamatórias presentes no parênquima, advindo de uma infecção, mas não obstante, existe a necessidade de inferir o total de leucócitos em um processo inflamatório, assim como as devidas taxas das células ali presentes, marcadas ou não por IHQ.

German *et al.* (1999) realizaram um estudo quantitativo dos leucócitos presentes nas diferentes regiões do intestino de cães. Ao comparar o total de células presentes no parênquima intestinal com o total de leucócitos identificados por colorações histoquímicas (células do plasma, células do estoma, eosinófilos e mastócitos) e IHQ (linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺), percebe-se que as proporções dos leucócitos em estudo variaram de 21 a 49% em relação ao total de células presentes nas regiões estudadas. Partindo do princípio que o trato digestório é um local de porta de entrada de diversos antígenos, pode-se esperar alto número de leucócitos, quando comparado a outros órgãos. Estes dados corroboram com os resultados obtidos nesta dissertação visto que, tanto na análise focal quanto aleatória, observou-se que as marcações IHQ variaram entre 6 a 30% em relação ao total de núcleos celulares presentes no tecido cardíaco.

6. Conclusões

- Análise de forma aleatória:
 - Verificou maior número de linfócitos T CD8⁺ nos grupos infectados em relação ao grupo controle no átrio direito;
 - Mostrou maior número de linfócitos T CD8⁺ no grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas em relação ao grupo infectado por formas tripomastigotas sanguíneas e grupo controle no septo interventricular;
 - Constatou maior número de células CD14⁺ no grupo infectados por formas tripomastigotas metacíclicas em relação ao grupo controle no átrio direito;
 - Apontou maior número de células CD14⁺ no grupo infectado por formas tripomastigotas metacíclicas em relação ao grupo infectado por formas tripomastigotas sanguíneas e controle no septo interventricular;
 - Observou diferenças entre os compartimentos cardíacos (átrio direito e septo interventricular) na quantificação dos linfócitos T CD8⁺ no grupo infectado por formas tripomastigotas sanguíneas;
 - Distingue melhor as diferenças entre os grupos infectados.

- Análise de foram focal:
 - Mostrou predomínio de linfócitos T CD4⁺ no infiltrado inflamatório agudo de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas sanguíneas, tanto no átrio direito quanto no septo interventricular.
 - Apontou reduzido número de neutrófilos no infiltrado inflamatório agudo de cães infectados por formas tripomastigotas metacíclicas e tripomastigotas sanguíneas, tanto no átrio direito quanto no septo interventricular.
 - Distingue melhor as diferenças entre os fragmentos (átrio direito e septo interventricular), dentro do mesmo grupo de infecção.

7. Referências Bibliográficas

Aasted, B.; Blixenkroner-Møller, M.; Larsen, E.B.; Bielefeldt Ohmann, H.; Simesen, R.B. e Uttenthal, A. (1988). Reactivity of eleven anti-human leucocyte monoclonal antibodies with lymphocytes from several domestic animals. *Veterinary immunology and immunopathology* Jul. v. 19(1), p. 31-38.

Abreu-Vieira, P.M.; Francisco, A.F.; Souza, S.M.; Malaquias, L.C.; Reis, A.B.; Giunchetti, R.C.; Veloso, V.M.; Lana, M.; Tafuri, W.L. e Carneiro, C.M. (2009). *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. *Exp Parasitol.* v. 121(1), p. 76-82.

Aliberti, J.C.; Cardoso, M.A.; Martins, G.A.; Gazzinelli, R.T.; Vieira, L.Q.; Silva, J.S.; (1996). Interleukin-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection and immunity* Jun. v. 64(6), p. 1961-1967.

Aliberti, J.C.; Machado, F.S.; Gazzinelli, R.T.; Teixeira, M.M.; Silva, J.S.; (1999). Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infection and immunity* Jun. v. 67(6), p. 2810-2814.

Almeida, E.A.; Silva, E.L.; Guariento, M.E.; Souza, M.L.; Aoki, F.H. e Pedro, R.J. (2009). Fatal evolution of Chagas'disease/Aids co-infection: diagnostic difficulties between myocarditis reactivation and chronic chagasic cardiomyopathy. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* Mar-Apr. v. 42(2), p. 199-202.

Almeida, I.C.; Camargo, M.M.; Procopio, D.O.; Silva, L.S.; Mehlert, A.; Travassos, L.R.; Gazzinelli, R.T. e Ferguson, M.A.J. (2000). Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *Embo J.* v. 3;19(7), p. 1476-1485.

Andrade, Z.A. e Andrade, S.G. (1980). Pathology of experimental Chagas disease in dogs]. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz* . v. 75(3-4), p. 77-95.

Andrade, S.G.; Pimentel, A.R.; Souza, M.M. e Andrade, Z.A. (2000). Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg.* v. 63, p. 64-70

Andrews, N.W. (1995). Lysosome recruitment during host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Trends Cell Biol.* v. 5(3), p. 133-137.

Araujo-Jorge, T.C.; Waghbi, M.C.; Soeiro, M.N.; Keramidas, M.; Bailly, S. e Feige, J.J. (2008). Pivotal role for TGF-beta in infectious heart disease: The case of *Trypanosoma cruzi* infection and consequent Chagasic cardiomyopathy. *Cytokine & growth factor reviews.* v. 19(5-6), p 405-413.

Araya, J.E.; Cano, M.I.; Yoshida, N. e da Silveira, J.F. (1994) Cloning and characterization of a gene for the stage-specific 82-kDa surface antigen of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol.* v. 65(1), p. 161-169.

Bahia, M.T.; Tafuri, W.L.; Caliari, M.V.; Veloso, V.M.; Carneiro, C.M.; Coelho, G.L. e Lana, M. (2002). 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*. v. 35(4), p. 339-345.

Bambirra, E.A. (1982). 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.

Bastos, K.R.; Marinho, C.R.; Barboza, R.; Russo, M.; Alvarez, J.M. e D'Imperio Lima, M.R. (2004). What kind of message does IL-12/IL-23 bring to macrophages and dendritic cells? *Microbes and infection / Institut Pasteur*. v. 6(6), p. 630-636.

Ben Younes-Chennoufi, A.; Said, G.; Eisen, H.; Durand, A. e Hontebeyrie-Joskowicz, M. (1988). Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4⁺). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v. 82(1), p. 84-89.

Borges, C.R.; Rodrigues Junior, V.; dos Reis, M.A.; Castellano, L.R.; Chica, J.E.; Pereira, S.A.; Santos, E.S. e Rodrigues, D.B.R. (2009). 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*. v. 42(2), p. 170-174.

Breaux, C.B.; Sandmeyer, L.S. e Grahn, B.H. (2007). Immunohistochemical investigation of canine episcleritis. *Vet Ophthalmol*. v. 10(3), p. 168-172.

Brener, Z. (1973). Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol*. v. 27, p. 347-382.

Brener, Z. e Chiari, E. Morphological Variations Observed in Different Strains of *Trypanosoma cruzi*. (1963). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. v. 19, p. 220-224.

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

Burleigh, B.A. (2005). Host cell signaling and *Trypanosoma cruzi* invasion: do all roads lead to lysosomes? *Sci STKE*. v. 2005(293), p. 36.

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

Burleigh, B.A. e Andrews, N.W. (1995b). The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annu Rev Microbiol*. v. 49, p. 175-200.

Burleigh, B.A. e Andrews, N.W. (1998). Signaling and host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Microbiol.* v. 1(4), p. 461-465.

Burleigh, B.A.; Caler, E.V.; Webster, P. e Andrews, N.W. (1997). A cytosolic serine endopeptidase from *Trypanosoma cruzi* is required for the generation of Ca²⁺ signaling in mammalian cells. *J Cell Biol.* v. 136(3), p. 609-620.

Caler, E.V.; Morty, R.E.; Burleigh, B.A. e Andrews, N.W. (2000). Dual role of signaling pathways leading to Ca(2⁺) and cyclic AMP elevation in host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *Infection and immunity.* v. 68(12), p. 6602-6610.

Caliari, M.V.; Lana, M.; Caja, R.A.; Carneiro, C.M.; Bahia, M.T.; Santos, C.A.B.; Magalhães, A.M.; Sampaio, I.B.M. e Tafuri, W.L. (2002). Immunohistochemical studies in acute and chronic canine chagasic cardiomyopathy. *Virchows Arch.* v. 441(1), p. 69-76.

Caliari, M.V.; Lana, M.; Caliari, E.R. e Tafuri, W. L. (1995). Cardiac plexus of dogs experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: inflammatory lesions and quantitative studies. *Rev Soc Bras Med Trop.* v. 28, p. 13-17.

Camargo, M.M.; Almeida, I.C.; Pereira, M.E.; Ferguson, M.A.; Travassos, L.R. e Gazzinelli, R.T. (1997). Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes initiate the synthesis of proinflammatory cytokines by macrophages. *J Immuno.* v,158 (12), p. 5890-5901

Camargo, M.M.; Andrade, A.C.; Almeida, I.C.; Travassos, L.R. e Gazzinelli, R.T. (1997). Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. *J Immunol.* v. 159(12), p. 6131-6139.

Castro, M.B.; Machado, R.Z.; de Aquino, L.P.; Alessi, A.C. e Costa, M.T. (2004). Experimental acute canine monocytic ehrlichiosis: clinicopathological and immunopathological findings. *Veterinary parasitology.* v. 119(1), p. 73-86.

Cardillo, F.; Voltarelli, J.C.; Reed, S.G. e Silva, J.S. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and immunity.* v. 64(1), p. 128-134.

Cardoso, A.V.; Lescano, S.A.; Amato Neto, V.; Gakiya, E. e Santos, S.V. (2006). 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.

Carneiro, C.M.; Martins-Filho, O.A.; Reis, A.B.; Veloso, V.M.; Araujo, F.M.; Bahia, M.T.; Lana, M.; Machado-Coelho, G.L.L.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R. e Tafuri, W.L. (2007). Differential impact of metacyclic and blood trypomastigotes on parasitological, serological and phenotypic features triggered during acute *Trypanosoma cruzi* infection in dogs. *Acta Trop.* v. 101(2), p. 120-129.

Chagas, C. (1909). 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.

Centers for Disease Control and Prevention. (2009). Division of Parasitic Diseases, National Center for Zoonotic, Vector-Borne, and Enteric Diseases. 1600 Clifton Rd. Atlanta, GA 30333, USA.

Centers for Disease Control and Prevention. (2007). Blood Donor Screening for Chagas Disease. v. 56(07), p. 141-143. 1600 Clifton Rd. Atlanta, GA 30333, USA

Cobbold, S. e Metcalfe, S. (1994). Monoclonal antibodies that define canine homologues of human CD antigens: summary of the First International Canine Leukocyte Antigen Workshop (CLAW). Tissue antigens. v. 43(3), p. 137-154.

Coons, A.H.; Creech, H.J e Jones, R.N. (1941). Immunological properties of an antibody containing a fluorescent group. Proc. Xoc. Exp. Biol. Med. v. 47, p. 200.

Costa, V.M.; Torres, K.C.; Mendonca, R.Z.; Gresser, I.; Gollob, K.J. e Abrahamsohn, I.A. (2006). Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. J Immunol. v. 177(5), p. 3193-3200.

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

Coura, J.R. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 39 Suppl 3, p. 113-117.

Coura, J.R.; Junqueira, A.C.; Boia, M.N.; Fernandes, O.; Bonfante, C.; Campos, J.E.; Santos, L. e Devera, R. (2002a). Chagas disease in the Brazilian Amazon: IV. a new cross-sectional study. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo. v. 44(3), p. 159-165.

Coura, J.R.; Junqueira, A.C.; Fernandes, O.; Valente, S.A. e Miles, M.A. (2002b). Emerging Chagas disease in Amazonian Brazil. Trends Parasitol. v. 18(4), p. 171-176.

Coura-Vital, W.; Carneiro, C.M.; Martins, H.R.; Lana, M.; Veloso, V.M.; Teixeira-Carvalho, A.; Bahia, M.T.; Correa-Oliveira, R.; Martins-Filho, O.A.; Tafuri, W.L. e Reis, A.B. (2008). *Trypanosoma cruzi*: immunoglobulin isotype profiles during the acute phase of canine experimental infection with metacyclic or blood trypomastigotes. Exp Parasitol. v. 120(3), p. 269-274.

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

Cunha-Neto, E.; Coelho, V.; Guilherme, L.; Fiorelli, A.; Stolf, N. e Kalil, J. (1996). Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma*

cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. v. 98(8), p. 1709-1712.

Docampo, R.; Scott, D.A.; Vercesi, A.E. e Moreno, S.N. (1995). Intracellular Ca²⁺ storage in acidocalcisomes of *Trypanosoma cruzi*. Biochem J. v. 310 (Pt 3), p. 1005-1012.

Dorta, M.L.; Ferreira, A.T.; Oshiro, M.E. e Yoshida, N. (1995). Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. Mol Biochem Parasitol. v. (1-2), p. 285-289.

Downward, J. (2004). PI 3-kinase, Akt and cell survival. Semin. Cell Dev. Biol. v. 15, p. 177-182

Doveren, R.F.; Buurman, W.A.; Schutte, B.; Groenewegen, G. e van der Linden, C.J. (1985). Class II antigens on canine T lymphocytes. Tissue antigens. v. 25(5), p. 255-265.

Dutra, W.O.; Gollob, K.J.; Pinto-Dias, J.C.; Gazzinelli, G.; Correa-Oliveira, R.; Coffman, R.L. e Carvalho-Parra, J.F. (1997). Cytokine mRNA profile of peripheral blood mononuclear cells isolated from individuals with *Trypanosoma cruzi* chronic infection. Scandinavian journal of immunology. v. 45(1), p. 74-80.

Elwood, C.M.; Hamblin, A.S. e Batt, R.M. (1997). Quantitative and qualitative immunohistochemistry of T cell subsets and MHC class II expression in the canine small intestine. Veterinary immunology and immunopathology. v. 58(3-4), p. 195-207.

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

Ferreira, D.; Cortez, M.; Atayde, V.D. e Yoshida, N. (2006). Actin cytoskeleton-dependent and -independent host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is mediated by distinct parasite surface molecules. Infection and immunity. v. 74(10), p. 5522-5528.

Ferrer, L.; Fondevila, D.; Rabanal, R. e Ramis, A. (1992). Detection of T lymphocytes in canine tissue embedded in paraffin wax by means of antibody to CD3 antigen. Journal of comparative pathology. v. 106(3), p. 311-314.

Frost, A.R.; Sparks, D. e Grizzle, W.E. (2000). Methods of antigen recovery vary in their usefulness in unmasking specific antigens in immunohistochemistry. Appl Immunohistochem Mol Morphol. v. 8(3), p. 236-243.

Fuenmayor, C.; Higuchi, M.L.; Carrasco, H.; Parada, H.; Gutierrez, P.; Aiello, V. e Palomino, S. (2005). Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with *T. cruzi* parasitic antigens. Acta cardiologica. v. 60(1), p. 33-37.

Gascon, J.; Albajar, P.; Canas, E.; Flores, M.; Gomez, i. Prat, J.; Herrera, R.N.; Lafuente, C. A.; Luciardi, H.L.; Moncayo, A.; Molina, L.; Munoz, J.; Puente, S.; Sanz, G.; Trevino, B. e Sergio-Salles, X. (2007). Diagnosis, management and treatment of chronic Chagas' heart disease in areas where *Trypanosoma cruzi* infection is not endemic]. *Rev Esp Cardiol.* v. 60(3), p. 285-293.

Gebhard, D.H. e Carter, P.B. (1992). Identification of canine T-lymphocyte subsets with monoclonal antibodies. *Veterinary immunology and immunopathology.* v. 33(3), p. 187-199.

German, A.J.; Hall, E.J. e Day, M.J. (1999). Analysis of leucocyte subsets in the canine intestine. *Journal of comparative pathology.* v. 120(2), p. 129-145.

Giordano, R.; Fouts, D.L.; Tewari, D.; Colli, W.; Manning, J.E. e Alves, M.J. (1999). Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem.* v. 274(6), p. 3461-3468.

Gofflot, S.; Kischel, P.; Thielen, C.; Radermacher, V.; Boniver, J. e de Leval, L. (2008). Characterization of an antibody panel for immunohistochemical analysis of canine muscle cells. *Veterinary immunology and immunopathology.* v. 125(3-4), p. 225-233.

Gomes, J.A.; Bahia-Oliveira, L.M.; Rocha, M.O.; Martins-Filho, O.A. Gazzinelli, G. e Correa-Oliveira R. (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infection and immunity.* v. 71(3), p. 1185-1193.

Green, L.C., Wagner, D.A., Glogowski, J., Skipper, P.L., Wishnok, J.S. e Tannenbaum, S.R. (1982). Analysis of nitrate, nitrite and 15N nitrate in biological fluids. *Anal biochem.* v. 126, p. 131-138.

Greenlee, P.G.; Calvano, S.E.; Quimby, F.W. e Hurvitz, A.I. (1987). Investigation of cross-reactivity between commercially available antibodies directed against human, mouse, and rat lymphocyte surface antigens and surface markers on canine cells. *Vet Immunol Immunopathol.* v. 15(4), p. 285-296.

Grellier, P.; Vendeville, S.; Joyeau, R.; Bastos, I.M.; Drobecq, H.; Frappier, F.; Teixeira, A.R.; Schrevel, J.; Davioud-Charvet, E.; Sergheraert, C. e Santana, J.M. (2001). *Trypanosoma cruzi* prolyl oligopeptidase Tc80 is involved in nonphagocytic mammalian cell invasion by trypomastigotes. *J Biol Chem.* v. 276(50), p. 47078-47086.

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. (2009). Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. *Veterinary immunology and immunopathology.* v. 130(1-2), p. 43-52.

Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Caliari, M.V.; Carneiro, C.M.; Souza, S.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Bahia e M.T. Galvão, L.M.C. (2007). *Trypanosoma cruzi* high infectivity in

vitro is related to cardiac lesions during long-term infection in Beagle dogs. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*. v. 102(2), p. 141-147.

Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Gollob, K.J.; Afonso, L.C.; Caldas, I.S.; Vianna, P.; Lana, M.; Chiari, E.; Bahia, M.T. e Galvao, L.M. (2008). IgG isotype profile is correlated with cardiomegaly in Beagle dogs infected with distinct *Trypanosoma cruzi* strains. *Veterinary immunology and immunopathology*. v. 124(1-2), p. 163-168.

Guedes, P.M.; Veloso, V.M.; Tafuri, W.L.; Galvao, L.M.; Carneiro, C.M.; Lana, M.; Chiari, E.; Ataíde Soares, K. e Bahia, M.T. (2002). The dog as model for chemotherapy of the Chagas' disease. *Acta Trop*. v. 84(1), p. 9-17.

Guimarães, A.C. (1997). Cardiopatia crônica: insuficiência cardíaca. Em: Dias, J.C.P., Coura, J.R. (eds). *Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral*. Fiocruz. P. 223-236. Rio de Janeiro.

Handl, S.; Wehr, U.; Zentek, J. e Krammer-Lukas, S. (2009). Histological and immunohistochemical evaluation of duodenal and colonic biopsies after oral bovine lactoferrin supplementation in beagle puppies. *Journal of animal physiology and animal nutrition*. v. 93(1), p. 76-82.

Higuchi, M.L. (1995). Chagas disease. Importance of the parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease. *Arq Bras Cardiol*. v. 64(3), p. 251-254.

Higuchi, M.L.; Benvenuti, L.A.; Martins Reis, M. e Metzger, M. (2003). Pathophysiology of the heart in Chagas' disease: current status and new developments. *Cardiovasc Res*. v. 60(1), p. 96-107.

Higuchi, M.L.; Gutierrez, P.S.; Aiello, V.D.; Palomino, S.; Bocchi, E.; Kalil, J.; Bellotti, G. e Pileggi, F. (1993). Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol*. v. 423(3), p. 157-160.

Higuchi, M.D.; Ries, M.M.; Aiello, V.D.; Benvenuti, L.A.; Gutierrez, P.S.; Bellotti, G. e Pileggi, F. (1997). Association of an increase in CD8⁺ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg*. v. 56, p. 485-489.

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

Koberle, F. (1956). Neurotoxin of *Trypanosoma cruzi*. *Zentralblatt fur allgemeine Pathologie und pathologische Anatomie*. v. 95(9-10), p. 468-475.

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

Koga, R.; Hamano, S.; Kuwata, H.; Atarashi, K.; Ogawa, M.; Hisaeda, H.; Yamamoto, M.; Akira, S.; Himeno, K.; Matsumoto, M. e Takeda, K. (2006). TLR-dependent

induction of IFN-beta mediates host defense against *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. v. 177(10), p. 7059-7066.

Lana, M. e Chiari C.A. (1986). Comparative biological characterization of Berenice-62 and Berenice-78 strains of *Trypanosoma cruzi* isolated from the same patient at different times. Memorias do Instituto Oswaldo Cruz. v. 81(3), p. 247-253.

Lana, M.; Chiari, E. e Tafuri, W.L. (1992). Experimental Chagas' disease in dogs. Mem Inst Oswaldo Cruz. v. 87(1), p. 59-71.

Laranja, F.S. (1953). Clinical aspects of Chagas' disease.]. Revista brasileira de medicina. v. 10(7), p. 482-491.

Lemburg, A.K.; Meyer-Lindenberg, A. e Hewicker-Trautwein, M. (2004). Immunohistochemical characterization of inflammatory cell populations and adhesion molecule expression in synovial membranes from dogs with spontaneous cranial cruciate ligament rupture. Veterinary immunology and immunopathology. v. 97(3-4), p. 231-240.

Lieke, T.; Graefe, S.E.; Klauenberg, U.; Fleischer, B. e Jacobs, T. (2004). NK cells contribute to the control of *Trypanosoma cruzi* infection by killing free parasites by perforin-independent mechanisms. Infection and immunity. v. 72(12), p. 6817-6825.

Lieke, T.; Steeg, C.; Graefe, S.E.; Fleischer, B. e Jacobs, T. (2006). Interaction of natural killer cells with *Trypanosoma cruzi*-infected fibroblasts. Clin Exp Immunol. v. 145(2), p. 357-364.

Machado, F.S.; Koyama, N.S.; Carregaro, V.; Ferreira, B.R.; Milanezi, C.M.; Teixeira, M.M.; Rossi, M.A. e Silva, J.S. (2005). CCR5 plays a critical role in the development of myocarditis and host protection in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. J Infect Dis. v. 191(4), p. 627-636.

Magdesian, M.H.; Giordano, R.; Ulrich, H.; Juliano, M.A.; Juliano, L.; Schumacher, R.I.; Colli, W. e Alves, M.J. (2001). Infection by *Trypanosoma cruzi*. Identification of a parasite ligand and its host cell receptor. J Biol Chem. v. 276(22), p. 19382-19389.

Malaga, S. e Yoshida, N. (2001). Targeted reduction in expression of *Trypanosoma cruzi* surface glycoprotein gp90 increases parasite infectivity. Infection and immunity. v. 69(1), p. 353-359.

Maltos, K.L., Menezes, G.B., Caliari, M.V., Rocha, O.A., Santos, J.M., Alves, D.L., Duarte, I.D., Francischi, J.N., 2004. Vascular and cellular responses to pro-inflammatory stimuli in rat dental pulp. Arch. Oral Biol. v. 49, p. 443-450.

Martin, D. e Tarleton, R. (2004). Generation, specificity, and function of CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. Immunol Rev. v. 201, p. 304-317.

Medeiros, G.A.; Silverio, J.C.; Marino, A.P.; Roffe, E.; Vieira, V.; Kroll-Palhares, K.; Carvalho, C.E.; Silva, A.A.; Teixeira, M.M. e Lannes-Vieira, J. (2009). Treatment of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected mice with a CCR1/CCR5 antagonist (Met-

RANTES) results in amelioration of cardiac tissue damage. *Microbes and infection / Institut Pasteur*. v. 11(2), p. 264-273.

Melo, R.C. (2009). Acute heart inflammation: ultrastructural and functional aspects of macrophages elicited by *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of cellular and molecular medicine*. v. 13(2), p. 279-294.

Ming, M.; Ewen, M.E. e Pereira, M.E. (1995). Trypanosome invasion of mammalian cells requires activation of the TGF beta signaling pathway. *Cell*. v. 82(2), p. 287-296.

Minoprio, P. (2001). Parasite polyclonal activators: new targets for vaccination approaches? *Int J Parasitol*. v. 31(5-6), p. 588-591.

Minoprio, P.; Bandeira, A.; Pereira, P.; Mota Santos, T. e Coutinho, A. (1989). Preferential expansion of Ly-1 B and CD4- CD8- T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. *Int Immunol*. v. 1(2), p. 176-184.

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

Moore, P.F.; Rossitto, P.V.; Danilenko, D.M.; Wielenga, J.J.; Raff, R.F. e Severns E. (1992). Monoclonal antibodies specific for canine CD4 and CD8 define functional T-lymphocyte subsets and high-density expression of CD4 by canine neutrophils. *Tissue antigens*. v. 40(2), p. 75-85.

Morato, M.J.; Colley, D.G. e Powell, M.R. (1998). Cytokine profiles during experimental Chagas' disease. *Braz J Med Biol Res*. v. 31(1), p. 123-125.

Muller, U.; Sobek, V.; Balkow, S.; Holscher, C.; Mullbacher, A.; Museteanu, C.; Mossmann, H. e Simon, M.M. (2003). 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. *Eur J Immunol*. v. 33(1), p. 70-78.

Neira, I.; Ferreira, A.T. e Yoshida, N. (2002). Activation of distinct signal transduction pathways in *Trypanosoma cruzi* isolates with differential capacity to invade host cells. *Int J Parasitol*. v. 32(4), p. 405-414.

Neumann, J. e Bilzer, T. (2006). Evidence for MHC I-restricted CD8⁺ T-cell-mediated immunopathology in canine masticatory muscle myositis and polymyositis. *Muscle & nerve*. v. 33(2), p. 215-224.

Noireau, F.; Diosque, P. e Jansen, A.M. (2009). *Trypanosoma cruzi*: adaptation to its vectors and its hosts. *Vet Res*. v. 40(2)p. 26.

O'Garra, A. (1998). Cytokines Induce the Development of Functionally Heterogeneous T Helper Cell Subsets. *Immunity*. v. 8, p. 275-283,

Pacheco, C.M.; Queiroz, C.M.Jr.; Maltos, K.L.; Caliari, M.V.; Rocha, O.A. e Francischi, J.N. (2007). Local opioids in a model of periodontal disease in rats. *Archives of oral biology*. v. 52(7), p. 677-683.

Paciello, O.; Oliva, G.; Gradoni, L.; Manna, L.; Manzillo, V.F.; Wojcik, S.; Trapani, F. e Papparella, S. (2009). Canine inflammatory myopathy associated with *Leishmania Infantum* infection. *Neuromuscul Disord*. v. 19(2), p. 124-130.

Padilla, A.M.; Bustamante, J.M. e Tarleton, R.L. (2009). CD8⁺ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Curr Opin Immunol*. v. 21(4), p. 385-390.

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

Papadogiannakis, E. I. Koutinas, A. F. Saridomichelakis, M. N. Vlemmas, J. Lekkas, S. Karameris, A. Fytianou, A. (2005). Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol*. v. 104, p. 227-237.

Parada, H.; Carrasco, H.A.; Anez, N.; Fuenmayor, C. e Inglessis, I. (1997). Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study. *International journal of cardiology*. v. 60(1), p. 49-54.

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

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

Prata, A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*. v. 1(2), p. 92-100.

Puigbó, J.J., Acquatella, H., Giordano, H. e Suárez, C. (1993). 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.

Rabanal, R.M.; Ferrer, L. e Else, R.W. (1995). Immunohistochemical detection of canine leucocyte antigens by specific monoclonal antibodies in canine normal tissues. *Veterinary immunology and immunopathology*. v. 47(1-2), p. 13-23.

Ramirez, M.I.; Ruiz, R.C.; Araya, J.E.; Da Silveira, J.F. e Yoshida, N. (1993). Involvement of the stage-specific 82-kilodalton adhesion molecule of *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes in host cell invasion. *Infection and immunity*. v. 61(9), p. 3636-3641.

Ramos-Vara, J.A. (2005). Technical aspects of immunohistochemistry. *Vet Pathol*. v. 42(4), p. 405-426.

Reis, D.D.; Jones, E.M. e Tostes, S.Jr. (1993). Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, et al. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α ⁺ cells and dominance of granzyme A⁺, CD8⁺ lymphocytes. The American journal of tropical medicine and hygiene. v. 48(5), p. 637-644.

Reis, M.M.; Higuchi, M.L.; Aiello, V.D. e Benvenuti, L.A. (2000). Growth factors in the myocardium of patients with chronic chagasic cardiomyopathy]. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. v. 33(6), p. 509-518.

Reis, M.M.; Higuchi, M.L.; Benvenuti, L.A.; Aiello, V.D.; Gutierrez, P.S.; Bellotti, G. e Pileggi, F. (1997). An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R⁺ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. Clin Immunol Immunopathol. v. 83(2), p. 165-172.

Riera, C.; Guarro, A.; Kassab, H.E.; Jorba, J.M.; Castro, M.; Angrill, R.; Gallego, M.; Fisa, R.; Martin, C.; Lobato, A. e Portus, M. (2006). Congenital transmission of *Trypanosoma cruzi* in Europe (Spain): a case report. The American journal of tropical medicine and hygiene. 75(6):1078-1081.

Rodriguez, A.; Rioult, M.G.; Ora, A. e Andrews, N.W. (1995). A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. J Cell Biol. v. 129(5), p. 1263-1273.

Ropert, C.; Ferreira, L.R.; Campos, M.A.; Procopio, D.O.; Travassos, L.R.; Ferguson, M.A.; Reis, L.F.; Teixeira, M.M.; Almeida, I.C. e Gazzinelli, R.T. (2002). Macrophage signaling by glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins derived from *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. Microbes and infection / Institut Pasteur . v. 4(9), p. 1015-1025.

Rossi, G.; Fortuna, D.; Pancotto, L.; Renzoni, G.; Taccini, E.; Ghiara, P.; Rappuoli, R. e Del Giudice, G. (2000). Immunohistochemical study of lymphocyte populations infiltrating the gastric mucosa of beagle dogs experimentally infected with *Helicobacter pylori*. Infection and immunity. v. 68(8), p. 4769-4772.

Rossi, M.A. (1998). Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. International journal of cardiology. v. 30;66(2), p. 183-194.

Rottenberg, M.E.; Bakhiet, M.; Olsson, T.; Kristensson, K.; Mak, T.; Wigzell, H. e Orn, A. (1993). Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. Infection and immunity. v. 61(12), p. 5129-5133.

Rottenberg, M.E.; Riarte, A.; Sporrang, L.; Altcheh, J.; Petray, P.; Ruiz, A.M.; Wigzell, H. e Orn, A. (1995a). Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. Immunol Lett. v. 45(1-2), p. 53-60.

Rottenberg, M.E.; Sporrang, L.; Persson, I.; Wigzell, H. e Orn, A. (1995b). Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. Scandinavian journal of immunology. v. 41(2), p. 164-170.

Sales, P.A.Jr.; Golgher, D.; Oliveira, R.V.; Vieira, V.; Arantes, R.M.; Lannes-Vieira, J. e Gazzinelli, R.T. (2008). The regulatory CD4⁺CD25⁺ T cells have a limited role on pathogenesis of infection with *Trypanosoma cruzi*. Microbes and infection / Institut Pasteur. v. 10(6), p. 680-688.

Sardinha, L.R.; Elias, R.M.; Mosca, T.; Bastos, K.R.; Marinho, C.R.; D'Imperio Lima, M.R. e Alvarez, J.M. (2006). 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*. Infection and immunity. v. 74(4), p. 2031-2042.

Sato, M.N.; Yamashiro-Kanashiro, E.H.; Tanji, M.M.; Kaneno, R.; Higuchi, M.L. e Duarte A.J. (1992). CD8⁺ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. Infection and immunity. v. 60(3), p. 1024-1030.

Schenkman, S. e Mortara, R.A. (1992). HeLa cells extend and internalize pseudopodia during active invasion by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. J Cell Sci. v. 101 (Pt 4), p. 895-905.

Shi, S.R.; Cote, R.J. e Taylor, C.R. (2001). Antigen retrieval immunohistochemistry and molecular morphology in the year 2001. Appl Immunohistochem Mol Morphol. v. 9(2), p. 107-116.

Silveira, A.B.; Arantes, R.M.; Vago, A.R.; Lemos, E.M.; Adad, S.J.; Correa-Oliveira, R. e D'Avila Reis, D. (2005). Comparative study of the presence of *Trypanosoma cruzi* kDNA, inflammation and denervation in chagasic patients with and without megaesophagus. Parasitology. v. 131, p. 627-634

Souza, P.E.A.; Rocha, M.O.C.; Rocha-Vieira, E.; Menezes, C.A.S.; Chaves, A.C.L.; Gollob, K.J.; e Dutra, W.O. (2004). Monocytes from Patients with Indeterminate and Cardiac Forms of Chagas' Disease Display Distinct Phenotypic and Functional Characteristics Associated with Morbidity. Infection and Immunity. v. 72(9), p. 5283–5291.

Stoica, G.; Kim, H.T.; Hall, D.G. e Coates, J.R. (2004). Morphology, immunohistochemistry, and genetic alterations in dog astrocytomas. Vet Pathol. v. 41(1), p. 10-19.

Sun, J. e Tarleton, R.L. (1993). Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. The American journal of tropical medicine and hygiene. v. 48(2), p. 161-169.

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

Tafuri, W.L. (1987). Pathogenesis of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*. v. 29(4), p. 194-199.

Tafuri, W.L.; Santos, R.L.; Arantes, R.M.; Goncalves, R.; de Melo, M.N.; Michalick, M.S. e Tafuri, W.L. (2004). An alternative immunohistochemical method for detecting *Leishmania amastigotes* in paraffin-embedded canine tissues. *J Immunol Methods*. v. 292(1-2), p. 17-23.

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

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

Tarleton, R.L. (2007). Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. *Curr Opin Immunol*. v. 19(4), p. 430-434.

Tarleton, R.L.; Grusby, M.J.; Postan, M. e Glimcher, L.H. (1996). *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. *Int Immunol*. v. 8(1), p. 13-22.

Tarleton, R.L.; Sun, J.; Zhang, L. e Postan, M. (1994). Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infection and immunity*. v. 62(5), p. 1820-1829.

Tarleton, R.L. e Zhang, L. (1999). Chagas disease etiology: autoimmunity or parasite persistence? *Parasitol Today*. v. 15, p. 94-99.

Tibayrenc, M. (2003). Genetic subdivisions within *Trypanosoma cruzi* (Discrete Typing Units) and their relevance for molecular epidemiology and experimental evolution. *Kinetoplastid Biol Dis*. v. 28;2(1), p. 12.

Tostes Junior, S.; Lopes, E.R.; Pereira, F.E.L. e Chapadeiro, E. (1994) 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.

Todorov, A.G.; Einicker-Lamas, M.; de Castro, S.L.; Oliveira, M.M. e Guilherme, A. (2000) Activation of host cell phosphatidylinositol 3-kinases by *Trypanosoma cruzi* infection. *J Biol Chem*. v. 275(41), p. 32182-32186.

Tzelepis, F.; de Alencar, B.C.; Penido, M.L.; Gazzinelli, R.T.; Persechini, P.M. e Rodrigues M.M. (2006). Distinct kinetics of effector CD8⁺ cytotoxic T cells after infection with *Trypanosoma cruzi* in naive or vaccinated mice. *Infection and immunity*. v. 74(4), p. 2477-2481.

Valente, S.A.; da Costa Valente, V.; das Neves Pinto, A.Y.; de Jesus Barbosa Cesar, M. dos Santos, M.P.; Miranda, C.O.; Cuervo, P. e Fernandes, O. (2009). 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*. v. 103(3), p. 291-297.

Vespa, G.N.; Cunha, F.Q. e Silva, J.S. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infection and immunity*. v. 62(11), p. 5177-5182.

Vitelli-Avelar, D.M.; Sathler-Avelar, R.; Massara, R.L.; Borges, J.D.; Lage, P.S.; Lana, M.; Teixeira-Carvalho, A.; Dias, J.C.; Eloi-Santos, S.M. e Martins-Filho, O.A. (2006). Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4⁺CD25^{high} T cells balancing activated CD8⁺ T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? *Clin Exp Immunol*. v. 145(1), p. 81-92.

Voss, C.; Kremmer, E.; Schumm, M.; Gunther, W.; Hoffmann-Fezer, G.; Kolb, H.J. e Thierfelder, S. (1994). Rat monoclonal antibodies against three different epitopes of the canine Thy-1 and their depletion capacity in vivo. *Tissue antigens*. v. 43(3), p.193-197.

Waghabi, M.C.; Coutinho, C.M.; Soeiro, M.N.; Pereira, M.C.; Feige, J.J.; Keramidas, M.; Cosson, A.; Minoprio, P.; Van Leuven, F. e Araujo-Jorge, T.C. (2002). Increased *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming growth factor beta levels in mice deficient in alpha(2)-macroglobulin. *Infection and immunity*. v. 70(9), p. 5115-5123.

Wilkowsky, S.E.; Barbieri, M.A.; Stahl, P. e Isola, E.L. (2001). *Trypanosoma cruzi*: phosphatidylinositol 3-kinase and protein kinase B activation is associated with parasite invasion. *Exp Cell Res*. v. 264(2), p. 211-218.

Williams, D.L. (1999). Histological and immunohistochemical evaluation of canine chronic superficial keratitis. *Res Vet Sci*. v. 67(2), p. 191-195.

Woolsey, A.M.; Sunwoo, L.; Petersen, C.A.; Brachmann, S.M.; Cantley, L.C. e Burleigh B.A. (2003). Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. *J Cell Sci*. v. 116(Pt 17), p. 3611-3622.

Wunschmann, A.; Alldinger, S.; Kremmer, E. e Baumgartner, W. (1999). Identification of CD4⁺ and CD8⁺ T cell subsets and B cells in the brain of dogs with spontaneous acute, subacute-, and chronic-demyelinating distemper encephalitis. *Veterinary immunology and immunopathology*. v. 67(2), p. 101-116.

Xavier, S.C.; de Andrade, H.M.; Monte, S.J.; Chiarelli, I.M.; Lima, W.G.; Michalick, M.S.; Tafuri, W.L. e Tafuri, W.L. (2006). Comparison of paraffin-embedded skin biopsies from different anatomical regions as sampling methods for detection of *Leishmania* infection in dogs using histological, immunohistochemical and PCR methods. *BMC Vet Res*. v. 2, p. 17.

Yoshida, N. (2006). Molecular basis of mammalian cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *An Acad Bras Cienc*. v. 78(1), p. 87-111.

Yoshida, N.; Favoreto, S.Jr.; Ferreira A.T. e Manque, P.M. (2000). Signal transduction induced in *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigotes during the invasion of mammalian cells. *Braz J Med Biol Res*. v. 33(3), p. 269-278.