

Universidade Federal do Triângulo Mineiro

**Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na
fase aguda e crônica da infecção experimental pelo
*Trypanosoma cruzi***

Cláudia Renata Bibiano Borges

Uberaba - Minas Gerais
2008

Cláudia Renata Bibiano Borges

Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Patologia, área de concentração “Patologia Geral”, da Universidade Federal do Triângulo Mineiro, para a obtenção do Título de Mestre.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlene Antônia dos Reis

Uberaba - Minas Gerais
2008

B731p Borges, Cláudia Renata Bibiano.

Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* / Cláudia Renata Bibiano Borges. - - 2008.

88 f.; tab.; graf.; fig.

Dissertação (Mestrado em Patologia Geral) – Universidade Federal do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG, 2008.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues.

Co-orientadora: Prof^a. Dr^a. Marlene Antônia dos Reis.

1. Doença de Chagas.
2. Óxido Nítrico.
3. Citocinas.
4. Quimiocinas

CDU 616.937

“Porque eu, o SENHOR teu Deus, te tomo pela tua mão direita, e te digo: Não temas, eu te ajudo” (Isaías 41:13)

Dedicatória

Dedico esta conquista às pessoas mais importantes da minha vida:

Aos meus pais Abadia e Sebastião,

Ao meu filho Rafael,

Ao meu marido Marcos,

Pelo amor incondicional, força, incentivo; são o meu porto seguro.

Amo vocês!

Agradecimentos

Dissertação de Mestrado – Cláudia Renata Bibiano Borges

Agradeço em primeiro lugar a Deus, Senhor e condutor da minha vida;

À minha orientadora, Profa. Denise Bertulucci Rocha Rodrigues, pela amizade, dedicação, paciência e apoio durante toda essa trajetória. Obrigado pelo exemplo de profissionalismo, humildade e de firmeza de caráter;

À minha co-orientadora Marlene Antônia dos Reis, que sempre se fez presente. Obrigada pelas críticas e sugestões constantes, que tanto contribuíram para a realização desse trabalho, e, sobretudo pelo exemplo profissional;

Aos Professores: Virmondes Rodrigues Jr., Javier Emilio Lazo Chica e Sanívia Aparecida de Lima Pereira, pela imensa colaboração, dedicação e paciência a mim dispensada;

Aos Professores: Vicente de Paula Antunes, Márcia Antoniazzi Michelin, Ana Carolina Guimarães Faleiros e Rosana Rosa Miranda Corrêa, pela oportunidade da convivência, apoio e troca de experiências que sempre foram de grande valia.

Aos meus amigos que sempre estiveram presentes, compartilhando das horas alegres e dos momentos tensos: Bethanea Crema Peghini, Cristina Wide Pisseti, Juliana Reis Machado, Karine Rezende, Lia Borges Leão Bazaga, Lúcio Roberto Caçado Castellano, Marcos Vinicius da Silva, Renata Pereira Paes Santos;

Aos meus colegas de pós-graduação pela experiência do ótimo convívio compartilhado durante estes anos: Ana Paula Espíndula, Aline da Silva Almeida, Ariane Silva, Camila Lourencini Cavellani, Débora Tavares de Resende e Silva Abade, Elaine Bento, Janaína Grazielle Pacheco Olegário, Mara Lúcia Fonseca Ferraz, Rafael Faria, Renata Beatriz Silva, Renata Calciolari Rossi;

Ao pessoal do Laboratório de Imunologia, pela presteza e acolhida: Betânea Maria Ribeiro, Carlos Alberto Mota Araújo, Mônica Miguel Sawan Mendonça;

Gostaria de agradecer ao pessoal da Patologia Geral, que sempre me trataram com todo o carinho: Aloísio Costa, Edson Aparecido dos Santos, Elenemar Flausino Borges, Lourimar José de Moraes, Maria Helena Soares Costa Batista, Maria Prado de Moraes, Pedro Henrique de Oliveira Ramalho, Vandair Gonçalves Pereira e Sônia Mara Sobrinho;

Às funcionárias da Biblioteca Frei Eugênio: Celeida de Fátima da Costa e Rachel Inês da Silva, pela dedicação e atenção com que sempre me trataram;

Às funcionárias do Depto. de Pós-graduação: Denise Teresinha Cardoso e Nelma Aparecida Ferreira Salgado, sempre prestimosas.

Apoio Financeiro

Dissertação de Mestrado – Cláudia Renata Bibiano Borges

O presente trabalho foi realizado com o apoio do Curso de Pós-Graduação em Patologia da Universidade Federal do Triângulo Mineiro (UFTM) e com os recursos financeiros do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), da Fundação de Ensino e Pesquisa de Uberaba (FUNEPU), da Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG) e da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Resumo

Dissertação de Mestrado – Cláudia Renata Bibiano Borges

A doença de Chagas afeta em toda a América Latina aproximadamente 20 milhões de pessoas. Com o passar do tempo, parte destas pessoas poderão apresentar comprometimento de um ou mais órgãos, principalmente o coração. O desenvolvimento de animais geneticamente modificados trouxe grande avanço ao estudo do funcionamento do sistema imune, permitindo identificar a participação de várias moléculas no processo de defesa contra alguns patógenos, assim como o seu papel nos mecanismos de lesão tecidual. O óxido nítrico representa uma destas moléculas, com grande potencial tripanocida e de risco de dano tecidual, devido a sua capacidade de induzir morte celular e a seu efeito inotrópico negativo. O objetivo principal do trabalho foi analisar a contribuição do óxido nítrico, IFN- γ e MCP-1 no desenvolvimento da inflamação e da fibrose cardíaca nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Foram avaliados 45 animais C57BL/6, 27 destes selvagens (C57BL/6-S) – sendo 3 destes utilizados como grupo controle não infectado - e 18 geneticamente deficientes em iNOS (C57BL/6KO), infectados com 3000 formas tripomastigotas da cepa Y ou da cepa Colombiana do *T. cruzi* por via intra peritoneal. Foram designados 6 animais por grupo. Quatro grupos foram eutanasiados no 15^o dia após a infecção (fase aguda) e 3 grupos no 120^o dia após a infecção (fase crônica). Fragmentos de coração foram corados pela Hematoxilina-Eosina para análise de infiltrado inflamatório, picrosirius para análise de fibrose e imunohistoquímica para a detecção ninhos de *T. cruzi in situ*. Células do baço destes animais foram cultivadas em presença de antígenos e o sobrenadante foi usado para detecção dos níveis de IFN- γ e MCP-1 por ELISA.

Nosso estudo apontou que o número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco nos animais infectados com a cepa Colombiana foi significativamente maior nos animais C57BL/6KO que nos animais C57BL/6-S. Ainda, os animais infectados com a cepa Colombiana, apresentaram número de ninhos significativamente maior que os infectados com a cepa Y. Com relação à inflamação durante a fase aguda entre os grupos C57BL/6-S e C57BL/6KO infectados com a cepa Colombiana e com a cepa Y não houve diferença significativa, embora em cada uma das linhagens, quando comparados os animais infectados com as duas cepas, no grupo C57BL/6KO a inflamação causada pela cepa colombiana foi significativamente maior. Na fase crônica, os animais C57BL/6-S infectados com a cepa Colombiana apresentaram inflamação significativamente maior que os infectados com a cepa Y. A fibrose foi avaliada na fase aguda comparando os animais C57BL/6-S e C57BL/6KO, com as duas cepas, e não houve diferença significativa, embora os animais C57BL/6KO apresentassem uma maior área de tecido conjuntivo fibroso quando infectados pela cepa

Colombiana. Neste estudo animais deficientes em iNOS apresentaram maior inflamação, provavelmente devido ao maior parasitismo tissular. Ainda, não se observou diferença na fibrose entre os animais deficientes em iNOS e seu homólogos selvagens sugerindo que na doença de Chagas, o óxido nítrico não está envolvido na formação da fibrose cardíaca durante a fase aguda. Os níveis de IFN- γ não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados. Os animais C57BL/6KO apresentaram maior parasitismo que os animais C57BL/6-S, e apesar dos animais C57BL/6KO produzirem IFN- γ em níveis semelhantes aos C57BL/6-S, os nossos resultados demonstraram a importância do NO no controle do parasito, uma vez que esses animais não conseguiram sobreviver para atingirem a fase crônica da doença. Os níveis de MCP-1 foram significativamente maiores no grupo C57BL/6KO infectado com a cepa Colombiana em sua produção basal durante a fase aguda. Já na fase crônica, os nossos resultados se invertem, e os grupos que mais expressam MCP-1 são os C57BL/6-S infectados com a cepa Y, tanto em sua produção basal, como após o estímulo com antígenos *T. cruzi*. Assim, os animais deficientes em NO apresentaram maior parasitismo tissular e inflamação mais intensa, não apresentando diferença significativa na intensidade de fibrose, e com níveis significativamente maiores de MCP-1. Concluímos que o Óxido Nítrico e a MCP-1 são moléculas importantes no desenvolvimento das lesões cardíacas durante a fase aguda e crônica na doença de Chagas experimental.

Palavras-chave: Doença de Chagas, óxido nítrico, citocinas, quimiocinas.

Abstract

Dissertação de Mestrado – Cláudia Renata Bibiano Borges

Chagas' disease affects approximately 20 million people in Latin America. Some of these subjects could develop multiple organ commitment, mainly heart. Generation of genetically modified animals provided important insights to immune system studies, by better clarifying the role played by many molecules in defense responses against pathogens and also in tissue damage. Among these molecules, nitric oxide presents a great trypanocidal action associated with high risk of tissue damage, mainly due to its ability of inducing cell death and its negative inotropic effect. In this study, the aim was to evaluate the contribution of nitric oxide, IFN- γ and MCP-1 in the development of inflammatory responses and cardiac fibrosis during both acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* experimental infection. Forty-five C57BL/6 mice were used in this study, being 27 from wild type strain, 3 of which used as uninfected control group, and 18 iNOS genetically deficient (Knock out) mice, infected intraperitoneally with 3,000 trypomastigote forms of Y or Colombian strains of *T. cruzi*, in groups consisted of 6 animals each. Four groups were euthanized at day 15th (acute phase) and 3 groups at day 120th post-infection (chronic phase). Fragments of the heart were processed and stained with hematoxylin-eosin for inflammatory infiltrate analysis, with picrosirius for fibrosis evaluation and immunohistochemistry for in situ detection of *T. cruzi* amastigotes. Spleen cells were cultured in presence of parasite antigens and supernatant used for IFN- γ and MCP-1 titration by ELISA.

Our study showed that the number of *T. cruzi* amastigotes of Colombian strain was significantly higher in heart tissues of C57BL/6KO animals than in wild type littermates. Also, mice infected with Colombian strain presented significantly more amastigotes in heart tissues than animals infected with Y strain. Tissue inflammation analysis revealed that during acute phase of infection, C57BL/6KO mice infected with Colombian strain presented higher inflammatory infiltrate in comparison to Y strain infection. No difference was observed when KO mice were compared to wild type mice infected with each parasite strains. Interestingly, C57BL/6 wild type mice chronically infected with Colombian strain showed increased inflammatory infiltrate when compared to matched group infected with Y strain. Although C57BL/6KO mice presented a more extensive fibrotic area in the conjunctive tissue when infected by Colombian strain, there were no differences between wild type and KO mice infected with each strains. In this study, iNOS-deficient animals presented higher inflammation probably because of their intense tissular parasitism. Lack of any difference in fibrosis analysis between wild type and iNOS-deficient mice, suggests that nitric oxide may not be directly involved in fibrosis generation during Chagas' disease acute phase. When IFN-

γ production was evaluated, there was no difference between studied groups. As C57BL/6KO mice presented higher parasite loads than wild type animals, the similar IFN- γ production observed in both groups would confirm the essential role played by nitric oxide in infection control, being corroborated by the observation that many iNOS-deficient animals died before chronic phase. Moreover, MCP-1 basal levels were significantly stronger in Colombian strain-infected C57BL/6KO mice during acute phase than in other groups. Conversely, during chronic phase, C57BL/6 wild type mice infected with Y strain produced the higher MCP-1 levels observed in basal and *T. cruzi* stimulated cell cultures. Thus, nitric oxide deficient mice showed the highest tissue parasitism and inflammation, without significant difference in fibrosis, but with the most elevated levels of MCP-1 production. We conclude that nitric oxide and MCP-1 are key molecules involved in cardiac lesions development during acute and chronic phases of experimental Chagas' disease.

Keywords: Chagas' disease, nitric oxide, cytokines, chemokines.

Lista de Figuras

- Figura 1:** As setas azuis indicam a direção de escolha dos campos, e os pontilhados vermelhos os campos selecionados, em um total de dez campos.....53
- Figura 2:** Em maior aumento, o campo com o sistema teste de cem pontos em uma área pré-determinada de $55000\mu\text{m}^2$. A área por ponto corresponde a $550\mu\text{m}^2$. O total da área do estudo corresponde a $5.500.000\mu\text{m}^2$54
- Figura 3.** Morfometria computadorizada microscópica automática. Em (A) observa-se o microscópio de luz acoplado a uma câmera conectada ao computador. Em (B) observam-se as etapas seguidas pelo programa KS 300 da Carl Zeiss, em (C) a captura da imagem a ser quantificada com luz polarizada e (D) o resultado da quantificação em porcentagem da imagem capturada.....55
- Figura 4.** Em A programa ImageJ; Em B, imagem de corte do coração capturada como indicado no item 5.8.1; Em C imagem transformada em 8 bits e utilizado o comando *threshold* que transforma a imagem em branco e preto, permitindo o cálculo da área pelo programa; Em D, o resultado do cálculo.....57
- Figura 5.** Distribuição do número de ninhos por mm^2 em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S infectados com a cepa Y e com a cepa colombiana na fase aguda. Os dados são apresentados em número de ninhos por área do corte analisado. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90% (*Mann-Whitney; $p=0,0001$); (**Mann-Whitney; $p=0,033$).....60
- Figura 6.** Distribuição da porcentagem de exsudato inflamatório em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S infectados pelas cepas Y e Colombiana na fase aguda da infecção. A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann Whitney; $p=0,013$); ** (Mann Whitney; $p=0,004$).....61
- Figura 7.** Distribuição da porcentagem de exsudato inflamatório em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S infectados pelas cepas Y e Colombiana na fase crônica da infecção. A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann Whitney; $p=0,004$).....62
- Figura 8.** Distribuição da fibrose em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S, infectados com a cepa Y e com a cepa Colombiana, durante a fase aguda da infecção. Os dados são apresentados em porcentagem da área de fibrose. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90%.....63
- Figura 9.** Distribuição da fibrose no grupo controle e em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S, infectados com a cepa Y durante a fase crônica da infecção. Os dados são apresentados em porcentagem da área de fibrose. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90%.....64
- Figura 10.** Níveis de IFN- γ em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S, infectados com as cepas Y e Colombiana, na fase aguda da infecção. Os dados são apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a

barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90%.....65

Figura 11. Níveis de IFN- γ em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6-S, infectados com as cepas Y, na fase crônica da infecção. Os dados são apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90%.....66

Figura 12. Níveis de MCP-1 em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S, infectados com as cepas Y e Colombiana, na fase aguda da infecção. Os dados são apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90% (*Mann-Whitney; p=0,049).....67

Figura 13. Níveis de MCP-1 em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6-S, infectados com as cepas Y e Colombiana, na fase crônica da infecção, em produção basal. Os dados são apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90% (*Mann-Whitney; p=0,031); (** Mann-Whitney; p=0,015).....68

Lista de Tabelas

Dissertação de Mestrado – Cláudia Renata Bibiano Borges

Tabela 1. Distribuição do número de animais utilizados no estudo, de acordo com a linhagem, cepa de *Trypanosoma cruzi* inoculada e fase da infecção.....49

Prancha 1. Corte histológico de coração de camundongo C57BL/6-S e C57BL/6KO: **(A)** Corte histológico de coração de camundongo evidenciando ninho de *T. cruzi*. (Seta) (X 800). **(B)** Corte histológico de coração de camundongo com imunomarcção positiva na técnica de imunohistoquímica para *T. cruzi*. (Seta) (X 800). **(C)** Infiltrado inflamatório com predomínio de PMN durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (seta) (Hematoxilina-eosina X 800). **(D)** Infiltrado inflamatório com predomínio de MN durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* (seta) (Hematoxilina-eosina X 800). **(E)** Linhagem C57BL/6-S infectado pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, fase crônica apresentando fibrose (picrosírius, sob luz comum (X 800). **(F)** Mesmo campo visto na luz polarizada (X 800).....69

Lista de Abreviaturas

Dissertação de Mestrado – Cláudia Renata Bibiano Borges

ABNT: Associação Brasileira de Normas Técnicas
Ap: Área ponto
BSA: soro-albumina bovina
° C: graus Celsius
C57/Bl6-KO: Grupo de animais knockout
C57BL/6-S: Grupo de animais selvagens
CCC: cardiopatia chagásica crônica
CEP/UFTM: Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal do Triângulo Mineiro
CO₂: dióxido de carbono
COBEA: Colégio Brasileiro de Experiência Animal
cNOS: óxido nítrico sintase constitutiva
DAB: 1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol-Di-aminobenzidina
DC= Doença de Chagas
DP= Desvio Padrão
DNA= ácido desoxirribonucléico
eNOS: óxido nítrico sintase endotelial
ELISA: ensaio imunoenzimático
EPR: Erro padrão relativo
FA: Fase Aguda
FC: Fase Crônica
H₂O₂: água oxigenada
HE: Hematoxilina e Eosina
IFN: Interferon
IL: Interleucina
iNOS: óxido nítrico sintase induzida
LPS: lipopolissacarídeo
MCP-1: Proteína quimiotática para monócitos
MG: Minas Gerais
mg: miligrama
μL: microlitro
mL: mililitro
mm: milímetro
μm: Micrômetro

mRNA: RNA mensageiro
NK: Natural killer
NO: óxido nítrico
NO₂⁻: nitrato
NO₃⁻: íon nitrato
NOS: óxido nítrico sintase
PBS: solução salina tamponada com fosfato
Pg: picrograma
PHA: fitohemaglutinina
Pp: a razão de pontos que atingem o coração
PT: Ponto teste
SFM: Sistema Fagocitário Mononuclear
T: Mann Whitney
TGF: fator de transformação e crescimento
Th: Resposta T helper
TNF: Fator de necrose tumoral
Vv: densidade de volume

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	29
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
1.2 Aspectos gerais da doença de Chagas	31
1.3 Fatores do hospedeiro envolvidos no controle da infecção e na patogênese da doença de Chagas	33
1.3.1 Citocinas envolvidas na resposta imune contra o <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
1.3.1.1 Interferon gama (IFN- γ).....	36
1.3.1.2 Óxido Nítrico – (NO).....	Erro! Indicador não definido.
1.3.2 Quimiocinas	41
1.3.2.1 MCP-1.....	43
1.4 O camundongo como modelo experimental	44
2 JUSTIFICATIVA.....	46
3 HIPÓTESE	47
4 OBJETIVOS.....	48
4.1 Objetivo geral.....	48
4.2 Objetivos específicos	Erro! Indicador não definido. 48
5 MATERIAL E MÉTODOS	Erro! Indicador não definido. 49
5.1 Casuística	Erro! Indicador não definido. 49
5.2 Obtenção do <i>Trypanosoma cruzi</i> para inóculo em camundongos	Erro! Indicador não definido. 51
5.3 Processamento das lâminas.....	Erro! Indicador não definido. 51
5.4 Quantificação do infiltrado inflamatório	Erro! Indicador não definido. 52
5.5 Quantificação da fibrose	Erro! Indicador não definido. 54
5.6 Cultura de células.....	Erro! Indicador não definido. 55
5.7 Dosagem de citocinas por ELISA dos sobrenadantes de cultivo de células do baço.....	56
5.8 Imunohistoquímica.....	Erro! Indicador não definido. 56
5.8.1 Densidade Parasitária.....	Erro! Indicador não definido. 57
5.9 Aspectos éticos.....	Erro! Indicador não definido. 58
5.10 Normas adotadas	Erro! Indicador não definido. 58
5.11 Análise Estatística.....	Erro! Indicador não definido. 58
6 RESULTADOS	Erro! Indicador não definido. 59
6.1 Parasitismo cardíaco	Erro! Indicador não definido. 59
6.2 Inflamação na fase aguda.....	Erro! Indicador não definido. 60
6.3 Inflamação na fase crônica	Erro! Indicador não definido. 61
6.4 Fibrose na fase aguda.....	Erro! Indicador não definido. 62
6.5 Fibrose na fase crônica.....	Erro! Indicador não definido. 63
6.6 Dosagem de IFN- γ e MCP-1	Erro! Indicador não definido. 64
6.6.1 Níveis de IFN- γ na fase aguda da infecção	Erro! Indicador não definido. 64
6.6.2 Níveis de IFN- γ na fase crônica da infecção.....	Erro! Indicador não definido. 65
6.6.3 Níveis de MCP-1 na fase aguda da infecção.....	Erro! Indicador não definido. 66
6.6.4 Níveis de MCP-1 na fase crônica da infecção.....	67
7 DISCUSSÃO.....	Erro! Indicador não definido. 70
8. CONCLUSÕES.....	Erro! Indicador não definido. 75
9 REFERÊNCIAS.....	76

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 1.1 O *Trypanosoma cruzi*

4

5 A doença de Chagas, causada pelo *Trypanosoma cruzi*, constitui um dos mais
6 importantes problemas de saúde pública, em vários países da América Latina (WHO, 1991).
7 A doença possui caráter endêmico em largas extensões territoriais do continente americano e
8 apesar dos recentes progressos no controle da doença de Chagas, aproximadamente 20
9 milhões de pessoas ainda estão cronicamente infectadas (ABEL et al., 2001; ALMEIDA-
10 LEITE et al, 2007).

11 O *Trypanosoma cruzi* é um protozoário flagelado, pertencente à ordem
12 Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Em seu ciclo de vida apresenta três formas
13 distintas: a forma tripomastigota metacíclica, encontrada no intestino posterior do triatomíneo,
14 ao fim do desenvolvimento do parasito, no interior da célula do mamífero, imediatamente
15 antes da lise celular e também na corrente sangüínea; a forma amastigota, encontrada no
16 interior das células dos hospedeiros mamíferos e possivelmente também no sangue; e a forma
17 epimastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor e também na maior parte das
18 culturas axênicas (SOUZA, 2000).

19 A forma tripomastigota sangüínea penetra ativamente em qualquer célula do
20 organismo e diferencia-se na forma amastigota intracelular encurtando seu flagelo e
21 incorporando-o ao seu corpo. É capaz de destruir a membrana do vacúolo parasitóforo e ficar
22 livre no citoplasma da célula. Após um período de 35 horas de latência o parasita começa
23 uma fase de divisão binária que ocorre por vários dias, dependendo da cepa de *T. cruzi*. Em 5
24 dias há cerca de 500 amastigotas no interior da célula. Começa, então, o processo de
25 diferenciação de amastigotas em tripomastigotas sangüíneo, que sob esta forma, rompe a
26 célula hospedeira, invadem as células vizinhas ou caem na corrente circulatória dando início
27 ao novo ciclo (SOUZA, 2000).

28 O parasito adere-se à membrana da célula hospedeira invadindo-a, formando o
29 vacúolo parasitóforo. Organelas do sistema endolisossomal fundem-se a esse
30 vacúololiberando seu conteúdo enzimático e tornando o meio do fagolisossoma ácido. Se a
31 forma tripomastigota for opsonizada, ocorre ativação da enzima de membrana NAD(P)H
32 oxidase, ocasionando a formação de radicais de oxigênio e água oxigenada, lesando a
33 membrana do parasito o que leva à sua destruição e digestão. No citoplasma da célula
34 hospedeira o parasito na forma amastigota começa um processo de divisão e, após sucessivas

1 divisões, inicia-se um processo de diferenciação para tripomastigota, que perdura por algumas
2 horas. Esta forma apresenta intenso movimento, ocasionando a ruptura da célula e liberando o
3 parasito no espaço intercelular (SOUZA, 2000). O *T. cruzi*, *in vivo e in vitro*, replica-se de
4 forma intracelular, sendo que, uma vez no hospedeiro, pode infectar várias células nucleadas
5 (KIRSCHHOFF, 1989). Algumas cepas apresentam preferência por miócitos do sistema
6 retículo endotelial ou células neurais (BRENNER, 1979). Constitui-se em um parasito
7 intracelular importante e bem sucedido, devido a sua virulência e capacidade de infectar
8 vários tipos celulares (REED, 1998).

9 O *T. cruzi* é talvez o parasito que apresenta a maior diversidade de hospedeiros
10 vertebrados. Em toda a América são mais de uma centena as espécies de mamíferos silvestres
11 encontradas infectadas com o parasito (ANDRADE & ANDRADE, 1996). Alguns
12 vertebrados que servem de repasto aos triatomíneos ou que deles se alimentam, como aves e
13 répteis, não podem ser infectados pelo *T. cruzi*, uma vez que, o sistema complemento destes
14 animais geralmente lisa as formas tripomastigotas (ANDRADE & ANDRADE, 1996). Na
15 transmissão pelo vetor, as formas tripomastigotas metacíclicas advindas do desenvolvimento
16 do parasito no inseto e que se encontravam no reto do triatomíneo, são depositadas sobre a
17 pele do vertebrado junto com fezes, oriundas de refeições anteriores junto a uma quantidade
18 considerável de urina. Os parasitos podem então penetrar em descontinuidades da pele ou na
19 mucosa. Outras vias de infecção, como a transfusional e a oral, podem resultar em infecções
20 bem estabelecidas, inclusive com fase aguda marcante, mas são menos estudadas do que a
21 estabelecida de forma vetorial (ANDRADE & ANDRADE, 1996).

22 Devido às características genéticas e até mesmo biológicas, o *T. cruzi*, constitui-se
23 em cepas ou subespécies com comportamentos peculiares quando utilizados em modelo
24 experimental. As cepas Y e Colombiana são descritas como cepas polares, considerando seus
25 aspectos morfológicos, tropismo tissular e parasitemia (BRENER, 1965; BRENER &
26 CHIARI, 1963). Análises realizadas por Andrade (1974) permitiram estabelecer três tipos de
27 cepas ou biotipos, designados como Tipos I, II e III. As alterações nos tecidos
28 predominantes dependem do tropismo da cepa e do maior grau de parasitismo dos diferentes
29 setores do organismo (ANDRADE, 1974). A cepa Y, descrita como Tipo I, nas fases iniciais
30 até 10 dias pós-infecção apresenta parasitismo dos macrófagos em vários setores do
31 organismo e na fase mais avançada da infecção aguda, observa-se evidente miotropismo,
32 lesões inflamatórias de miocárdio, músculo esquelético e músculo liso das paredes intestinais,
33 com envolvimento de plexos mioentéricos e lesões neurais (ANDRADE & ROCHA SILVA,

1 1995). O biodema II que possui como protótipo a cepa São Felipe se revela com
2 predominância de formas largas, miocardiotropismo, multiplicação relativamente lenta e
3 picos de parasitemia irregulares entre 12 e 20 dias após a infecção, período no qual também a
4 mortalidade é máxima (ANDRADE, 1985).

5 A cepa Colombiana, descrita como pertencente ao biodema Tipo III, apresenta
6 parasitemia de evolução lenta, nítido miotropismo, sobretudo com envolvimento de
7 musculatura esquelética, desenvolvendo extensas lesões de fibras musculares esqueléticas e
8 intenso processo inflamatório, arterite e periarterite, com necrose de parede vascular, e lesões
9 miocárdicas proeminentes (ANDRADE, 2000). Em trabalhos experimentais, a cepa desse
10 biodema demonstrou maior capacidade de atravessar a barreira gástrica e produzir infecção
11 mais intensa em camundongos, quando comparadas às outras cepas dos biodemas I e II
12 (ANDRADE, 1990).

13 As cepas de *T. cruzi* são multiclonais, podendo apresentar populações
14 homogêneas ou heterogêneas com predominância de clones principais (TIBAYRENC &
15 BRENIERE, 1988). A presença de um clone principal em uma mesma área endêmica pode ser
16 responsável pelo quadro clínico-patológico da doença nessa área (CAMPOS et al., 1999).
17 Deve-se levar em conta que diferentes clones de uma cepa podem apresentar tropismo
18 diferente para tecidos específicos, devido às interações moleculares na superfície da célula
19 entre o clone invasor e os tecidos do hospedeiro (MACEDO & PENA, 1998).

21 **1.2 Aspectos gerais da doença de Chagas**

22
23 O curso clínico-patológico da doença consta de duas fases: aguda, e crônica.
24 Dependendo de fatores inerentes ao parasito ou hospedeiro, a miocardite aguda pode evoluir
25 de vários modos, agravando-se devido à intensidade e a qualidade do exsudato inflamatório
26 (TAFURI, 1985). A fase aguda pode ser ou não sintomática, e nessa fase a doença não é
27 diagnosticada na maioria dos pacientes (RASSI, 1979). Após 30 a 60 dias de infecção, a
28 parasitemia normalmente regride em virtude da resposta imune, mas o parasito não é
29 totalmente eliminado. A fase aguda segue por um longo período de latência, (LOPES &
30 CHAPADEIRO, 1997), que apresenta, à autópsia, coração com parasitismo raro, inflamação
31 discreta sendo a fibrose ausente ou cicatricial (LOPES et al., 1981). Nesta fase, o grau de
32 comprometimento das células do coração varia desde formas discretas, assintomáticas até
33 formas graves, eventualmente fatais (LOPES & CHAPADEIRO, 1997).

1 Durante a fase crônica, ocorre a forma indeterminada, que tem seu início de dois a
2 quatro meses após a infecção (PRATA, 1990), podendo os indivíduos permanecer
3 indefinidamente neste estágio (DIAS, 1989; PRATA, 1990). A fase crônica é caracterizada
4 pela parasitemia baixa e pelo elevado número de anticorpos circulantes. As manifestações
5 observadas nesta fase são decorrentes da presença de ninhos de amastigota nos tecidos
6 (FERREIRA et al., 2002). Na fase crônica, na forma indeterminada, as lesões são
7 caracterizadas por epicardite crônica, com infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, que
8 acomete também o tecido gorduroso subepicárdico, estendendo aos gânglios e miocardite
9 focal discreta com exsudação de células mononucleadas entre miocardiócitos, ou então,
10 formando pequenos nódulos, que lembram granulomas. Os fenômenos regressivos dos
11 miocardiócitos são muito discretos e praticamente não há fibrose, a não ser pequenos focos de
12 tipo cicatricial (LOPES et al., 1981). A maioria dos autores tem demonstrado em estudos de
13 necropsias (MIGNONE, 1958) ou biópsias endomiocárdicas (MADY et al., 1981), que
14 chagásicos na forma indeterminada apresentam inflamação no tecido cardíaco. O que
15 diferencia estes achados daqueles observados em cardiopatas é a intensidade do processo
16 inflamatório que é menor no grupo assintomático (LOPES et al., 1981). Na forma cardíaca,
17 ocorre principalmente miocardite crônica progressiva e fibrosante e/ou hipertrofia do coração
18 (megacárdio) (FERRAZ et al, 2007).

19 A miocardite é um dos principais processos patológicos observados na doença de
20 Chagas, ocorrendo tanto na fase aguda como na fase crônica, sendo nesta última, relatada
21 como desproporcional em relação ao parasitismo tecidual (BRENNER, 2000). Embora ainda
22 existam controvérsias (HIGUCHI, 1997), desde o início do século passado, os autores
23 chamaram atenção para o fato do infiltrado inflamatório parecer mais lesivo para as fibras
24 cardíacas do que para os próprios parasitas (VIANA, 1911; MAYER, 1914; CHAGAS, 1916).
25 Nesta fase, a miocardite é caracterizada fundamentalmente por um infiltrado de células
26 mononucleares, destruição de fibras miocárdicas no foco inflamatório, áreas de fibrose e raros
27 parasitos nas lesões (BRENNER, 2000). Estudos experimentais foram realizados em coelhos
28 isogênicos infectados por *T. cruzi* ou imunizados com frações subcelulares do parasita.
29 Verificou-se que os animais imunizados apresentaram intensa resposta imune mediada por
30 células tanto contra antígenos do parasito quanto contra antígenos do miocárdio (SANTOS-
31 BUCH & TEIXEIRA, 1974; TEIXEIRA & SANTOS-BUCH, 1975). Foi encontrada em
32 coelhos infectados e em humanos chagásicos, linfotoxicidade contra fibras cardíacas,
33 parasitadas ou não (SANTOS-BUCH & TEIXEIRA, 1974). Estes dados experimentais

1 indicaram que a destruição de fibras cardíacas em pacientes chagásicos poderia ser mediada
2 por mecanismos estabelecidos logo após a infecção com *T. cruzi* e que seriam perpetuados
3 pela contínua estimulação antigênica durante o curso da doença (SANTOS-BUCH &
4 TEIXEIRA, 1974).

6 **1.3 Fatores do hospedeiro envolvidos no controle da infecção e na patogênese da doença** 7 **de Chagas**

9 São bem conhecidos e estudados os aspectos anatomopatológicos das diversas
10 fases da doença de Chagas, mas ainda, não se conhece como se processa a evolução de uma
11 fase para a seguinte, mostrando ser um processo patológico complexo, pouco entendido e
12 bastante discutido. Várias teorias já foram propostas para tentar esclarecer porque o coração é
13 alvo de tão grave agressão e apenas alguns indivíduos desenvolvem a cardiopatia. Margarino
14 Torres foi o primeiro, em 1929, a levantar a hipótese de que na cardiopatia chagásica,
15 poderiam ocorrer fenômenos de hipersensibilidade envolvidos na gênese dessa lesão. A
16 participação de mecanismos auto-ímmunes tem sido também postulada como causa da
17 miocardite chagásica crônica (ANDRADE, 1983; RIBEIRO DOS SANTOS & ROSSI, 1985;
18 KIERSZENBAUM, 1976). Outros autores admitem que, talvez, exista um desvio na
19 regulação da resposta imunológica que poderia ter um papel na patogênese das lesões
20 miocárdicas (ANDRADE et al., 1991; SILVA & ROSSI, 1990). Trabalhos têm demonstrado a
21 presença de antígenos do *T. cruzi* em associação com infiltrado inflamatório, através de
22 técnicas de imunohistoquímica e de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), sugerindo
23 participação direta do parasito na gênese dessa miocardite. Admite-se hoje, que a patogênese
24 da miocardite chagásica esteja diretamente relacionada com a presença do parasito e ao
25 padrão de resposta imune do hospedeiro (JONES et al., 1993; HIGUCHI, 1995; MORTARA
26 et al., 1999; PALOMINO et al., 2000).

27 A reação inflamatória depende de linfócitos T sensibilizados tendo em vista que
28 em camundongos atímicos infectados com *T. cruzi*, a despeito de um intenso parasitismo
29 tecidual, não há resposta inflamatória no miocárdio (GONÇALVES-DA-COSTA et al.,
30 1984). Baseado nestas observações sugere-se que mesmo a miocardite da fase aguda é
31 dependente de linfócitos T sensibilizados contra antígenos do *T. cruzi* (RIBEIRO-DOS-
32 SANTOS & ROSSI, 1985). Células T sensibilizadas reconheceriam fibras cardíacas e
33 poderiam levar à destruição das mesmas, diretamente ou via ativação de macrófagos. Outro

1 mecanismo de destruição, descrito posteriormente, poderia ser por citotoxicidade celular
2 dependente de anticorpo (LAGUENS et al., 1988). Embora haja variação dos modelos
3 experimentais, outros autores não conseguiram demonstrar aumento de reconhecimento de
4 fibras cardíacas isólogas, na presença ou não de anticorpo anti *T. cruzi* (MORTATTI et al.,
5 1990).

6 Camundongos BALB/c cronicamente infectados com *T. cruzi*, rejeitam corações
7 sigenêicos transplantados por um mecanismo dependente de linfócitos T CD4⁺, mas não de
8 linfócitos T CD8⁺. Nesse mesmo trabalho os autores demonstraram que células T CD4⁺ de
9 animais infectados cronicamente, proliferam *in vitro* em resposta a antígenos do miocárdio e,
10 quando injetados *in situ*, induzem destruição de coração transplantado (RIBEIRO-DOS-
11 SANTOS et al., 1992). É possível que os linfócitos T CD4⁺ atuem principalmente atraindo
12 outras células (provavelmente via citocinas e/ou quimiocinas) para o sítio inflamatório, as
13 quais poderiam, via mecanismos líticos, acabar lesando fibras cardíacas.

14 Outra célula possivelmente envolvida no mecanismo de lesão tecidual é o
15 macrófago. Experimentalmente, foi verificado que os macrófagos ativados podem induzir
16 lesão celular no tecido cardíaco de camundongos infectados (ROSSI & SILVA, 1990).

17 Existem várias hipóteses para explicar o aparecimento de cardiomiopatias em
18 pacientes ou animais infectados por *T. cruzi* (ANDRADE, 1983; RIBEIRO DOS SANTOS &
19 ROSSI, 1985; KIERSZENBAUM, 1976; ROSSI & RAMOS, 1996; BRODSKYN &
20 BARRAL-NETO, 2000), entre elas: 1) resposta imune contra autoantígenos, levando a uma
21 possível doença autoimune; 2) substâncias cardiotóxicas ou neurotóxicas produzidas pelos
22 parasitos; 3) cardiopatia como consequência de uma neuropatia autonômica, 4) parasitos
23 como indutores da formação de microtrombos desencadeando o comprometimento da
24 microvasculatura coronária, miocitólise e inflamação crônica; 5) antígenos parasitários que
25 persistem no coração seriam alvos de linfócitos T ou de anticorpos levando a uma inflamação
26 cardíaca.

27 Considerando que existem dados experimentais consistentes com cada uma das
28 hipóteses acima enumeradas, é possível que a cardiopatia chagásica seja o resultado de um
29 somatório de eventos patogênicos, sendo que cada um deles poderia estar contribuindo em
30 maior ou menor extensão, dependendo do tempo de infecção, da cepa do parasito infectante,
31 de condições metabólicas e ambientais, genética e idade do hospedeiro, entre outras.

32 A natureza da imunidade protetora adquirida contra a infecção por *T. cruzi* e os
33 mecanismos pelos quais o parasito evade da resposta imune do hospedeiro não foram ainda

1 totalmente esclarecidos, embora muitas evidências mostrem a participação das respostas
2 celular (ROBERSON et al., 1973; TARLETON, 1990; NICKELL, KEANE & SO, 1993) e
3 humoral nesse processo (TAKEHARA et al., 1981; KRETTLI & BRENER, 1982;
4 TAKEHARA et al., 1989).

5 A imunidade celular é importante para a proteção à infecção experimental por *T.*
6 *cruzi* visto que camundongos geneticamente desprovidos de timo (KIERZENBAUM &
7 PIENKOWSKI, 1979) ou timentomizados logo após o nascimento (SCHMUNIS et al., 1971)
8 apresentam um aumento da suscetibilidade a *T. cruzi*. Estes resultados sugerem que linfócitos
9 T conferem resistência à infecção. Tanto a depleção de células T CD4⁺ (RUSSO et al., 1988)
10 como de células CD8⁺ (TARLETON et al., 1990) aumenta a susceptibilidade de animais à
11 infecção, induzindo maiores níveis de parasitemia e mortalidade. As células T CD8⁺ possuem
12 um papel no controle da resposta imune da infecção, pois o efeito protetor da vacinação de
13 animais com uma cepa avirulenta de *T. cruzi*, foi abolido após o tratamento com anticorpo
14 anti-CD8⁺ (TARLETON et al., 1990), e ainda, a ausência de células CD8⁺ em camundongos
15 mutantes para o gene da β2-microglobulina resulta no aumento da susceptibilidade à infecção
16 (TARLETON et al., 1992).

17 18 **1.3.1 Citocinas envolvidas na resposta imune contra o *Trypanosoma cruzi***

19
20 As citocinas são substâncias protéicas solúveis produzidas pelas células que
21 alteram o comportamento ou as propriedades delas mesmas e de outras células. Algumas das
22 citocinas liberadas em resposta à infecção pertencem a uma família de proteínas intimamente
23 relacionadas, que são as quimiocinas (NELSON & KRENSKY, 1998). As quimiocinas são
24 polipeptídeos de baixo peso molecular sintetizados pelos fagócitos e por muitos outros tipos
25 celulares (ABBAS, LICHTMAN, & POBER, 1998).

26 As citocinas podem assumir amplas funções, ou seja, atuam como mediadores da
27 imunidade natural, que são estimulados por agentes infecciosos, pelos fagócitos
28 mononucleares, e pelos estímulos em resposta ao reconhecimento antigênico específico pelos
29 linfócitos T. A estimulação das células inflamatórias, em resposta ao reconhecimento de
30 antígenos específicos pelos linfócitos T promove o crescimento, a diferenciação e a ativação
31 de leucócitos que estão envolvidos na resistência ao microrganismo e na lesão do tecido do
32 hospedeiro (ABBAS, LICHTMAN & POBER, 1998).

1 De acordo com o padrão de citocinas os linfócitos T foram divididos em
2 subpopulações (MOSSMANN et al., 1986). A subpopulação definida como Th1 secreta
3 interleucina-2 (IL-2), TNF-a e IFN- γ , induzindo preferencialmente resposta imune mediada
4 por células, e a outra foi chamada Th2 que produz IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10, auxiliando desta
5 forma a resposta imune humoral uma vez que estas citocinas atuam na mudança de isotipos
6 das imunoglobulinas (COFFMAN et al., 1988; BOOM, LIANO & ABBAS, 1988).

7 Células capazes de secretar citocinas tanto dos padrões Th1 como Th2 são
8 denominadas Th0. As células T que secretam TGF- β são denominadas Th3 e atuam
9 predominantemente nas mucosas através da apresentação mucosa de antígenos (LETTERIO
10 & ROBERTS, 1997). As células T reguladoras (Treg) são linfócitos T CD4 que secretam IL-
11 10 e inibem a resposta proliferativa de outras populações de linfócitos T CD4 (GROUX et al.,
12 1997).

13 O papel das citocinas na susceptibilidade e resistência à infecção por *T. cruzi*
14 ainda não foi totalmente elucidado. Estudos experimentais *in vitro* apontam que no local da
15 infecção, e em linfonodos e baço, os macrófagos e células dendríticas infectadas
16 possivelmente secretam citocinas como IL-12, TGF- β , IL-10 e TNF-a , ainda outros trabalhos
17 já sugerem que outras citocinas como IL-6 e IL-1 podem ser produzidas por macrófagos ou
18 células endoteliais (TANOWITZ et al., 1992; TRUYENS et al., 1994). Uma das principais
19 funções de IL-12 seria estimular células NK a produzirem IFN- γ (CHAN et al., 1991),
20 possivelmente induzindo a produção de IFN- γ *in vivo* nos animais infectados.

21 22 **1. 3. 1. 1 Interferon gama (IFN- γ)**

23
24 O IFN- γ é uma citocina produzida principalmente pelas células T CD8⁺ efectoras, e
25 por células CD4⁺ do subtipo Th1 cuja, função principal é ativação de macrófagos. O gene que
26 codifica o IFN- γ está localizado no cromossomo 12q15, e a citocina apresenta-se geralmente
27 como um homodímero formado por duas cadeias em associação antiparalela (EALICK et al.,
28 1991). Foi também demonstrada sendo expressa em células musculares juntamente com o
29 TNF- γ em pacientes que sofrem de miopatia vacuolada ligada ao X (ROUGER et al., 2001).
30 Essa citocina tem sido extensivamente estudada na doença de Chagas, e é considerada uma
31 citocina protetora, especialmente na fase aguda, uma vez que macrófagos estimulados
32 produzem metabólitos tóxicos para o parasito (REED, 1988; VESPA, CUNHA & SILVA,
33 1994; BAHIA-OLIVEIRA et al., 2000). Por outro lado, o encontro de grandes quantidades de

1 células produtoras dessa citocina em pacientes cardiopatas chagásicos crônicos (CCC) tem
2 colocado o IFN- γ como um importante fator que influencia o desenvolvimento da CCC nos
3 indivíduos infectados pelo *T. cruzi* (BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998). O IFN- γ leva a
4 produção de óxido nítrico e diferenciação para a resposta imune adquirida Th1. Essa produção
5 de IFN- γ é regulada pelas citocinas IL-10, IL-4 e o fator de crescimento e transformação - β
6 (TGF- β) (BRENER & GAZZINELLI, 1997).

7 Em modelos experimentais, a produção de IFN- γ na fase inicial da infecção está
8 relacionada principalmente ao estímulo de IL-12 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996).
9 O IFN- γ , IL-12 e iNOS agem no controle do parasitismo por *T. cruzi* em miocardiócito e IL-4
10 age antagonicamente em camundongos deficientes na produção destas citocinas
11 (MICHAJLOWSKY et al., 2001). Camundongos deficientes no receptor de IFN- γ são
12 incapazes de sobreviver mesmo a baixas doses de infecção, com lesões teciduais e aumento da
13 parasitemia (HÖLSCHER et al., 1998). Animais geneticamente modificados, incapazes de
14 sintetizar IFN- γ apresentam maior parasitemia e mortalidade quando comparados a
15 camundongos normais (ALIBERTI et al., 2001).

16 Algumas pesquisas indicam que apesar de auxiliar na proteção do organismo
17 contra o parasitismo, a resposta imune do hospedeiro talvez possa assumir um caráter auto-
18 imune e contribuir para o desenvolvimento de patologia. Trabalhos relacionaram a resposta
19 Th1 ao desenvolvimento de formas graves da doença de Chagas (GOMES et al., 2003).

20 O IFN- γ é uma citocina que tem sido citada em diferentes modelos experimentais
21 como um dos principais fatores na destruição do parasito. Em modelo experimental utilizando
22 C57BL/6, foi observada a presença de IFN- γ no início da infecção, sendo a citocina
23 predominante do décimo quinto ao trigésimo dia, enquanto que, em 60 dias, o balanço entre
24 Th1 e Th2 foi invertido em favor de Th2 com a produção de IL-4 e IL-10. Animais resistentes
25 à infecção utilizam-se inicialmente da citocinas do perfil Th1, mas as citocinas do perfil Th2
26 aparecem em um momento mais tardio (TALVANI et al., 2000).

27 Existe uma variação na produção de IFN- γ em diferentes modelos murinos
28 relacionada com a resistência que estes animais apresentam a infecção por *T. cruzi*.
29 Camundongos BALB/c infectados com cepa Talahuén de *T. cruzi* produzem uma parasitemia
30 muito precoce. As células do baço destes animais liberam IFN- γ na segunda semana de
31 infecção, enquanto que camundongos C3H/He, resistentes à infecção, produzem IFN- γ dois
32 dias após serem infectados (ANTÚNEZ & CARDONI, 2001).

1 O equilíbrio entre os padrões Th1 e Th2 pode ser fundamental para o sucesso ou
2 fracasso do parasitismo e a expressão de citocinas é dependente do tempo da infecção das
3 células produtoras e da espécie hospedeira. Neutrófilos podem produzir diferentes citocinas e
4 conferir resistência ou susceptibilidade a infecção por *T. cruzi*. Camundongos de média
5 susceptibilidade ao *T. cruzi*, BALB/c tratados com anticorpos monoclonais, para neutralizar
6 neutrófilos, apresentaram diminuição das citocinas do padrão Th1 (IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF-
7 α), exacerbação da doença e aumento das citocinas de Th2, como IL-10, no primeiro dia após
8 a infecção, estabelecendo, em um primeiro momento, a importância das citocinas de Th1 para
9 destruição dos parasitos. A depleção de neutrófilo de camundongos C57BL/6 induz
10 resistência à doença e exacerbação das citocinas de Th1, embora os níveis de IL-10
11 permaneçam elevados. A mesma célula pode apresentar papéis opostos em diferentes
12 linhagens de camundongos, com exacerbação ou proteção da infecção por *T. cruzi* (CHEN et
13 al., 2001).

14 O IFN- γ inibe a produção de células Th2 (GAJEWSKI & FITCH, 1990),
15 enquanto a IL-4 inibe a expressão do receptor da IL-2 e a produção de IFN- γ (PELEMAN et
16 al., 1989; MARTINEZ et al., 1990) e a IL-10 inibe a síntese de citocinas pelas células Th1
17 (FIORENTINO et al., 1989; MOORE et al., 1990) dependente de células acessórias, sendo o
18 padrão imune determinado através do perfil de citocinas secretadas (FIORENTINO et al.,
19 1989). A IL-12, previamente conhecida como fator estimulador de células NK, é uma citocina
20 capaz de direcionar o fenótipo de células T para Th1. A IL-12 estimula a produção de IFN- γ
21 pelos linfócitos T e células NK, e aumenta o número de células Th1 *in vivo* (SCOTT, 1993;
22 TRINCHIERI, 1993). Desta forma, como o IFN- γ pode apresentar um efeito de regulação
23 positiva aumentando a produção de IL-12 por macrófagos, a IL-10 e IL-4, com perfis Th2,
24 inibem sua secreção (TRINCHIERI, 1993; SEDER et al., 1993).

25 Estudos apontam que citocinas secretadas por linfócitos T de camundongos
26 infectados ativam macrófagos para eliminarem os parasitos (NOGUEIRA & COHN, 1978;
27 NICKELL et al., 1987). Sozinho ou associado ao TNF- α , o IFN- γ é um dos melhores
28 indutores da atividade microbicida de macrófagos em várias infecções por parasitas
29 intracelulares, incluindo *T. cruzi* (SHER & COFFMAN, 1992; MUÑOZ-FERNÁNDEZ et al.,
30 1992; SILVA et al., 1992; SILVA et al., 1995).

31 O IFN- γ , apresenta importante papel na infecção por parasitas intracelulares,
32 inclusive *T. cruzi*. A administração de IFN- γ recombinante em camundongos aumenta a

1 resistência à infecção pelo *T. cruzi*, levando à diminuição da parasitemia e aumento da
2 sobrevida (REED, 1988).

3

4 **1. 3. 1. 2 Óxido Nítrico – (NO)**

5

6 Também conhecido como importante agente microbicida produzido por
7 macrófagos ativados, o óxido nítrico (NO) é um gás muito reativo, possui vida média de 3 a
8 30 segundos, oxidando em seguida para nitrito (NO₂⁻) ou nitrato (NO₃⁻) (MARLETTA et al.,
9 1988; MAYER et al., 1989; HEVEL et al., 1991, MULLIGAN, WHITE & MARLETTA,
10 1991). Ele é produzido, por um conjunto de enzimas, coletivamente chamadas de sintase de
11 óxido nítrico (NOS), que desaminam a L-arginina para liberar o NO, levando a co-produção
12 de L-citrulina (MULLIGAN, WHITE & MARLETTA, 1991). A iNOS catalisa a conversão
13 de arginina em citrulina, liberando gás óxido nítrico difundível, que pode se combinar com
14 peróxido ou superóxido de hidrogênio gerado pela enzima fagócito-oxidase nos fagossomas
15 ácidos, para produzir radicais peroxinitritos altamente reativos, que podem matar micróbios
16 (GRANGER et al., 1988). Existem várias isoformas de óxido nítrico sintase (NOS), podendo
17 diferir quanto à disposição dos tecidos, peso molecular e propriedades físicas e funcionais.
18 Propõe-se atualmente, a existência de pelo menos três genes que apresentam “splicing”
19 alternativos para produção dessa enzima (BREDT et al., 1991; LAMAS et al., 1992;
20 LOWENSTEIN et al., 1992). Podem ser agrupadas em, sintase do óxido nítrico induzível
21 (iNOS), sintase do óxido nítrico constitutiva (cNOS) e sintase do óxido nítrico endotelial
22 (eNOS). A cNOS e a eNOS são encontradas no sistema nervoso central e no endotélio
23 vascular, respectivamente, e produzem constitutivamente baixas quantidades de NO
24 (PALMER et al., 1988; MONCADA, PALMER & HIGGS, 1991).

25 Em modelos experimentais, a inibição farmacológica da iNOS inibe a capacidade
26 microbicida do macrófago e promove aumento da parasitemia (SILVA et al., 1995;
27 MARTINS et al., 1998). Estes achados têm demonstrado que a resistência à infecção pelo *T.*
28 *cruzi* está associada com a capacidade dos linfócitos produzirem IFN- γ (MUÑOZ-
29 FERNÁNDEZ, FERNANDEZ & FRESNO, 1992), os quais ativam os macrófagos a
30 produzirem NO, uma molécula efetora que tem a capacidade de controlar a multiplicação
31 intracelular do *T. cruzi* (GAZZINELLI, OSWALDO & JAMES, 1992; VESPA, CUNHA &
32 SILVA, 1994).

1 Camundongos deficientes em receptor de IFN- γ (IFN- γ R^{-/-}) ou deficientes na
2 sintase induzida de óxido nítrico (iNOS^{-/-}) apresentaram elevada susceptibilidade a infecção
3 por *T. cruzi*, com aumento da parasitemia e mortalidade (HOLSCHER et al., 1998). Este fato
4 demonstra a dependência do IFN- γ na indução de iNOS, fator de resistência essencial durante
5 a fase aguda da infecção (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996). O NO inibe a replicação
6 intracelular do *T. cruzi* em macrófagos infectados. Este mecanismo é ativado por células Th1
7 (SILVA et al., 1995). Embora a iNOS esteja associada como fator de resistência, em um
8 estudo com camundongos deficientes na produção desta enzima, foi observado que o iNOS
9 tem papel importante na dilatação ventricular progressiva e na disfunção sistólica em
10 camundongos, durante miocardite aguda ocasionada por *T. cruzi* (CHANDRA et al., 2002).

11 Estudos em miocardiócitos de camundongos demonstram a presença de iNOS,
12 quando estas células foram estimuladas com IL-1, TNF- α e IFN- γ , simultaneamente,
13 resultando em elevados níveis de nitrito e morte do *T. cruzi* (CHANDRA et al., 2002).

14 A iNOS e cNOS diferem quanto à distribuição tecidual e sensibilidade aos agentes
15 farmacológicos e fisiológicos de regulação. A expressão de iNOS em macrófagos é induzida
16 após o estímulo imunológico e necessita da transcrição do DNA (LORSBACH et al., 1993).
17 Quando ativados, os macrófagos podem liberar e sintetizar grandes quantidades de NO por
18 períodos longos. Por outro lado, o óxido nítrico pode ser produzido constitutivamente pela
19 cNOS que pode ser encontrada em tecidos tais como endotélio vascular, cérebro, adrenal e
20 plaquetas (MONCADA, 1992).

21 Macrófagos de murinos expressam altos níveis de iNOS e produzem grandes
22 quantidades de NO quando estimulados simultaneamente com IFN- γ e LPS *in vitro*. O pico de
23 expressão de NOS ocorre 12 horas após a estimulação e rapidamente declina, e em 72 horas
24 alcança níveis compatíveis com os controles não estimulados. Os macrófagos podem ser
25 reativados repetidamente, expressando iNOS em níveis e tempo idênticos à primeira ativação
26 (CUNHA et al., 1993).

27 Sobre ação destas citocinas inflamatórias, outras células podem também expressar
28 a iNOS (MACHADO et al., 2000). O NO é uma molécula com potentes efeitos microbicidas,
29 especialmente em combinação com a H₂O₂, quando formam o peroxinitrito (BECKMAN et
30 al., 1990). Estudos experimentais mostraram que o NO é um importante mediador da
31 imunidade anti-*T. cruzi* durante a infecção aguda (VESPA, CUNHA & SILVA, 1994), e
32 recentemente foi associado à desnervação do plexo mioentérico do cólon de camundongos
33 infectados (ARANTES et al., 2004). Entretanto, pouco se conhece de seus efeitos durante a

1 fase crônica da infecção, especialmente no tecido cardíaco. O NO apresenta potencialmente
2 efeitos regulatórios anti-fibróticos, que uma vez manifestos, poderiam atenuar o
3 desenvolvimento da fibrose, observada nos casos mais graves da cardiopatia chagásica
4 crônica. Por outro lado, o NO está envolvido na indução de apoptose, o que poderia contribuir
5 para a destruição de miocélulas (SAM et al., 2001), além de apresentar efeito inotrópico
6 negativo (BIRKS & YACOUN, 1997), fenômenos também observados na cardiopatia
7 chagásica crônica, humana e experimental. O efeito de uma característica natural Th1 ou Th2
8 também pode trazer influências na produção de NO, assim a expressão de iNOS estaria
9 diferenciada em camundongos da Linhagem BALB/c (Th2) comparados com a C57BL/6
10 (Th1).

11 Em conjunto, resultados de trabalhos sugerem que estímulos que levam a
12 produção de citocinas pró-inflamatórias podem desencadear a produção de NO coração.
13 Quanto à infecção por *T. cruzi*, a produção de NO pode ter várias conseqüências, entre elas, a
14 mediação de atividade tripanocida, a indução de apoptose em leucócitos presentes no foco
15 inflamatório e a alteração da função contrátil do miocárdio (MACHADO et al, 2000). No que
16 diz respeito à atividade tripanocida por miócitos, estudos sugerem que ratos infectados com *T.*
17 *cruzi* apresentam aumento nas expressões de iNOS e citocinas pró-inflamatórias no coração
18 (CHANDRASEKAR et al., 1998). Resultados de outro estudo confirmam essa hipótese
19 mostrando que cardiomiócitos infectados com *T. cruzi* e/ou estimulados com IFN- γ , TNF- α e
20 IL-1 β apresentaram atividade da enzima iNOS, e produzem NO, que é capaz de controlar o
21 crescimento do parasito intracelular, apontando que NO produzido por cardiomiócitos pode
22 controlar a replicação de parasitas no tecido cardíaco (MACHADO et al, 2000).

23

24 **1. 3. 2 Quimiocinas**

25

26 Outros mediadores envolvidos no controle da resposta imune denominados
27 quimiocinas, compreendem uma família de citocinas quimiotáticas de baixo peso molecular
28 (8-12 KDa) (ROLLINS, 1997), cujo efeito biológico mais estudado seria a capacidade de
29 mediar recrutamento celular. As quimiocinas participam do processo inflamatório,
30 promovendo a ativação das integrinas envolvidas, que por sua vez estão envolvidas na adesão
31 das células ao vaso, sua expressão localizada nos tecidos gera gradientes quimiotáticos
32 responsáveis pela migração direcionada e manutenção das células nestes locais
33 (MANTOVANI, 1999).

1 Estas quimiocinas foram conhecidas como quimioatraentes a partir da
2 caracterização da IL-8 (YOSHIMURA, 1989). Bem como a IL-8, as primeiras quimiocinas
3 foram descobertas e caracterizadas por sua associação a respostas inflamatórias, e com o
4 decorrer do tempo, outras com funções biológicas adicionais foram acrescentados a essa
5 grande família de fatores de migração celular (ROSSI & ZLOTNIK, 2000).

6 Mais de 50 quimiocinas têm sido identificadas, e classificadas em famílias C, CC,
7 CXC e CX₃C, dependendo da posição de suas duas primeiras cisteínas residuais (CLARK-
8 LEWIS et al., 1995).

9 A família das CC quimiocinas (β), recebem essa denominação por possuírem as
10 duas primeiras cisteínas (CC) próximas ao domínio amino terminal, adjacentes uma a outra,
11 enquanto as CXC quimiocinas (α) apresentam um aminoácido localizado entre as duas
12 primeiras cisteínas próximas ao domínio amino terminal. As C quimiocinas (γ) apresentam
13 um resíduo de cisteína na porção amino terminal. Já as C₃CX quimiocinas (δ), apresentam
14 três aminoácidos intercalados entre duas cisteínas conservadas (ROLLINS, 1997; GALE &
15 MCCOLL, 1999).

16 As quimiocinas são quimioatrentes para linfócitos, monócitos, células dendríticas,
17 células NK, eosinófilos, e basófilos, com variada seletividade, mas não atuam nos neutrófilos
18 (BAGGIOLINI et al., 1997; MANTOVANI, 1999). As CXC quimiocinas podem ser
19 subdivididas em dois grupos, caracterizadas pela presença ou ausência da seqüência ELR,
20 respectivamente denominadas ELR⁺ ou ELR⁻. O ELR corresponde à seqüência dos
21 aminoácidos ácido glutâmico-leucina-arginina que precede as duas primeiras cisteínas da
22 molécula. As CXC quimiocinas ELR⁺ estão relacionadas a quimiotaxia de neutrófilos,
23 enquanto as CXC quimiocinas ELR⁻ exercem seu efeito quimiotático sobre linfócitos,
24 principalmente. A família C é fator quimioatraente para linfócitos e apresenta dois
25 representantes descritos. A fractalquina é o único representante descrito da família CX₃C,
26 sendo esta a única quimiocina que pode ser encontrada associada à membrana celular,
27 possibilitando uma firme adesão as células endoteliais sem a necessidade de ativação das
28 integrinas (ROLLINS, 1997).

29 As quimiocinas desempenham um papel fundamental na fisiologia leucocitária
30 controlando o processo de desenvolvimento e maturação dos leucócitos, bem como sua
31 recirculação fisiológica (células mononucleares), sendo denominadas quimiocinas
32 constitutivas. Outras quimiocinas, ao contrário, mostram-se mais atuantes em condições
33 inflamatórias, direcionando células aos órgãos linfóides secundários e ao foco inflamatório

1 (ROSSI & ZLOTNIK, 2000). Padrões pró-inflamatórios de resposta são geralmente
2 associados com resposta do tipo Th1, com a expressão de quimiocinas que atraem
3 seletivamente um infiltrado celular polarizado Th1 para o sítio inflamatório (ORLOFSKY et
4 al., 1994; KODELJA et al., 1998; HEDRICK et al., 1998; BONECCHI et al., 1988; ROSSI &
5 ZLOTNIK, 2000).

6 7 **1.3.2.1 MCP-1**

8
9 MCP-1 (Proteína Quimiotática de Monócitos) foi mais bem caracterizada como
10 pertencente à família das C-C quimiocinas (CLARK-LEWIS et al., 1995). Até o momento,
11 algumas foram identificadas em humanos: MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4 e MCP-5
12 (YOSHIMURA et al., 1989; VAN DAMME et al., 1990; UGUCCIONI et al., 1996;
13 GARCIA-ZEPEDA et al., 1996; SARAFI, et al., 1997) e podem exercer suas ações apenas
14 sobre monócitos e não sobre neutrófilos. Possuem certa homologia com suas cadeias protéicas
15 e podem executar ações complementares e superpostas. A MCP-1 possui homólogo em
16 camundongo, a quimiocina denominada JE (YOSHIMURA et al., 1989).

17 A MCP-1 é um potente quimioatraente para monócitos, células T e células NK
18 (LOETSCHER et al., 1996) e está implicada em doenças caracterizadas por infiltrados ricos
19 em monócitos (MATSUSHIMA et al., 1989; CHARO & TAUBMAN 2004). Possui ação
20 quimiotática de monócitos circulantes para o endotélio (FORTES et al., 2007) e é um
21 importante mediador no recrutamento de monócitos/macrófagos e na ativação destes nas
22 inflamações crônicas e neoplasias (CHEN et al., 1999). A MCP-1 presente na membrana
23 sinovial recruta macrófagos e perpetua a inflamação nas articulações de pacientes com artrite
24 reumatóide (CORRIGALL et al., 2001).

25 Trabalhos experimentais mostram que camundongos deficientes em MCP-1 são
26 incapazes de montar resposta Th2 (GU et al., 2000). A MCP-1 é uma quimiocina reconhecida
27 por induzir a produção de ânions superóxido, liberação de enzimas lisossomais, IL-1 e IL-6, e
28 por regular a expressão de moléculas de adesão em monócitos (ROLLINS, WALZ &
29 BAGGIOLINI, 1991).

30 Além de aumentar o potencial microbicida dos macrófagos, a MCP-1 tem
31 potencial pró-fibrótico (FERREIRA et al., 2006). Macrófagos estimulam a produção de
32 fibrose, através de estímulos de citocinas e fatores de crescimento (GHARAEI-KERMANI et
33 al., 1996) Além disso, estudos sugerem que a MCP-1 pode modular diretamente o fenótipo e a

1 expressão gênica do fibroblasto, estimulando o aumento do metabolismo e a produção de
2 matriz extracelular, como observado em modelo de fibrose na cardiopatia isquêmica
3 (FRANGOIANNIS et al., 2007).

4 Na doença de Chagas experimental estudos sugerem que a MCP-1 aumenta a
5 capacidade dos macrófagos na eliminação do *T. cruzi* e possivelmente por aumentar a
6 produção de NO (COELHO et al., 2002). Outro estudo aponta uma significativa expressão de
7 mRNA para iNOS nos macrófagos tratados com MCP-1 (BISWAS, SODHI & PAUL, 2001).

8 Portanto, o NO, citocinas e as quimiocinas possivelmente apresentam muitos
9 efeitos sobre as lesões observadas na miocardite chagásica crônica. Assim, no presente
10 estudo, foi avaliado o coração durante a fase aguda e crônica da infecção experimental pelo *T.*
11 *cruzi*, provenientes de animais com característica básicas Th1 (C57Bl/6-S) e nessa mesma
12 linhagem de animais deficientes em iNOS (C57/Bl6-KO).

14 **1.4 O camundongo como modelo experimental**

15
16 Modelos como camundongos, ratos e hamsters apresentam características
17 importantes na doença de Chagas experimental, onde se podem citar: a intensidade e
18 heterogeneidade do curso da infecção e diferenças nas lesões conforme as populações de
19 cepas utilizadas e essas características se expressam de forma diferente entre os modelos
20 resistentes e susceptíveis à doença (ANDRADE et al., 1985; ARAUJO-JORGE & CASTRO,
21 2000). Além das cepas, as linhagens dos camundongos também interferem no grau de
22 patogenicidade da doença de Chagas (ANDRADE et al., 1985). Os camundongos C57Bl/6
23 são considerados resistentes, já os camundongos BALB/c são considerados susceptíveis à
24 infecção pelo *T. cruzi* (ANDRADE et al., 1985; ARAUJO-JORGE e CASTRO, 2000).

25 O tratamento da doença de Chagas em modelos murinos, tem sido amplamente
26 utilizado. Esses animais são muito utilizados para o entendimento das características
27 biológicas das diferentes cepas de *T. cruzi*. Os camundongos knockouts, assim denominados
28 por apresentarem defeitos genéticos definidos (mutação nula homozigótica), surgem como
29 uma nova alternativa para a pesquisa. Esses camundongos apresentam eliminação proposital
30 de um ou mais genes, gerado por meio de recombinação homóloga (ABBAS et al., 2002).
31 Sequência de DNA homóloga ao gene que se deseja eliminar são transfectadas em células de
32 embrião. Posteriormente, as células são reimplantadas em fêmeas receptoras e a linhagem
33 deficiente é obtida (BABINET & COHEN-TANNOUDJI, 2001). Esta tecnologia tem

1 aumentado a compreensão das funções imunes, pela redução na expressão de componentes
2 imunológicos que acarretam uma resposta deficiente (YEUNG et al., 1994). Além disso, a
3 interação molecular envolvendo componentes imunológicos e a quimioterapia pode ser
4 detalhada em camundongos knockouts para citocinas, receptores de superfície celular,
5 moléculas de sinalização e fatores de transcrição (FERRAZ et al., 2007).

6 Na doença de Chagas foram realizados estudos com camundongos knockouts, que
7 elucidaram mecanismos da resposta imune e da patogênese (ARANTES et al., 2004;
8 CAMPOS et al., 2004; WAGHABI et al., 2002). Estudos apontam que camundongos
9 knockouts para IFN- γ ou iNOS infectados pelo *T. cruzi*, apresentam redução na deservação
10 intestinal quando comparados aos camundongos selvagens e que a deservação é causada
11 pela produção de NO estimulada pelo IFN- γ (ARANTES et al., 2004).

1 **2 JUSTIFICATIVA**

2

3 As citocinas e quimiocinas desempenham papel importante na regulação da
4 resposta imune e seguramente estão envolvidas, tanto na resistência, quanto nos mecanismos
5 relacionados com a imunopatologia na doença de Chagas. Sabe-se também que existe a
6 participação de várias moléculas no processo de defesa contra o patógeno, bem como nos
7 mecanismos de lesão tecidual. O óxido nítrico (NO) representa uma destas moléculas, com
8 potencial tripanocida. Alguns trabalhos experimentais mostram também que o NO é um
9 importante mediador da imunidade anti-*T. cruzi* durante a infecção aguda, porém, pouco se
10 conhece o seu potencial patogênico durante a fase crônica da infecção.

11 Portanto, conhecer a intensidade e os diferentes mecanismos de agressão
12 desencadeados na fase aguda e na fase crônica da infecção, parece ser fundamental para
13 entender os mecanismos envolvidos nas lesões, especialmente no tecido cardíaco.

1 **3 HIPÓTESE**

2

3 O Óxido Nítrico, o IFN- γ e a MCP-1 são moléculas importantes no
4 desenvolvimento das lesões cardíacas durante a fase aguda e crônica na doença de Chagas
5 experimental.

1 **4 OBJETIVOS**

2

3 **4.1 Objetivo geral**

4

5 - Analisar a contribuição do óxido nítrico, IFN- γ e MCP-1 no desenvolvimento da
6 inflamação e da fibrose cardíaca nas fases aguda e crônica da infecção experimental pelo *T.*
7 *cruzi*.

8

9 **4.2 Objetivos específicos**

10

11 - Analisar o processo inflamatório nos camundongos selvagens (C57BL/6-S) e
12 nos camundongos deficientes em iNOS (C57BL/6-KO) infectados por *T. cruzi* comparando
13 com animais controles.

14

- Quantificar a fibrose no tecido cardíaco destes animais;

15

- Quantificar o parasitismo tissular cardíaco na fase aguda e crônica;

16

- Verificar a produção de IFN- γ , e MCP-1 por células do baço destes animais.

1 **5 MATERIAL E MÉTODOS**

2

3 **5.1 Casuística**

4

5 No presente estudo foram analisados 45 animais. Destes, 27 eram da linhagem
6 C57BL/6 selvagens (C57BL/6-S) e 18 animais C57BL/6 eram deficientes em iNOS
7 (C57BL/6KO). Dos 27 animais C57BL/6-S, 3 camundongos foram separados para o grupo
8 controle não infectado, 12 foram infectados com a cepa Y e 12 foram infectados com a cepa
9 Colombiana. Entre os camundongos C57BL/6KO, 12 foram infectados com a cepa Y e 6
10 animais foram infectados com a cepa Colombiana. Entre os animais infectados com a cepa Y,
11 foram eutanasiados 6 animais C57BL/6-S e 6 animais C57BL/6KO na fase aguda da
12 infecção. Também foram infectados com a cepa Y e eutanasiados na fase crônica da infecção:
13 6 C57BL/6-S, 6 C57BL/6KO. Os animais infectados com a cepa Colombiana que foram
14 eutanasiados, na fase aguda da infecção, 6 eram C57BL/6-S e 6 eram C57BL/6KO. Na fase
15 crônica da infecção somente os 6 animais C57BL/6-S foram eutanasiados, visto que, os
16 animais C57BL/6KO não sobreviveram (Tabela 1).

17

18

19 **Tabela 1.** Distribuição do número de animais utilizados no estudo, de acordo com a linhagem, cepa inoculada e
20 fase da infecção

n	animais	cepa inoculada	infecção
6	C57BL/6KO	Y	aguda
6	C57BL/6KO	Y	crônica
6	C57BL/6KO	Colombiana	aguda
6	C57BL/6-S	Y	aguda
6	C57BL/6-S	Y	crônica
6	C57BL/6-S	Colombiana	aguda
6	C57BL/6-S	Colombiana	crônica
3	C57BL/6-S	controle	não infectado
N=45			

21

22

23

1 O exame parasitológico direto, dos animais infectados, foi realizado no sétimo dia
2 de infecção para a cepa Y e no décimo quarto dia de infecção para a cepa Colombiana.

3 O procedimento do exame parasitológico foi feito segundo o protocolo abaixo:

4 a) Assepsia da cauda de cada animal com gaze embebida em álcool etílico a 70%;
5 b) Corte a 1,5 mm da extremidade distal da cauda e coleta da segunda gota de
6 sangue sobre lâmina de vidro para microscopia;

7 c) Cobertura da gota de sangue sobre a lâmina com uma lamínula;

8 d) Exame ao microscópio de luz com objetiva de 40x;

9 e) Tratamento da ferida com solução de permanganato de potássio a 0,1% e
10 devolução dos animais às gaiolas.

11 Após constatar a parasitemia, os animais que desenvolveram a fase crônica da
12 doença receberam tratamento com 8,33 mg de benzonidasol/mL de água correspondendo a 20
13 comprimidos diluídos em 250mL de água de beber (Rochagan, Produtos Roche Químicos e
14 Farmacêuticos S. A. Registro MS – 1.0100.0074, Indústria Brasileira), via oral a partir do 15º
15 dia da infecção até a negatificação da parasitemia. Nos grupos experimentais, para cada
16 linhagem, os animais receberam uma única infecção e foram sacrificados após 120 dias. Cada
17 grupo foi composto por 6 animais. A eutanásia foi realizada através da inalação de éter etílico
18 e posterior necropsia, através de incisão ventral, onde coletou-se o baço para cultura de
19 células e o coração para estudo *in situ*. As demais vísceras de interesse foram coletadas e
20 armazenadas para análises posteriores.

21 Os animais foram mantidos e eutanasiados seguindo as recomendações do
22 Colégio Brasileiro de Experimentação Animal. Enquanto permaneceram no biotério da
23 Disciplina de Biologia Celular da UFTM, foram mantidos em gaiolas plásticas de 414 mm x
24 168 mm, em sala especial, com renovação constante de ar, à uma temperatura entre 20 e 25° C
25 e umidade entre 45 e 55%. A alimentação foi feita com ração comercial de composição
26 conhecida (Nuvilab-CR1, NUVITAL Nutrientes Produtos Veterinários Ltda – Curitiba- PR),
27 vitaminas termolábeis e água para beber oferecidas *ad libitum*. O alimento, a água para beber
28 e a serragem que serviu de forragem para as gaiolas passaram pelo processo de esterilização
29 em autoclave antes de serem oferecidos aos animais. Durante o período de experimento, os
30 animais eram supervisionados diariamente para verificação de eventuais óbitos.

1 **5.2 Obtenção do *Trypanosoma cruzi* para inóculo em camundongos**

2
3 Para produzir a infecção nos camundongos foram utilizados tripomastigotas
4 sangüíneos provenientes de camundongos Suíços, obtidos por sangria do plexo venoso retro
5 orbital (WAYNFORTH e FLECKNELL, 1992) em citrato de sódio a 3,8%, com auxílio de
6 uma pipeta Pasteur umedecida com heparina. O inóculo foi ajustado para a concentração de
7 3×10^3 tripomastigotas sangüíneos (BRENNER, 1962) administrado por via subcutânea. O
8 número de parasitos foi determinado após contagem de 5 μ L de sangue entre lâmina e
9 lamínula. O sangue foi diluído e ajustado a uma concentração de 3000 formas
10 tripomastigostas por 100 μ L. Cada animal foi infectado por via intraperitoneal com a injeção
11 de 100 μ L da suspensão de parasitas.

12 As formas epimastigotas foram cultivadas em meio Schneider, suplementado
13 com L-glutamina, carbonato de cálcio, e 20% de soro fetal bovino, para o preparo de
14 antígenos brutos do parasito.

15 As culturas foram mantidas em estufa a 29°C. No final da fase logarítmica do
16 crescimento, os parasitos foram coletados, e lavados 3 vezes por centrifugação (800g por min
17 4°C) com solução salina tamponada (PBS). Os parasitos foram contados em câmara de
18 Neubauer e resuspensos em água estéril a uma concentração de 10^8 parasitas/mL. A
19 suspensão foi submetida a 5 ciclos de congelação e descongelação para a lise completa, sendo
20 em seguida, aliqotado e armazenado em freezer -70°C e usado nas culturas de células
21 esplênicas.

22 23 **5.3 Processamento das lâminas**

24
25 Os fragmentos do coração foram fixados em formaldeído a 10% por 24 horas.
26 Após a fixação, foram submetidos ao processo de desidratação em uma série crescente de
27 álcool etílico, diafanização em xilol e inclusão em parafina, posicionando os fragmentos com
28 seu eixo longitudinal perpendicular ao plano de microtomia, obtendo-se então, cortes
29 transversais, e, para cada coração, dez cortes seriados com 5 μ m de espessura. Os cortes foram
30 aderidos às lâminas com o adesivo polilislina e submetidos à secagem. Em seguida foram
31 realizadas as colorações de rotina. As lâminas de número 1 foram coradas pela Hematoxilina
32 (solução alcoólica de hematoxilina adicionada a alúmen de potássio e óxido de mercúrio
33 vermelho) e Eosina (solução aquosa de stock de eosina y e floxina a 1% adicionada a ácido

1 acético glacial e álcool a 95%) (HE) (MICHALANY, 1980). Nas lâminas de número 2, foram
2 realizadas as colorações pelo picrossírius. As lâminas de número 3 foram utilizadas para a
3 técnica de imunohistoquímica para *T. cruzi*.

5 5.4 Quantificação do infiltrado inflamatório

6 Para a quantificação do infiltrado inflamatório, foram utilizadas as lâminas de
7 fragmento cardíaco coradas pela Hematoxilina e Eosina (HE). As imagens para análise dos
8 cortes de coração dos camundongos foram capturadas utilizando uma câmera de vídeo digital
9 (Evolution MP 5.0 – color – Media Cybernetic) acoplada a um microscópio de luz (Nikon –
10 Eclipse 50i) que envia as imagens para um computador (Pentium dual core duo) para serem
11 capturadas no programa “Image – Pro Plus” (MediaCybernetics). As imagens assim
12 capturadas foram visualizadas em dois monitores, e gravadas para posterior utilização com os
13 programa de análise de imagem “Image J”. Essas imagens foram calibradas através da lâmina
14 (Leica) com régua graduada em dois milímetros divididos em unidades de 0,01mm (dez
15 micrômetros) para a objetiva de dez vezes.

16 Para analisar o infiltrado inflamatório no coração foi utilizado um sistema teste de
17 contagem de pontos em uma área teste pré-determinada (MANDARIN DE-LACERDA,
18 2003). Para calcular o número de áreas teste ou campos, foi utilizada a fórmula de HALLY
19 (1964), com o qual se calculou o erro padrão relativo (EPR) onde V_v = densidade de volume
20 da estrutura em análise e n = número de pontos a serem contados.

$$21 \quad EPR = \sqrt{\frac{(1 - V_v)}{n}} \quad \text{Onde,} \quad V_v = \frac{P_p}{P_r} ; P_p = \text{a razão de pontos que atingem o coração}$$

22 onde há infiltrado inflamatório (miocardite) e P_r = número de pontos teste = 100.

23 O n calculado foi corrigido pela seguinte fórmula:

$$24 \quad n_{\text{corrigido}} = \frac{n_{\text{calculado}}}{V_v}$$

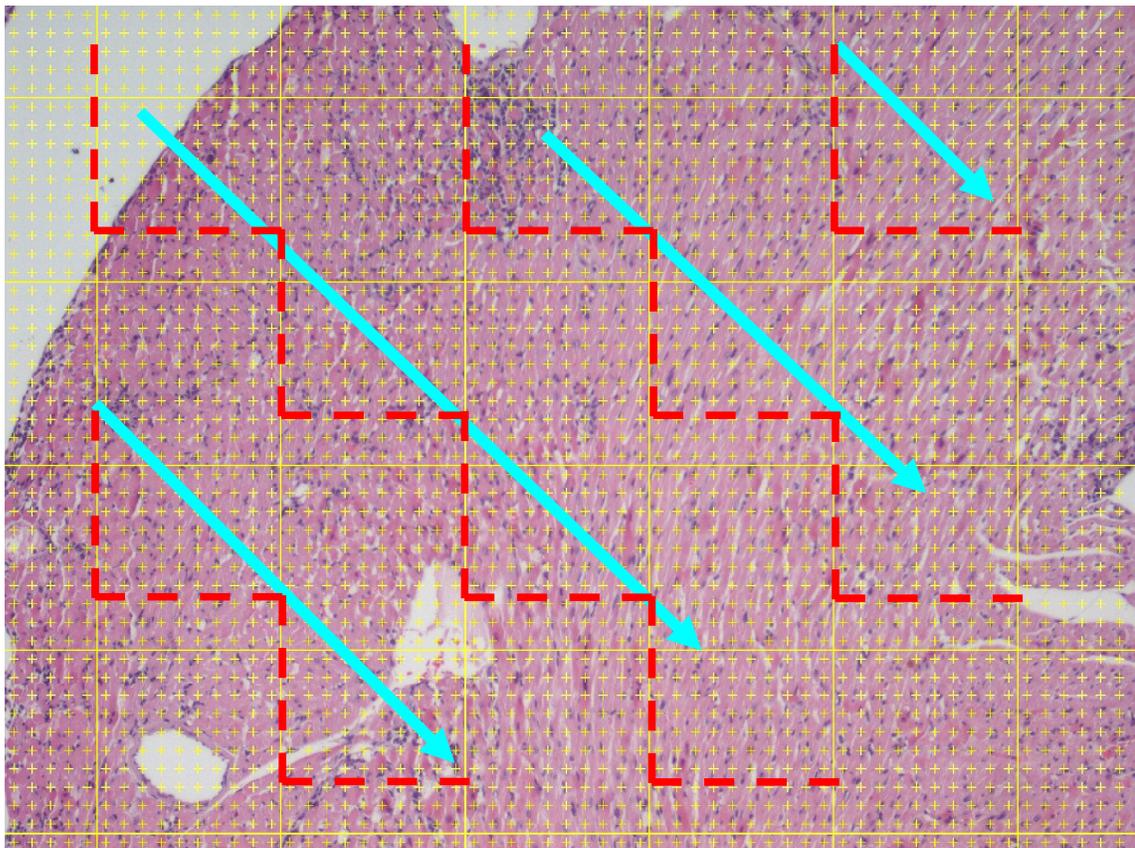
$$25 \quad n \text{ corrigido} = 384 * 0,04 = 9600 \text{ pontos}$$

1 Utilizamos o Erro Padrão Relativo igual a 10.000 pontos. Assim, analisamos ao
2 acaso, 100 imagens e cada imagem tinha 100 pontos com um tamanho de 234,88 μm x
3 234,88 μm onde cada ponto corresponde a 550 μm^2 totalizando uma área total de estudo de
4 5.500.000 μm^2 (Figura 1).

5 Para calcular a percentagem de infiltrado inflamatório foi utilizada a seguinte
6 formula: $\%M = ((\sum \text{pontos} * 550) / 5.500.000) * 100$ onde %M = percentagem de miocardite,
7 somatória do número de pontos que coincidiram com o infiltrado inflamatório vezes o valor
8 de 550 μm^2 que corresponde a área por ponto dividido pela área total de análise que
9 corresponde a 5.500.000 μm^2 . Este resultado se multiplica por 100 para obter a percentagem.

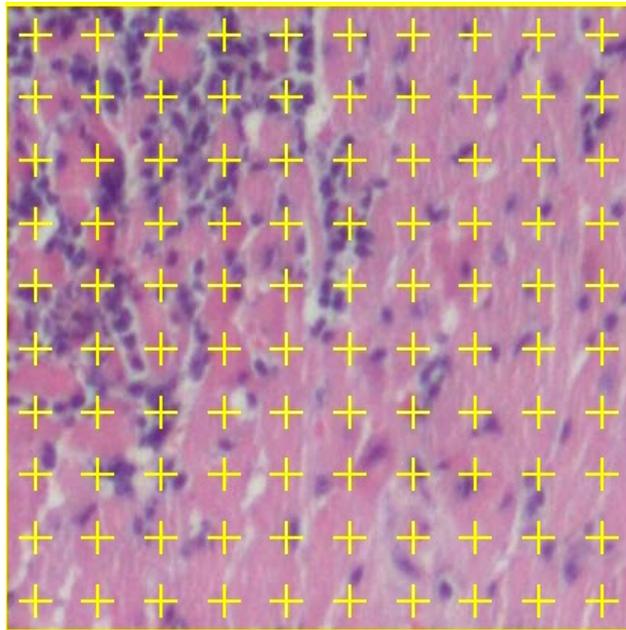
10 Para análise da miocardite, empregou-se o critério de "Dallas" (ARETZ, 1987).
11 Por definição, o diagnóstico de miocardite só pode ser feito quando três ou mais células
12 inflamatórias estivessem presentes no interstício, ocasionando lesão nos miocardiócitos
13 adjacentes (Figura 2).

14



15

16 **Figura 1:** As setas azuis indicam a direção de escolha dos campos, e os pontilhados vermelhos os campos
17 selecionados, em um total de dez campos.



1

2 **Figura 2:** Em maior aumento, o campo com o sistema teste de cem pontos em uma área pré-determinada de
3 $55000\mu\text{m}^2$. A área por ponto corresponde a $550\mu\text{m}^2$. O total da área do estudo corresponde a $5.500.000\mu\text{m}^2$.

4

5 **5.5 Quantificação da fibrose**

6

7 A avaliação morfométrica do tecido conjuntivo fibroso foi realizada nos cortes do
8 coração, fixados e emblocados em parafina. Foi realizada a coloração pelo picrossírius
9 (solução aquosa saturada de ácido pícrico adicionada de 0,1g% de vermelho da Síria F3b,
10 *Sirius red F3B-Bayer*) com contra coloração pela hematoxilina por um minuto. As lâminas
11 foram analisadas por morfometria digital, em microscópio de luz polarizada em uma objetiva
12 de 10x com aumento final de X400. A morfometria foi feita utilizando o Sistema Analisador
13 de Imagem Automático KS 300 – “*Carl Zeiss*”, utilizando uma macro (Figura 3). O campo a
14 ser quantificado era capturado por meio de uma câmera acoplada ao microscópio e ao
15 computador para digitalização da imagem. Na imagem polarizada o tecido conjuntivo fibroso
16 apresentou-se birrefringente que era marcado pelo observador e obtinha-se o percentual de
17 fibrose por área do campo a ser quantificado. A fibrose total e intersticial foi quantificada em
18 20 campos que corresponde a toda a área do corte.

1 **5.7 Dosagem de citocinas por ELISA dos sobrenadantes de cultivo de células do baço**

2
3 As citocinas presentes nos sobrenadantes de culturas de células dos baços dos
4 animais infectados e controles foram dosadas por ensaio imunoenzimático (ELISA tipo
5 *sandwich*) utilizando pares de anticorpos comercialmente disponíveis.

6 Placas de polipropileno de alta afinidade, com 96 poços de fundo chato (*NUNC* –
7 Rochester, NY, USA) foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais (50µl) contra cada
8 uma das citocinas (IFN-γ e MCP-1 - BD OptEIA™, Biosciences Pharmingen, 1:250) diluídos
9 em tampão Coating (carbonato/bicarbonato pH 9,2) over night a 4°C. Posteriormente, as
10 placas foram lavadas com PBS/Tween a 0,05% em lavadora automática, bloqueadas por 4
11 horas em temperatura ambiente, em solução PBS-BSA (solução salina tamponada com fosfato
12 - soro-albumina bovina) 2%, e lavadas novamente com PBS/Tween a 0,05%. As amostras dos
13 sobrenadantes foram distribuídas em diluições 1:2 em PBS BSA 2%. A curva padrão 1000 a
14 16 pg/mL com cada citocina foi utilizada como padrão de referência. As amostras foram
15 incubadas "overnight" a 4°C, as placas foram lavadas novamente com PBS/Tween a 0,05% e
16 distribuiu-se anticorpo secundário anti-citocina, conjugado com biotina por 2 horas a 37°C. As
17 placas foram novamente lavadas com solução de PBS/Tween a 0,05% e incubadas com
18 peroxidase (2 horas a 37°C). Finalmente, após nova lavagem com solução de PBS/Tween a
19 0,05%, as placas foram incubadas com nitrofenil fosfato (NPP) (Sigma) 1mg/ml em tampão
20 di-etanolamina pH 9,4, protegidas da luz. As placas foram lidas em leitor de microplacas com
21 o filtro de 405nm (*Biorad 2550 Reader EIA, USA*). A concentração das citocinas foi
22 determinada por análise de regressão comparando com a absorbância obtida nas amostras com
23 aquelas da curva padrão, realizadas em cada placa para a citocinas em questão.

24 25 **5.8 Imunohistoquímica**

26
27 A imunohistoquímica para detecção de ninhos de *T. cruzi* foi realizada nos cortes
28 de coração dos camundongos infectados e fixados em formol. Após bloqueio da peroxidase
29 endógena pelo tratamento com H₂O₂ em metanol, as lâminas foram lavadas e incubadas com
30 solução PBS contendo 2% de PBS-BSA. Em seguida, cada corte foi incubado com o
31 anticorpo anti- *T. cruzi* produzido em coelho, na concentração 1: 250, incubado durante 2
32 horas à temperatura ambiente (37°C). Posteriormente, as lâminas foram lavadas em PBS e
33 novamente incubadas com o anticorpo secundário proteína A conjugada com peroxidase, na
34 diluição 1:500. As lâminas foram lavadas e reveladas com 25 µL de H₂O₂(0,05%) + 1mg/mL

1 DAB (1,4-dideoxy-1,4-imino-D-arabinitol-Diaminobenzidina) em tampão tris-HCl pH 7,4. A
2 reação foi interrompida lavando-se as lâminas em água corrente. Os cortes foram contra-
3 corados, com hematoxilina e as lâminas foram então montadas para análise em microscópio
4 de luz comum.

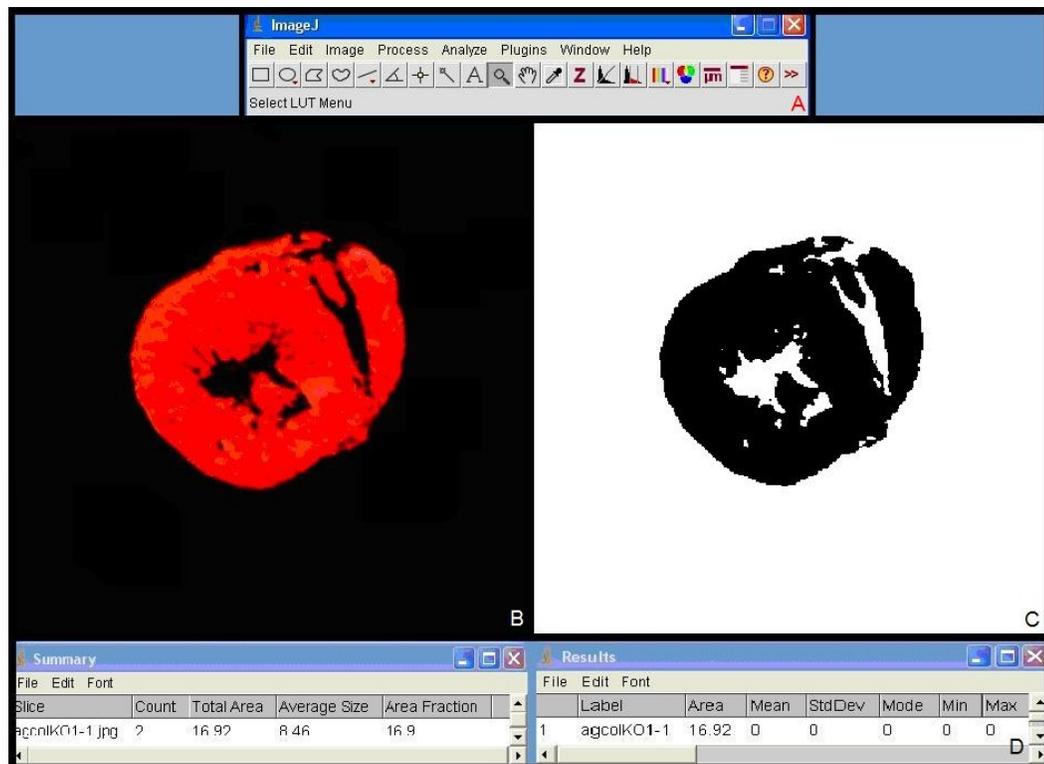
5

6 **5.8.1 Densidade Parasitária**

7

8 A densidade parasitária do número de ninhos de amastigotas por mm^2 foi
9 realizada através da contagem desses ninhos em todo o corte do coração de cada animal. A
10 quantificação da área do miocárdio foi realizada capturando toda a imagem do coração com o
11 auxílio de um scanner HP Scanjet G 4050 (USA) e o programa Adobe Photoshop CS2 em um
12 computador Pentium dual core duo. O tamanho de cada imagem corresponde a 10mm^2 . As
13 imagens assim capturadas foram visualizadas e gravadas para posterior utilização com o
14 programa de análise de imagem “ImageJ”, onde foi obtidas as mensurações, cujos valores
15 foram expressos em mm^2 (Figura4).

16



17

18 **Figura 4.** Em A programa ImageJ; Em B, imagem de corte do coração capturada como indicado no item 5.8.1;
19 Em C imagem transformada em 8 bits e utilizado o comando *threshold* que transforma a imagem em branco e
20 preto, permitindo o cálculo da área pelo programa; Em D, o resultado do cálculo

1 **5.9 Aspectos éticos**

2
3 Todos os procedimentos realizados com os animais estão de acordo com as
4 normas propostas pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal – COBEA
5 (ANDERSEM et al., 2004; MEZADRI, THOMÁZ & AMARAL, 2004). O Projeto de
6 Pesquisa do presente trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da UFTM
7 (CEP/UFTM), protocolado com o número 50.

8

9 **5.10 Normas adotadas**

10
11 Foram adotadas normas da ABNT, NBR 14724. Agosto de 2002. Informação e
12 documentação – trabalhos acadêmicos – apresentação e as recomendações do Curso de Pós
13 Graduação em Patologia da UFTM.

14

15 **5.11 Análise Estatística**

16
17 Para a análise estatística foi elaborada uma planilha eletrônica no programa
18 Microsoft Excel®, e sua realização se fez através do programa e *Statview* (Abaccus EUA). A
19 verificação da distribuição normal das variáveis quantitativas foi feita pelos testes de
20 Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. As variáveis contínuas que apresentaram distribuição
21 normal foram expressas em média \pm desvio padrão e aquelas que apresentaram distribuição
22 não normal foram expressas em mediana com valores mínimos e máximos e percentis. As
23 variáveis que apresentaram distribuição normal e variância semelhante foram analisadas pelos
24 testes "t" de *Student* para comparação de dois grupos. As variáveis que apresentaram
25 distribuição normal com variância não homogênea ou distribuição não normal, foram
26 analisadas pelos testes de Mann-Whitney (T) para comparação de dois grupos independentes
27 e Kruskal Wallis para a comparação de três ou mais grupos. Os resultados foram considerados
28 estatisticamente significativos quando a probabilidade foi menor 5% ($p < 0,05$).

1 **6 RESULTADOS**

2

3 No presente estudo, foram quantificados os ninhos de *T. cruzi*, no tecido cardíaco
4 no grupo de animais C57BL/6KO e C57BL/6-S e avaliados os processos patológicos gerais,
5 como inflamação e fibrose tecidual no miocárdio.

6

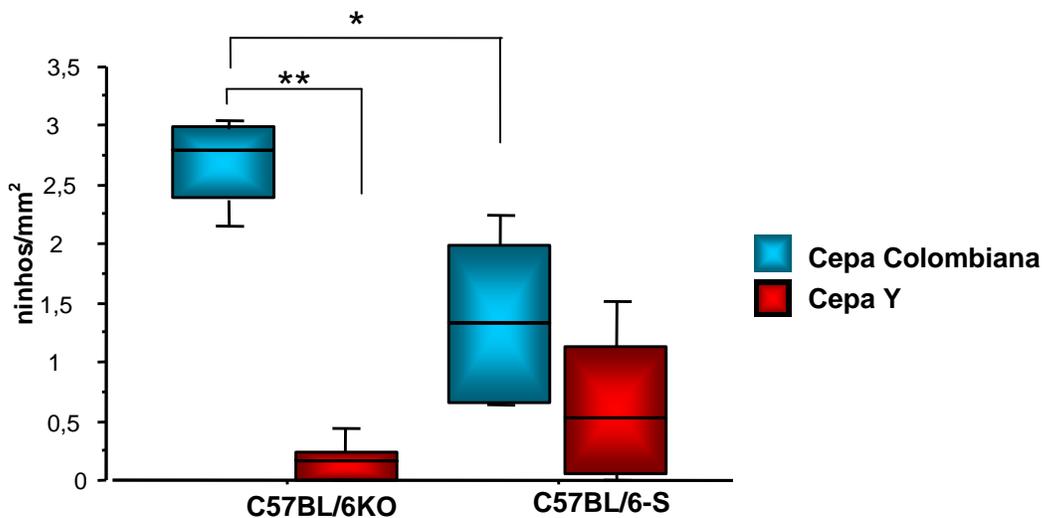
7 **6.1 Parasitismo cardíaco**

8

9 O parasitismo tissular foi avaliado pela contagem de ninhos de *T. cruzi* no
10 miocárdio na fase aguda e crônica pela técnica de imunohistoquímica indireta (Prancha 1A e
11 1B), em todos os grupos infectados e foi expresso na forma de número de ninhos por mm² da
12 área do corte examinado.

13 O número de ninhos de *T. cruzi* no tecido cardíaco em animais infectados com a
14 cepa colombiana (n=6) foi significativamente maior nos animais C57BL/6KO que nos
15 animais C57BL/6-S (Mann-Whitney, p=0,006) enquanto que nos animais infectados com a
16 cepa Y (n=6), não foi observado diferença significativa entre estes mesmos grupos.

17 Nos animais C57BL/6KO infectados com a cepa Colombiana, o numero de ninhos
18 foi significativamente maior que nesta mesma linhagem infectada com a cepa Y (Mann-
19 Whitney, p=0,004). A linhagem C57BL/6-S não houve diferença significativa quando
20 comparada as duas cepas de *T. cruzi* (Figura 5).

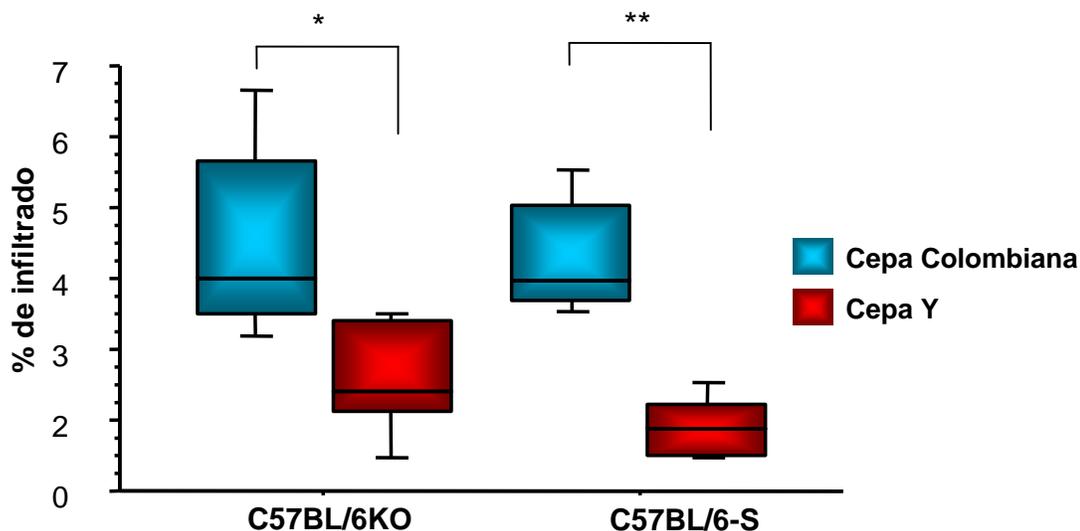


1
2 **Figura 5.** Distribuição do número de ninhos por mm² em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S infectados
3 com a cepa Y e com a cepa colombiana na fase aguda. Os dados são apresentados em número de ninhos por área
4 do corte analisado. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o
5 percentil de 10% a 90% (*Mann-Whitney; p=0,0001); (**Mann-Whitney; p=0,033).
6
7

8 **6. 2 Inflamação na fase aguda**

9
10 O processo inflamatório foi avaliado por morfometria utilizando um sistema teste
11 de contagem de pontos em uma área teste pré-determinada, tanto na fase aguda como na fase
12 crônica no miocárdio dos animais infectados com as cepas Y (n=24) e Colombiana (n=24).
13 Na fase aguda houve predomínio de polimorfonucleares (PMN), enquanto que, na fase
14 crônica encontrou-se infiltrado inflamatório, constituído predominantemente de
15 mononucleares (MN) (Prancha 1C e 1D). A inflamação foi avaliada entre os grupos de
16 animais (C57BL/6-S) e deficientes em iNOS (C57BL/6KO).

17 Na fase aguda, foram comparados os animais C57BL/6-S e C57BL/6KO,
18 infectados com a cepa Colombiana (n=6) e com a cepa Y (n=6). Não houve diferença
19 significativa entre os animais C57BL/6-S e C57BL/6KO quando infectados pela cepa Y ou
20 colombiana. Entretanto, em ambas linhagens, quando comparados os animais infectados com
21 as cepas Y (n=6) e Colombiana (n=6), no grupo C57BL/6KO a inflamação causada pela cepa
22 colombiana foi significativamente maior (Mann-Whitney, p=0,013) assim como, no grupo
23 C57BL/6-S (n=6) (Mann-Whitney, p=0,004) (Figura 6).



1
2 **Figura 6.** Distribuição da porcentagem de exsudato inflamatório em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S
3 infectados pelas cepas Y e Colombiana na fase aguda da infecção. A linha horizontal representa a mediana, a
4 barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann Whitney;
5 $p=0,013$); ** (Mann Whitney; $p=0,004$).
6

7

8 **6.3 Inflamação na fase crônica**

9

10 Na fase crônica, foram comparados o infiltrado inflamatório entre os animais
11 C57BL/6KO (n=6) e C57BL/6-S (n=6) inoculados com a cepa Y, não sendo observado
12 diferença significativa. No entanto, entre os animais C57BL/6-S infectados com a cepa Y
13 (n=6) e Colombiana (n=6) foi observado uma inflamação significativamente maior nos
14 animais inoculados com a cepa Colombiana (Mann-Whitney, $p=0,004$) (Figura 7).

15 Não foi avaliada a fase crônica do grupo C57BL/6KO infectado com a cepa
16 Colombiana, pois os mesmos morreram antes de atingirem esta fase.

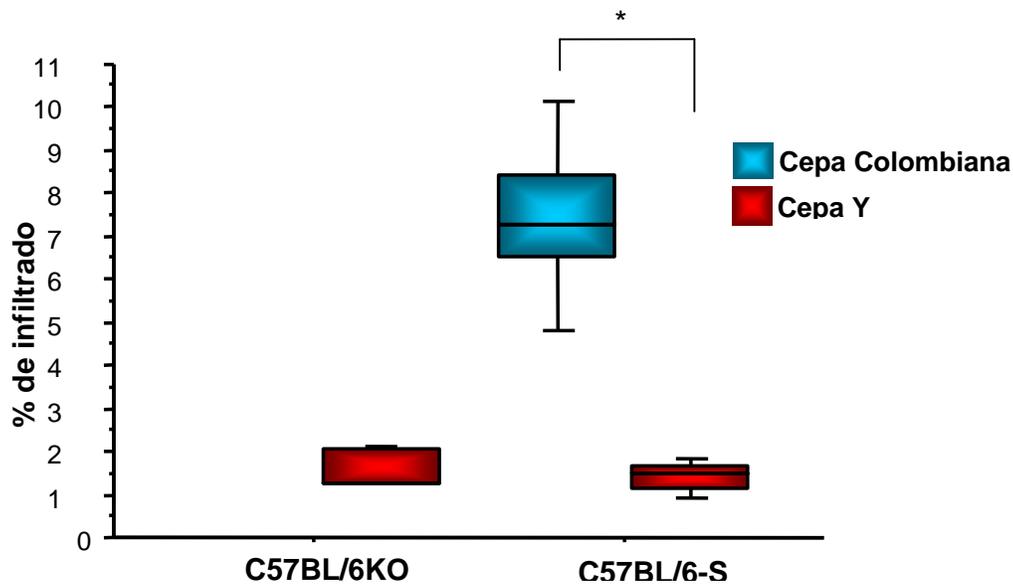


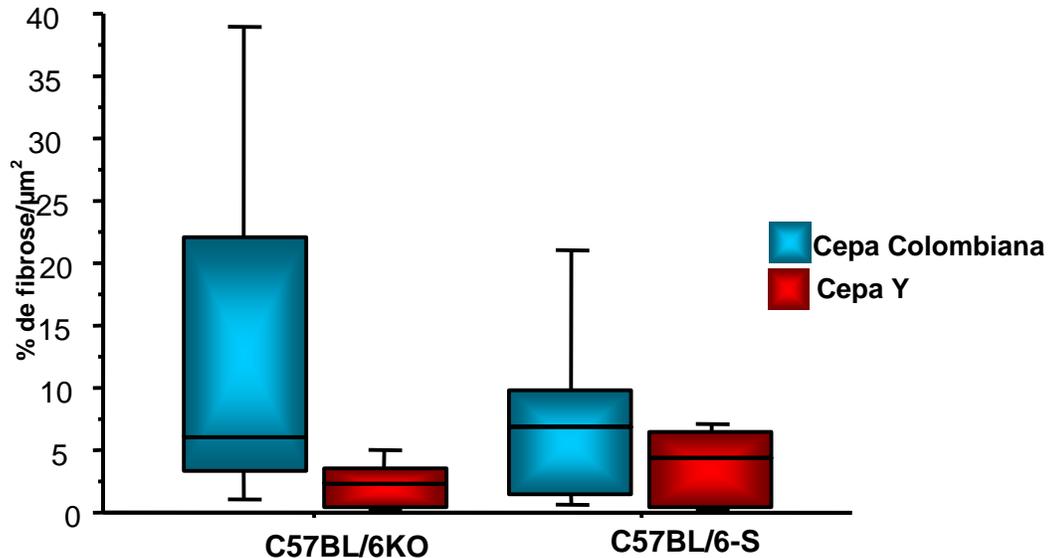
Figura 7. Distribuição da porcentagem de exsudato inflamatório em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S infectados pelas cepas Y e Colombiana na fase crônica da infecção. A linha horizontal representa a mediana, a barra a dispersão de 25% a 75% e a linha vertical representa a dispersão de 10% a 90%. *(Mann Whitney; $p=0,004$).

6.4 Fibrose na fase aguda

A fibrose foi avaliada por morfometria digital no tecido cardíaco utilizando-se cortes corados pelo picrossírius e analisados na luz polarizada (Prancha 1E e 1F).

Na fase aguda, foi comparada a fibrose nos animais C57BL/6-S e C57BL/6KO, infectados com a cepa Colombiana ($n=6$) e com a cepa Y ($n=6$). Não houve diferença significativa entre os animais C57BL/6-S e C57BL/6KO quando infectados pela cepa Y ou colombiana e a sua intensidade foi semelhante ao grupo controle.

No grupo C57BL/6-KO, houve uma maior produção de fibrose pelos animais infectados com a cepa Colombiana ($n=6$) que os animais infectados com a cepa Y ($n=6$), no entanto essa diferença não foi estatisticamente significante. Da mesma forma, não houve diferença significativa no grupo C57BL/6-S, inoculados com a cepa Colombiana ($n=6$) e com a cepa Y ($n=6$) (Figura 8).



1
2 **Figura 8.** Distribuição da fibrose em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S, infectados com a cepa Y e com a
3 cepa Colombiana, durante a fase aguda da infecção. Os dados são apresentados em porcentagem da área de
4 fibrose. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de
5 10% a 90%.

10 6.5 Fibrose na fase crônica

11
12 O grupo C57BL6KO infectado com a cepa Colombiana não foi avaliado, pois os
13 animais morreram antes de chegar à fase crônica. Na fase crônica observou-se em todos os
14 animais um aumento significativo da fibrose quando comparado como grupo controle. Na
15 análise dos animais infectados pela cepa Y durante a fase crônica mostrou que, entre os
16 grupos C57BL/6KO (n=6) e C57BL/6-S (n=6), quando comparados, a produção de fibrose
17 não foi significativamente diferente (Figura 9).

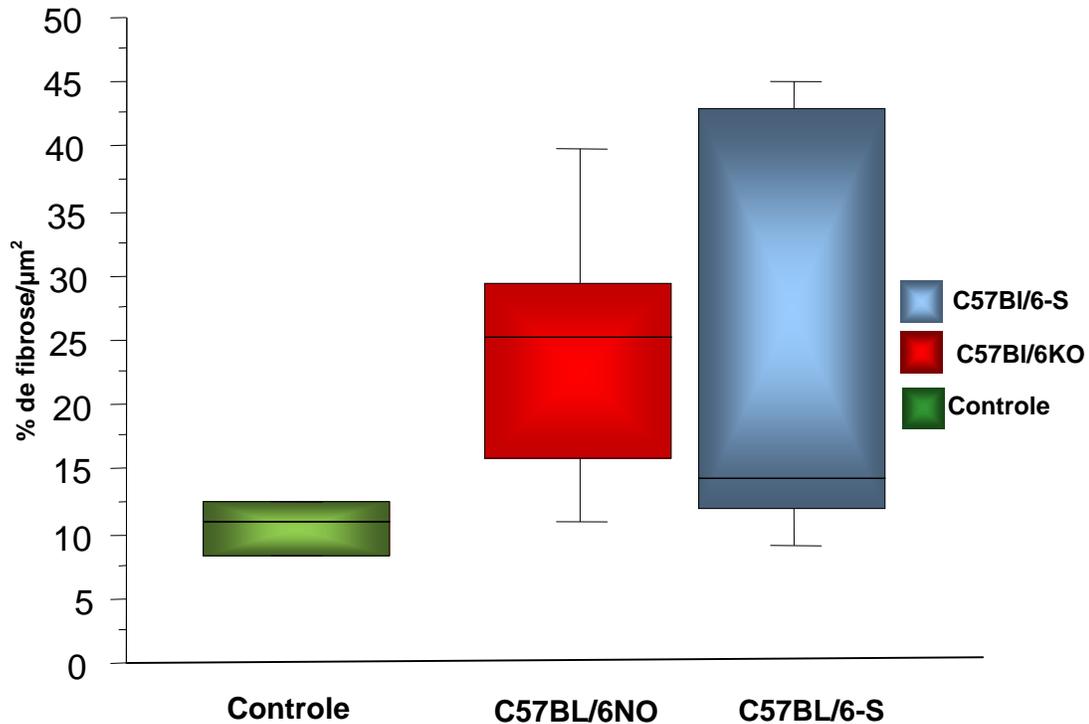


Figura 9. Distribuição da fibrose no grupo controle e em camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S, infectados com a cepa Y durante a fase crônica da infecção. Os dados são apresentados em porcentagem da área de fibrose. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90%.

6. 6 Dosagem de IFN- γ e MCP-1

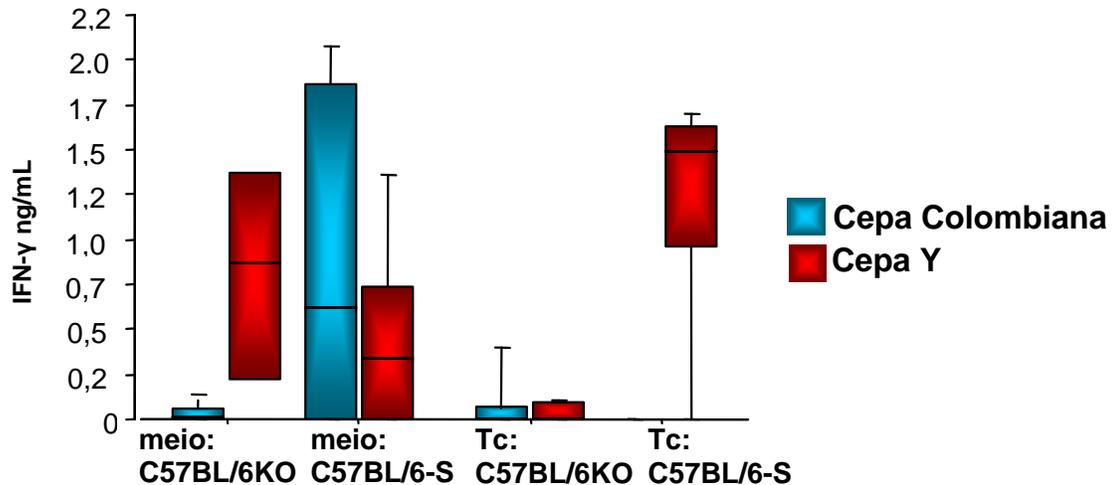
A dosagem de IFN- γ e MCP-1 foi realizada por ensaio imunoenzimático em sobrenadantes de culturas de células do baço, cultivados por 72 horas em presença de antígenos de *T. cruzi* ou meio.

6. 6. 1 Níveis de IFN- γ na fase aguda da infecção

Os níveis de IFN- γ foram avaliados entre os camundongos C57BL/6-S e C57BL/6KO, infectados com a cepa Colombiana e com a cepa Y. Não houve diferença significativa entre os animais destas linhagens quando infectados pela cepa Y ou Colombiana, nem em sua produção basal, nem após o estímulo com *T. cruzi*.

No grupo C57BL/6KO, quando comparada a produção de IFN- γ entre os animais infectados com a cepa Y (n=4) com os animais infectados com a cepa Colombiana (n=5), também não houve diferença significativa, nem na produção basal, nem após estímulo com *T.*

1 *cruzi*. Da mesma forma, não houve diferença significativa no grupo C57BL/6-S, inoculados
2 com a cepa Colombiana (n=6) e com a cepa Y (n=6), com ou sem estímulo de *T. cruzi* (Figura
3 10).
4



5 **Figura 10.** Níveis de IFN- γ em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6KO
6 e C57BL/6-S, infectados com as cepas Y e Colombiana, na fase aguda da infecção. Os dados são
7 apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha
8 vertical o percentil de 10% a 90%.

9 6. 6. 2 Níveis de IFN- γ na fase crônica da infecção

10
11 A produção de IFN- γ foi avaliada entre os grupos C57BL/6-S e C57BL/6KO,
12 infectados com a cepa Y. O grupo C57BL/6-S infectado com a cepa Colombiana não
13 produziu níveis detectáveis de IFN- γ , já o grupo C57BL/6KO não sobreviveu à esta fase da
14 infecção.

15 Não houve diferença significativa entre os animais C57BL/6KO (n=6) e C57BL/6-
16 S (n=6) infectados com a cepa Y durante a fase crônica da infecção, nem em sua produção
17 basal, nem após estímulos com *T. cruzi* (Figura 11).

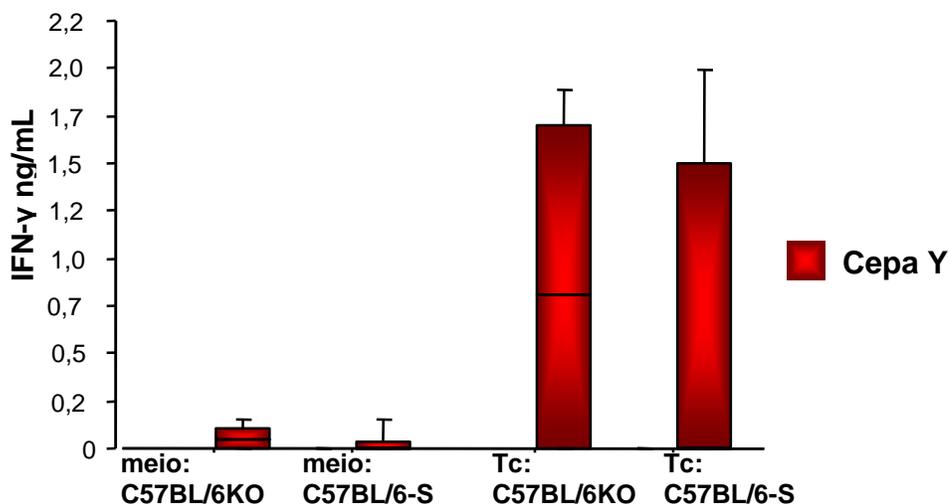


Figura 11. Níveis de IFN- γ em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6-S, infectados com as cepas Y, na fase na fase crônica da infecção. Os dados são apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90%.

1

2

3 **6. 2. 3 Níveis de MCP-1 na fase aguda da infecção**

4

5 Os níveis de MCP-1 foram avaliados entre os camundongos C57BL/6-S e
6 C57BL/6KO, infectados com a cepa Colombiana e com a cepa Y.

7 O grupo C57BL/6KO infectado com a cepa Colombiana (n=5) apresentou níveis
8 significativamente maiores de MCP-1 em sua produção basal que o grupo C57Bl/6-S (n=6)
9 (Mann-Whitney, p=0,049). No entanto, após o estímulo com *T. cruzi*, não houve diferença
10 estatisticamente significativa, embora o grupo C57Bl/6KO (n=6) ter apresentado níveis
11 maiores de MCP-1 que o grupo C57BL/6-S (n=6). Não houve diferença significativa entre os
12 animais destas linhagens quando infectados pela cepa Y em sua produção basal ou após o
13 estímulo com *T. cruzi* (Figura 12).

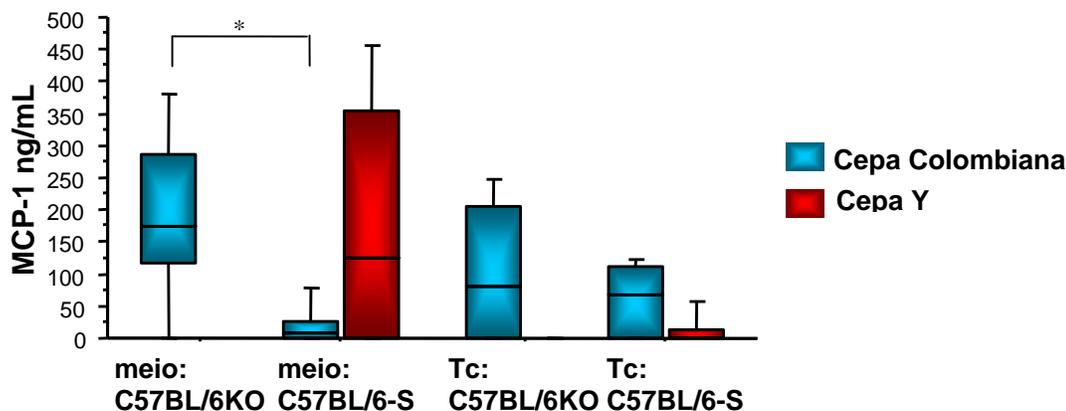


Figura 12. Níveis de MCP-1 em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6KO e C57BL/6-S, infectados com as cepas Y e Colombiana, na fase aguda da infecção. Os dados são apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha vertical o percentil de 10% a 90% (*Mann-Whitney; p=0,049).

1
2

6. 2. 4 Níveis de MCP-1 na fase crônica da infecção

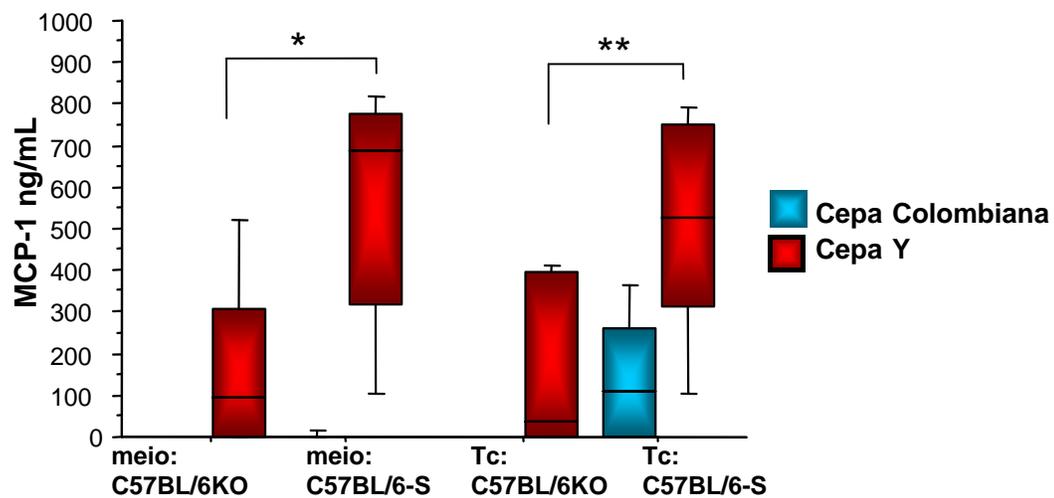
4

A produção de MCP-1 foi avaliada entre os grupos C57BL/6-S e C57BL/6KO, infectados com a cepa Y. O grupo C57BL/6-S infectado com a cepa Colombiana não expressou níveis detectáveis de MCP-1 na produção basal e produziu pouco MCP-1 após estímulo com *T. cruzi*. O grupo C57BL/6KO inoculado com a cepa Colombiana não sobreviveu à esta fase da infecção.

10

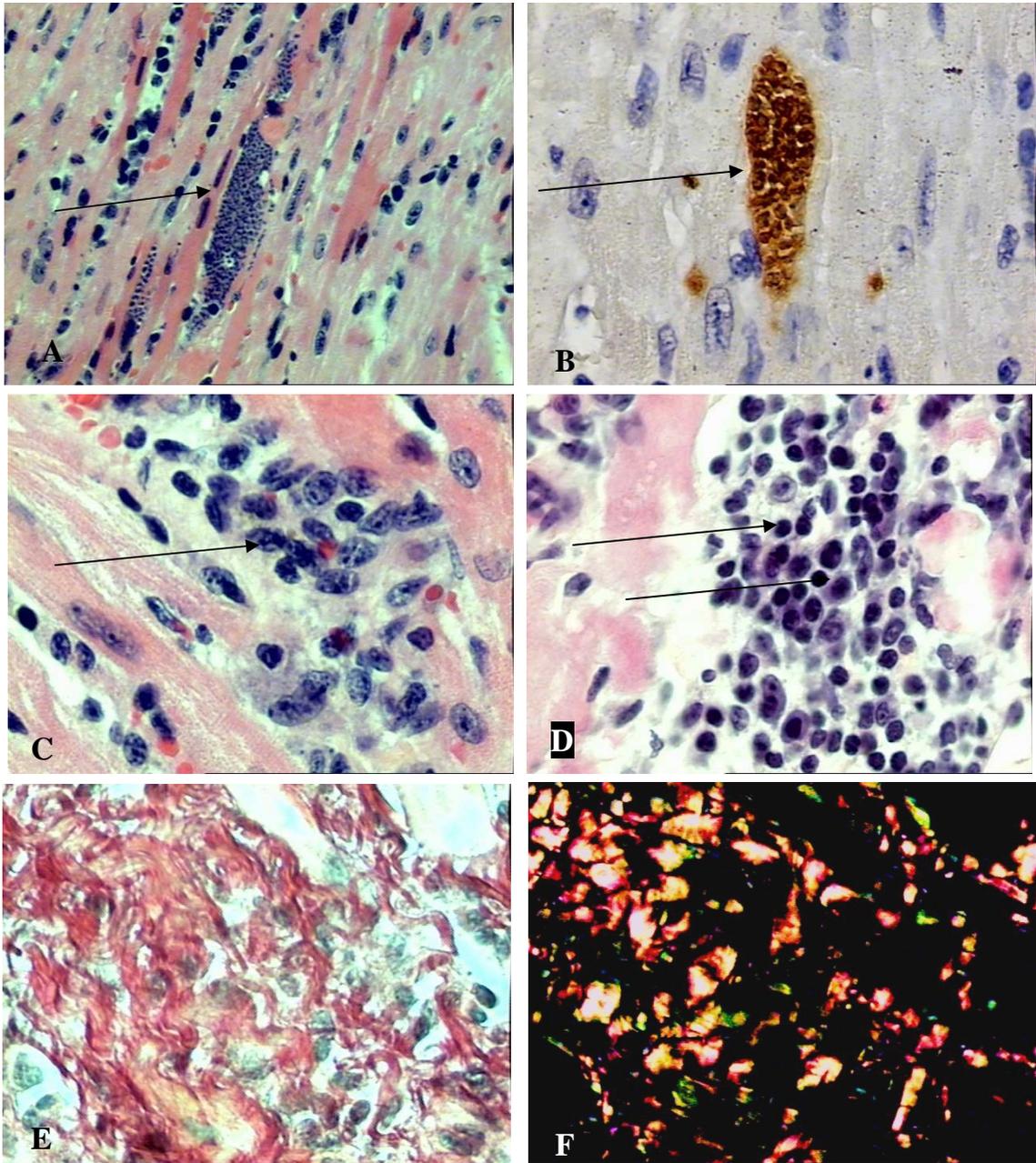
Os animais C57BL/6-S em sua produção basal, expressaram um nível significativamente maior de MCP-1 que os animais C57BL/6KO, infectados com a cepa Y (Mann-Whitney, p=0,031). Da mesma forma, após estímulo com *T. cruzi*, os animais C57BL/6-S expressaram um nível de MCP-1 significativamente maior que os animais C57BL/6KO, infectados com a cepa Y (Mann-Whitney, p=0,015) (Figura 13).

14



1

2 **Figura 13.** Níveis de MCP-1 em sobrenadantes de cultura em células de baço de camundongos C57BL/6-S,
 3 infectados com as cepas Y e Colombiana, na fase crônica da infecção, em produção basal. Os dados são
 4 apresentados em ng/mL. A linha horizontal representa a mediana, a barra o percentil de 25% a 75%, a linha
 5 vertical o percentil de 10% a 90% (*Mann-Whitney; $p=0,031$); (** Mann-Whitney; $p=0,015$).



Prancha 1. Corte histológico de coração de camundongo C57BL/6-S e C57BL/6KO: **(A)** Corte histológico de coração de camundongo evidenciando ninho de *T. cruzi*. (Seta)(X 800). **(B)** Corte histológico de coração de camundongo com imunomarcagem positiva na técnica de imunohistoquímica para *T. cruzi*. (Seta) (X 800). **(C)** Infiltrado inflamatório com predomínio de PMN durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.(seta) (Hematoxilina-eosina X 800). **(D)** Infiltrado inflamatório com predomínio de MN durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*. (seta) (Hematoxilina-eosina X 800). **(E)** Linhagem C57BL/6-S infectado pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, fase crônica apresentando fibrose (picosírius, sob luz comum (X 800). **(F)** Mesmo campo visto na luz polarizada (X 800).

1 7 DISCUSSÃO

2
3 No presente trabalho foi estudado a contribuição do óxido nítrico, IFN- γ e MCP-
4 1 no desenvolvimento da inflamação e da fibrose cardíaca nas fases aguda e crônica da
5 infecção experimental pelo *T. cruzi*. Utilizamos animais geneticamente deficientes na sintase
6 induzível do óxido nítrico experimentalmente infectados com o *T. cruzi* onde foram
7 analisados a produção de IFN- γ e MCP-1 por células esplênicas destes animais.

8 Na doença de Chagas, sabe-se que fator lesivo inicial é o parasitismo de
9 miocardiócitos pelo *T. cruzi*. Em nossos resultados, o número de ninhos de *T. cruzi* no tecido
10 cardíaco nos animais infectados com a cepa colombiana foi significativamente maior nos
11 animais C57BL/6KO que nos animais C57BL/6-S devido a sua deficiência de produção de
12 óxido nítrico, uma importante molécula tripanocida (GAZZINELLI, OSWALDO & JAMES,
13 1992; SILVA et al., 1995). E comparando os animais C57BL/6KO com as duas cepas, os
14 animais infectados com a cepa Colombiana, apresentaram números de ninhos
15 significativamente maiores que os infectados com a cepa Y. Esses resultados se justificam,
16 uma vez que a cepa Colombiana apresenta parasitemia de evolução lenta, e com nítido
17 miotropismo, sobretudo com envolvimento de musculatura esquelética (ANDRADE, 2000).
18 Já a cepa Y é caracterizada por uma infecção de evolução rápida, e com altos níveis de
19 parasitemia (ANDRADE, 1974).

20 Os animais da linhagem C57BL/6-S, em nossos resultados, apresentaram um
21 padrão de resistência à infecção pelo *T. cruzi* em relação aos C57BL/6KO. Animais C57Bl/6
22 têm sido apontados como resistentes a parasitas intracelulares, como o *T. cruzi* e as
23 *Leishmanias*, apresentando uma capacidade de gerar uma resposta imune predominante de
24 padrão Th1 capaz de estimular o macrófago a eliminar parasitas intracelulares (SACKS et al.,
25 2002).

26 Como ocorre em outras infecções por microrganismos patogênicos intracelulares,
27 a infecção pelo *T. cruzi* mobiliza mecanismos de imunoproteção. A inflamação no presente
28 estudo foi encontrada em 100% dos casos, sendo que, na fase aguda detectou-se um
29 predomínio de polimorfonucleares, enquanto que, na fase crônica foram encontrados
30 predominantemente os mononucleares. Em modelo experimental, estudos revelam um papel
31 preponderante para linfócitos CD4⁺, tanto na imunidade como na patogenia (DOS SANTOS
32 et al., 1992). A caracterização do infiltrado inflamatório da miocardite chagásica crônica
33 humana pode fornecer informações relevantes para o esclarecimento da patogênese,

1 terapêutica, e prognóstico da doença de Chagas. Estudos mostram que este infiltrado
2 inflamatório é constituído predominantemente de linfócitos e macrófagos, ao lado de menor
3 número de eosinófilos, plasmócitos, neutrófilos e mastócitos (ANDRADE, 1958; LOPES et
4 al., 1987). Por técnica de imunohistoquímica têm sido demonstrado predomínio de células
5 LTCD8⁺ (REIS et al., 1993) e que estas células aparecem mais próximas ou aderidas aos
6 miocardiócitos, expressando o fator citotóxico granzima A (TOSTES et al., 1994).

7 No presente trabalho, comparando a inflamação durante a fase aguda entre os
8 grupos de animais C57BL/6-S e C57BL/6KO infectados com a cepa Colombiana e com a
9 cepa Y não houve diferença significativa. No entanto, em cada uma das linhagens, quando
10 comparados os animais infectados com as duas cepas, no grupo C57BL/6KO a inflamação
11 causada pela cepa colombiana foi significativamente maior que a causada pela cepa Y.
12 Estudos apontam que a cepa Y tem um tropismo predominante por macrófago na fase aguda
13 da infecção, sobretudo, em órgãos como baço, fígado e linfonodos (ANDRADE & ROCHA,
14 1995), enquanto, a cepa Colombiana nessa fase já mostra um tropismo por células musculares
15 (ANDRADE, 1974; MELO & BRENER, 1978).

16 Em nosso estudo, na fase crônica, os animais C57BL/6-S infectados com a cepa
17 Colombiana apresentaram inflamação significativamente maior que os infectados com a cepa
18 Y. Alguns trabalhos apontam que a infecção com a cepa Colombiana, há um nítido
19 miotropismo (ANDRADE & ROCHA, 1995), determinando assim uma miocardite crônica
20 progressiva, com processo inflamatório crônico multifocal (ANDRADE, 1976) associado
21 com necrose de parede vascular e lesões miocárdicas proeminentes (ANDRADE, 2000).

22 A fibrose representa um dos mais importantes achados que compromete a função
23 contrátil cardíaca durante a fase crônica da infecção. Acredita-se que seu desenvolvimento
24 ocorra por substituição do tecido lesado, cumprindo a função de preenchimento. Na doença de
25 Chagas, representa uma perda da massa contrátil, além de, contribuir para a desorganização
26 das miocélulas estando assim associado à insuficiência cardíaca congestiva (LOPES &
27 CHAPADEIRO, 1997).

28 A fibrose, no presente estudo, foi avaliada na fase aguda comparando os animais
29 C57BL/6-S e C57BL/6KO, com as duas cepas, e não houve diferença significativa, embora os
30 animais C57BL/6KO apresentaram uma maior área de tecido conjuntivo fibroso quando
31 infectados pela cepa Colombiana.

32 Com a evolução da inflamação, células presentes no tecido conjuntivo como
33 fibroblastos, começam a sintetizar colágeno para substituir o tecido lesado, formando assim, a

1 fibrose. A fase aguda da infecção é caracterizada por alguns autores por não apresentar
2 fibrose, ou a mesma ser cicatricial (LOPES et al., 1981). A cepa Colombiana, no presente
3 trabalho, promoveu maior fibrose no tecido cardíaco, provavelmente porque é uma cepa
4 miotrópica e induz inflamação com maior intensidade. Trabalhos comparando as cepas Y,
5 Colombiana e São Felipe (12SF) na indução de lesão cardíaca mostraram que a cepa
6 Colombiana produz lesões cardíacas crônicas mesmo com baixo inóculo, em relação às cepas
7 Y e 12SF (CHAPADEIRO et al., 1988; ANDRADE et al., 2006). A fibrose desenvolvida na
8 fase crônica é dependente do parasitismo e da intensidade da inflamação. Foi demonstrado
9 que após o tratamento específico e a cura parasitológica de camundongos suíços infectados
10 com a cepa colombiana ou São Felipe havia uma diminuição da inflamação e da fibrose
11 (ANDRADE et al., 1991). Estes dados diferem em parte dos nossos achados, uma vez que
12 durante a fase aguda e crônica da infecção os camundongos C57BL/6-S infectados com a
13 cepa Colombiana apresentaram parasitismo e inflamação significativamente maiores que
14 aqueles infectados com a cepa Y, sugerindo, no período analisado, que a intensidade da
15 inflamação e do parasitismo não guarda relação direta com a fibrose. Deve ainda ser
16 ressaltado que, diferentemente do estudo citado acima, os animais deste estudo não
17 apresentaram cura parasitológica.

18 Em modelo de fibrose induzida pela infecção experimental pelo *Schistosoma*
19 *mansoni*, foi demonstrado que a iNOS é responsável pelos efeitos anti-inflamatórios e anti-
20 fibróticos atribuídos a uma resposta Th1 (HESSE et al., 2000). Neste estudo animais
21 deficientes em iNOS apresentaram maior inflamação, provavelmente devido ao maior
22 parasitismo tissular. Ainda, não se observou diferença na fibrose entre os animais deficientes
23 e iNOS e seu homólogos selvagens sugerindo que na doença de Chagas, o óxido nítrico não
24 está envolvido na formação da fibrose cardíaca.

25 As citocinas desempenham papel importante na regulação da resposta imune e,
26 seguramente, estão envolvidos tanto na resistência quanto nos mecanismos relacionados com
27 a imunopatologia na doença de Chagas. Os níveis de IFN- γ estudados no presente estudo na
28 fase aguda da infecção, foram avaliados nos camundongos C57BL/6-S e C57BL/6KO, com as
29 duas cepas (Colombiana e Y) e não houve diferença significativa entre os animais destas
30 linhagens. O IFN- γ é uma citocina ativadora de macrófago, produzida principalmente por
31 linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1) (ROMAGNANI, 1997). Em modelo experimental
32 utilizando C57BL/6, foi observada a presença de IFN- γ no início da infecção, sendo a citocina
33 predominante do décimo quinto ao trigésimo dia, enquanto que, em 60 dias, o balanço entre

1 Th1 e Th2 foi invertido em favor de Th2 com a produção de IL-4 e IL-10 (TALVANI et al.,
2 2000). Em nosso estudo, o IFN- γ foi uma citocina encontrada tanto na fase aguda como na
3 fase crônica da infecção dos animais, no entanto, comparando os níveis dessa citocina entre as
4 linhagens C57BL/6-S e C57BL/6KO não foi encontrada diferença significativa, bem como,
5 comparando essas linhagens entre as cepas. Camundongos da linhagem C57BL/6 são bons
6 produtores de IFN- γ e os animais deficientes em iNOS desta mesma linhagem conservam
7 esta capacidade (HESSE et al., 2000). A resistência à infecção pelo *T. cruzi* é associada à
8 capacidade dos linfócitos em produzirem IFN- γ , o que por sua vez, podem ativar os
9 macrófagos a produzirem NO, a principal molécula efetora que controla a multiplicação
10 intracelular do parasito (ALMEIDA-LEITE et al., 2007). No presente estudo, os animais
11 C57BL/6KO apresentaram maior parasitismo que os animais C57BL/6-S, o que demonstra
12 que apesar dos animais C57BL/6KO produzirem IFN- γ esses animais não conseguem
13 estimular a produção de NO apresentando assim um maior parasitismo, inclusive não
14 conseguindo sobreviver para atingirem a fase crônica da doença. Macrófagos ativados pelo
15 IFN- γ sintetizam NO, que, em camundongos, é considerada a maior molécula efetora
16 intracelular capaz de eliminar formas amastigotas (COSTA et al., 2006).

17 Em nosso estudo, na fase aguda, o grupo C57BL/6KO infectado com a cepa
18 Colombiana apresentou níveis significativamente maiores de MCP-1 em sua produção basal
19 que o grupo C57BL/6-S. Na literatura, a MCP-1 é descrita como uma quimiocina que
20 estimula uma resposta de perfil Th2, onde camundongos deficientes dessa quimiocina se
21 mostram incapazes de montar uma resposta deste perfil (GU et al., 2000). Por outro lado,
22 macrófagos peritoneais de camundongos estimulados com MCP-1 aumentam sua capacidade
23 de estimularem a produção de óxido nítrico (BISWAS, SODHI & PAUL, 2001). Durante a
24 infecção aguda experimental pelo *T. cruzi*, enquanto o parasitismo ainda é alto, há uma maior
25 síntese de quimiocinas no miocárdio, como uma resposta às moléculas do parasito
26 (TEIXEIRA, GAZZINELI & SILVA, 2002). A MCP-1 expressa durante o processo de
27 infecção tem sido demonstrada como ativadora de macrófagos infectados para produzir NO e
28 matar *T. cruzi* (COELHO et al., 2002). O grupo C57BL/6KO infectado com a cepa
29 Colombiana, na fase aguda, apresentou níveis significativamente maiores de MCP-1, no
30 entanto, como esses animais apresentam uma deficiência na produção de NO o número de
31 parasitas foi significativamente maior.

32 Já na fase crônica, os nossos resultados se invertem, e os grupos que mais
33 expressam MCP-1 são os C57BL/6-S infectados com a cepa Y, tanto em sua produção basal,

1 como após a infecção por *T. cruzi*. Alguns estudos sugerem que as formas amastigotas e
2 tripomastigotas do *T. cruzi* possuem um receptor ou ligante para as quimiocinas MCP-1, e que
3 estas quimiocinas podem estar atuando nos processos de migração do parasito no hospedeiro
4 durante a infecção, atraindo linfócitos e monócitos (BRENIER-PINCHART, 2001). Em um
5 estágio tardio da infecção, a produção de quimiocinas parece ser induzida em resposta aos
6 antígenos do parasito (TEIXEIRA, GAZZINELI & SILVA, 2002), sobretudo a MCP-1,
7 potencializam a capacidade dos macrófagos de destruírem o *T. cruzi* (ALIBERTI et al., 1999).

8 Alguns trabalhos apontam a MCP-1 como uma proteína pró-inflamatória que
9 promove fibrose intersticial e está implicada em doenças caracterizadas por infiltrados ricos
10 em monócitos (MATSUSHIMA et al., 1989; CHARO & TAUBMAN 2004;
11 FRANGOIANNIS et al., 2007). Neste estudo como não se observou diferença na fibrose,
12 não se evidenciou correlação entre o desenvolvimento da fibrose e os níveis de MCP-1.

1 **8 CONCLUSÕES**

2

3

➤ Animais deficientes em NO apresentaram maior parasitismo tissular e
4 inflamação mais intensa;

5

➤ Animais deficientes em NO não apresentaram diferença significativa na
6 intensidade de fibrose;

6

7

➤ Animais deficientes em NO apresentaram níveis de MCP-1
8 significativamente maiores após a infecção pelo *T. cruzi*.

8

9

10 Portanto, o Óxido Nítrico e a MCP-1 são moléculas importantes no desenvolvimento das
11 lesões cardíacas durante a fase aguda e crônica na doença de Chagas experimental.

9 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Imunologia Celular e Molecular**. 4ª ed. Rio de Janeiro: Revinter, 2002. 469 p.
- ABEL, L. C. J.; RIZZO, L. V., IANNI, B.; ALBUQUERQUE, F.; BACAL, F.; CARRARA, D.; BOCCHI, E. A.; TEIXEIRA, H. C.; MADY, C.; KALIL, J.; CUNHA-NETO, E. Chronic chagas' disease cardiomyopathy patients display an increased IFN- γ response to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Autoimmunity**, v. 17, p. 99-108, 2001.
- ABRAHAMSOHN, I.A.; COFFMAN, R.L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF- α , IFN- γ and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.**, v. 84, p. 231-244, 1996.
- ALIBERTI, J. C.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. beta-Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.**, v. 67, n. 9, p. 4819-4826, 1999.
- ALMEIDA-LEITE, C. M.; GALVÃO, M. C.; AFONSO, L. C. C.; CUNHA, F. Q.; ARANTES, R. M. E. Interferon- γ induced nitric oxide mediates in vitro neuronal damage by *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages. **Neurobiology of Disease**, v. 25, p. 170-178, 2007.
- ANDERSEN, M. L; *et al.* **Princípios Éticos e Práticos do Uso de Animais de Experimentação**. São Paulo. Universidade Federal de São Paulo, p. 167, 2004.
- ANDRADE, Z.A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Revista Goiana Médica**, v. 4, p. 103, 1958.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Revista de Patologia Tropical**, v. 3, p. 65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strain in 14 some types. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 18, p. 140-141, 1976.
- ANDRADE, Z. A. Mechanism of myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* infection. **Ciba Found Symp.**, v. 99, p. 214-233, 1983.
- ANDRADE, Z. A. The pathology of Chagas disease in man. **Ann Soc Bra Med Trop. Suppl** 1, p. 15-30, 1985.
- ANDRADE, S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p.17-27, 1990.
- ANDRADE, S. G.; FREITAS, L. A.; PEYROL, S.; PIMENTEL, A. R.; SADIGURSKY, M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. **Bull World Health Organ.**, v. 69, n. 2, p. 191-197, 1991.

- 1 ANDRADE, Z. A.; ROCHA SILVA, H. R. Parasitismo of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*.
2 **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 90, p. 521-522, 1995.
3
- 4 ANDRADE, P. P., ANDRADE, C. R. Etiologia. In: MALTA, J. **Doença de Chagas**. São
5 Paulo: Sarvier, p. 1-11, 1996.
6
- 7 ANDRADE, Z. A. Patologia da doença de Chagas. In: BRENER, Z, ANDRADE, Z.A.,
8 BARRAL-NETO, M. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. 431p. 201-230, Rio
9 de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
10
- 11 ANDRADE, S. G.; CAMPOS, R. F.; SOBRAL, K. S.; MAGALHÃES, J. B.; GUEDES, R.
12 S.; GUERREIRO, M.L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different
13 biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev Soc Bras Med**
14 **Trop**. v. 1, p. 1-8, 2006.
15
- 16 ANTUNEZ, M. I.; CARDONI, R. L. Early IFN-gamma production is related to the presence
17 of interleukin (IL)-18 and the absence of IL-13 in experimental *Trypanosoma cruzi* infections.
18 **Immunol Lett.**, v. 79, p. 189-196, 2001.
19
- 20 ARANTES, R. M.; MARCHE, H. H.; BAHIA, M. T.; CUNHA, F. Q.; ROSSI, M. A.;
21 SILVA, J. S. Interferon-gamma-induced nitric oxide causes intrinsic intestinal denervation in
22 *Trypanosoma cruzi*-infected mice. **Am J Pathol.**, v. 164, p. 1361-1368, 2004.
23
- 24 ARAÚJO-JORGE, T. C.; CASTRO, S. L. **Doença de Chagas: Manual para experimentação**
25 **animal**. Rio de Janeiro: Fiocruz/Instituto Oswaldo Cruz, 366p, 2000.
26
- 27 ARETZ, H. T. Myocarditis: the Dallas criteria. **Hum Pathol.**, v. 6, p. 619-624, 1987.
28
- 29 BABINET, C.; COHEN-TANNOUDJI, M. Genome engineering via homologous
30 recombination in mouse embryonic stem (ES) cells: an amazingly versatile tool for the study
31 of mamalian biology. **An Acad Bras Cienc**. v.73, p. 365-380, 2001.
32
- 33 BAGGIOLINI, M.; DEWALD, B.; MOSER, B. HUMAN CHEMOKINES: An Update.
34 **Annu. Rev. Immunol.**, v. 15, p. 675-705, 1997.
35
- 36 BAHIA-OLIVEIRAL, M.; GOMES, J. A. S.; ROCHA, M. O.; MOREIRA, M. C.; LEMOS,
37 E. M.; LUZ, Z. M. P.; PEREIRA, M. E. S.; COFFMAN, R. L.; DIAS, J. C. P.; CANÇADO, J.
38 R.; GAZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. IFN-gamma in human
39 Chagas' disease: protection or pathology? **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 31, p. 127-131, 1998.
40
- 41 BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; GOMES, J. A. S.; CANÇADO, J. R.; FERRARI, T. C.;
42 LEMOS, E. M.; LUZ, Z. M.; MOREIRA, M. C.; GAZZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA,
43 R. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy
44 during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection 14-30 years ago. **J. Infect. Diseases**,
45 v. 182, p. 634-638, 2000.
46
- 47 BECKMAN, J. S.; BECKMAN, T. W.; CHEN, J.; MARSHALL, P. A.; FREEMAN, B. A.
48 Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: implications for endothelial injury
49 from nitric oxide and superoxide. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.** v. 87, p. 1620-1624, 1990.
50

- 1 BIRKS, E. J.; YACOUB, M. H. The role of nitric oxide and cytokines in heart failure. **Coron.**
2 **Artery Dis.** v. 8, p. 389-402, 1997.
3
- 4 BISWAS, S. K.; SODHI, A.; PAUL, S. Regulation of nitric oxide production by murine
5 peritoneal macrophages treated in vitro with chemokine monocyte chemoattractant protein 1.
6 **Nitric Oxide.** v. 6, p. 566-579, 2001.
7
- 8 BONECCHI, R.; BIANCHI, G.; BORDIGNON, P. P.; D'AMBROSIO, D.; LANG, R.;
9 BORSATTI, A.; SOZZANI, S.; ALLAVENA, P.; GRAY, P.A.; MANTOVANI, A.;
10 SINIGAGLIA, F. Differential Expression of Chemokine Receptors and Chemotactic
11 Responsiveness of Type 1 T Helper Cells (Th1s) and Th2s. **J Exp Med.**, v. 5, n. 187, p. 129-
12 134, 1998.
13
- 14 BOOM, W. H.; LIANO, D.; ABBAS, A. K. Heterogeneity of helper/inducer T lymphocytes.
15 II. Effects of interleukin 4- and interleukin 2-producing T cell clones on resting B
16 lymphocytes. **J Exp Med.**, v. 1, n. 167, p. 1350-1363, 1988.
17
- 18 BREDT, D. S.; HWANG, P. M.; GLATT, C. E.; LOWENSTEIN, C.; REED, R. R.;
19 SNYDER, S. H. Cloned and expressed nitric oxide synthase structurally resembles
20 cytochrome P-450 reductase. **Nature.**, v. 27, p. 714-718, 1991.
21
- 22 BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with
23 *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 4, p. 389- 396, 1962.
24
- 25 BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de
26 *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 5, p. 220-227, São Paulo, 1963.
27
- 28 BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop.**
29 **Méd. Parasitol.**, v. 59, p. 19-26, 1965.
30
- 31 BRENER, Z. – O Parasito: Relações Hospedeiro-parasito, em: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.
32 A. – *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. Editora Guanabara Koogan S. A. R.J, p.1-
33 41, 1979.
34
- 35 BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection
36 and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol.** v. 114, p. 103-110, 1997.
37
- 38 BRENER, Z, ANDRADE, Z.A., BARRAL-NETO, M. *Trypanossoma cruzi e Doença de*
39 **Chagas**. 2. ed. 431 p, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
40
- 41 BRENIER-PINCHART, M. P.; PELLOUX, H.; DEROUICH-GUERGOUR, D.;
42 AMBROISE-THOMAS, P. Chemokines in host-protozoan-parasite interactions. **Trends**
43 **Parasitol.** , v.17, p. 292-296, 2001.
44
- 45 BRODSKYN, C. I., BARRAL-NETO, M. Resposta Imune Humana na doença de Chagas In:
46 *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 413p.
47 p.170-176, 2000.
48
- 49 CAMPOS, R. F.; GONÇALVES, M. S.; DOS REIS, M. G.; ANDRADE, S. G. Comparative
50 analysis by polymerase chain reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable

- 1 strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones: possibility of
2 predominance of a principal clone in this area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 23-
3 29, 1999.
- 4
- 5 CAMPOS, M. A.; CLOSEL, M.; VALENTE, E. P.; CARDOSO, J. E.; AKIRA, S.;
6 ALVAREZ-LEITE, J. I.; ROPERT, C.; GAZZINELLI. Impaired production of
7 proinflammatory cytokines and host resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in
8 mice lacking functional myeloid differentiation factor 88. **J Immunol**. v.172, p. 1711-1718,
9 2004.
- 10
- 11 CHAGAS, C. Processos patogênicos da tripanosomíase americana. **Mem. Inst. Oswaldo**
12 **Cruz.**, v.3, p. 219, 1916.
- 13
- 14 CHAN, S. H.; PERUSSIA, B.; GUPTA, J. W.; KOBAYASHI, M.; POSPÍSIL, M.; YOUNG,
15 H. A.; WOLF, S. F.; YOUNG, D.; CLARK, S. C.; TRINCHIERI, G. Induction of interferon
16 gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder
17 cells and synergy with other inducers. **J Exp Med.**, v. 1, n. 173, p. 869-879, 1991.
- 18
- 19 CHANDRA, M.; TANOWITZ, H. B.; PETKOVA, S. B.; HUANG, H.; WEISS, L. M.;
20 WITTNER, S. M.; SHTUTIN, V.; JELICKS, L. A.; CHAN, J.; SHIRANI, J. Significance of
21 inducible nitric oxide synthase in acute myocardial caused by *Trypanosoma cruzi* (Tulahuen
22 strain). **Int. J. Parasitol.**, v.32, p. 897-905, 2002.
- 23
- 24 CHANDRASEKAR, B.; MELBY, P. C.; TROYER, D. A.; COLSTRON, J. T.; FREEMAN,
25 G. L. Temporal expression of pro-inflammatory cytokines and inducing nitric oxide sythase in
26 experimental acute Chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.**, v. 152, p. 925-934, 1998.
- 27
- 28 CHAPADEIRO, E.; BERALDO, P. S. S.; JESUS, P. C.; OLIVEIRA Jr, W. P.; JUNQUEIRA
29 Jr, L. F. Lesões cardíacas em ratos wistar inoculados com diferentes cepas de *Trypanosoma*
30 *cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 1, n. 3, p. 95-103, Jul-Set, 1988.
- 31
- 32 CHARO, I. F.; TAUBMAN, M. B. Chemokines in the pathogenesis of vascular disease. **Circ**
33 **Res.**,v. 95, p. 858–866, 2004.
- 34
- 35 CHEN, Z.; MALHOTRA, P. S.; THOMAS, G. R.; ONDREY, F. G.; DUFFEY, D. C.;
36 SMITH, C. W.; ENAMORADO, I.; YEH, N. T.; KROOG, G. S.; RUDY, S.; MCCULLAGH,
37 L.; MOUSA, S.; QUEZADO, M.; HERSCHER, L. L.; VAN WAES, C. Expression of
38 proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. **Clin.**
39 **Cancer Res.**, v. 5, p. 1369–1379, 1999.
- 40
- 41 CHEN, L.; WATANABE, T.; WATANABE, H.; SENDO, F. Neutrophil depletion
42 exacerbates experimental Chagas' disease in BALB/c, but protects C57BL/6 mice through
43 modulating the Th1/Th2 dichotomy in different directions. **Eur J Immunol.**, v. 31, n. 1, p.
44 265-75, 2001.
- 45
- 46 CLARK-LEWIS, I.; KIM, K. S.; RAJARATHNAM, K.; GONG, J. H.; DEWALD, B.;
47 MOSER, B.; BAGGIOLINI, M.; SYKES, .D. structure activity relationships of chemokines.
48 **J.Leukocytes Biol**. v. 57, p. 703-711, 1995.
- 49

- 1 COELHO, P. S.; KLEIN, A.; TALVANI, A.; COUTINHO, S. F.; TAKEUCHI, O.; AKIRA,
2 S.; SILVA, J. S.; CANIZZARO, H.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA M. M.
3 Glycosylphosphatidylinositol-anchored mucin-like glycoproteins isolated from *Trypanosoma*
4 *cruzi* trypomastigotes induce in vivo leukocyte recruitment dependent on MCP-1 production
5 by IFN- γ -primed-macrophages. **J Leukoc Biol.**, v. 1, n 5, p. 837-844, 2002.
6
- 7 COFFMAN, R. L.; SEYMOUR, B. W.; LEBMAN, D. A.; HIRAKI, D. D.;
8 CHRISTIANSEN, J. A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H. M.; SAVELKOUL, H. F.;
9 FINKELMAN, F. D.; BOND, M. W. The role of helper T cell products in mouse B cell
10 differentiation and isotype regulation. **Immunol Rev.** v. 102, p. 5-28, 1988.
11
- 12 CORRIGALL, V. M.; ARASTU, M.; KHAN, S.; SHAH, C.; FIFE, M.; SMEETS, T.; TAK,
13 P. P.; PANAYI, G. S. Functional IL-2 receptor beta (CD122) and gamma (CD132) chains are
14 expressed by fibroblast-like synoviocytes: activation by IL-2 stimulates monocyte
15 chemoattractant protein-1 production. **J Immunol.**, v. 15, p. 4141-4147, 2001.
16
- 17 COSTA, V. M.; TORRES, K. C.; MENDONÇA, R. Z.; GRESSER, I.; GOLLOB, K. J.;
18 ABRAHAMSOHN, I. A. Type I IFNs stimulate nitric oxide production and resistance to
19 *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 1, n. 177, p. 3193-200, 2006.
20
- 21 CUNHA, F. Q.; ASSREUY, J.; XU, D.; CHARLES, I.; LIEW, F. Y.; MONCADA, S.
22 Repeated induction of nitric oxide synthase and leishmanicidal activity in murine
23 macrophages. **Eur J Immunol.**, v. 3, n. 6, p. 1385-1388, 1993.
24
- 25 DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical
26 epidemiologic review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 22, p.147-156, 1989.
27
- 28 DIAS, J. C. P. Chagas' disease. Epidemiology and prevention. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 63, p.
29 451-455, 1994.
30
- 31 DOS SANTOS, R. R.; ROSSI, M. A.; LAUS, J. L.; SILVA, J. S.; SAVINO, W.; MENGEL, J.
32 Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn
33 hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Exp Med.**, v. 1, p. 29-
34 39, 1992.
35
- 36 EALICK, S. E.; COOK, W. J.; VIJAY-KUMAR, S.; CARSON, M.; NAGABHUSHAN, T.L.;
37 BUGG, C. E. Three-dimensional structure of recombinant human interferon-gamma. **Science**,
38 v. 252, p. 698-702, 1991.
39
- 40 FERRAZ, M. L.; GAZZINELLI, R. T.; ALVES, R. O.; URBINA, J. A.; ROMANHA, A. J.
41 The Anti-*Trypanosoma cruzi* Activity of Posaconazole in a Murine Model of Acute Chagas'
42 Disease Is Less Dependent on Gamma Interferon than That of Benznidazole. **Antimicrob.**
43 **Agents Chemother.** v. 51, p. 1359-1364, 2007.
44
- 45 FERREIRA, L. R. P.; ABRANTES, E. F.; RODRIGUES, C. V.; CAETANO, B.;
46 CERQUEIRA, G. C.; SALIM, A. C.; REIS, L. F. L.; GAZZINELLI, R. T. Identification and
47 characterization of a novel mouse gene encoding a Ras-associated guanine nucleotide
48 exchange factor: expression in macrophages and myocarditis elicited by *Trypanosoma cruzi*
49 parasites. **Journal of Leukocyte Biology**, v 72, p. 1215 - 1227, 2002.
50

- 1 FERREIRA, A. M.; TAKAGAWA, S.; FRESCO, R.; ZHU, X.; VARGA, J.; DIPIETRO, L.
2 A. Diminished induction of skin fibrosis in mice with MCP-1 deficiency. **J Invest Dermatol.**
3 v. 126, p. 1900–1908, 2006.
- 4
5 FIORENTINO, D. F.; BOND, M. W.; MOSMANN, T. R. Two types of mouse T helper cell.
6 IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. **J Exp Med.**,
7 v. 1, p. 2081-2095, 1989.
- 8
9 FORTES, P. C.; MENDES, J. G.; STINGHEN, A.; RIELLA, M. C.; PECOITS-FILHO, R.
10 Metabolic Syndrome Is Associated with Increased Plasma Levels of Monocyte
11 chemoattractant Protein in Dialysis Patients. **Cardiov. Dis.** v. 3, p. 12, 2007.
- 12
13 FRANGOIANNIS, N. G.; DEWALD, O.; XIA, Y.; REN, G.; HAUDEK, S.; LEUCKER,
14 T.; KRAEMER, D.; TAFFET, G.; ROLLINS, B. J.; ENTMAN, M. L. Critical role of
15 monocyte chemoattractant protein-1/CC chemokine ligand 2 in the pathogenesis of ischemic
16 cardiomyopathy. **Circulation.**, v. 6, p. 584-592, 2007.
- 17
18 GAJEWSKI, T. F.; FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN-gamma in immune
19 regulation. IV. Murine CTL clones produce IL-3 and GM-CSF, the activity of which is
20 masked by the inhibitory action of secreted IFN-gamma. **J Immunol.**, v.15, n. 144, p. 548-
21 556, 1990.
- 22
23 GALE, L. M.; MCCOLL, S. R. Chemokines: extracellular messengers for all occasions?
24 **Bioessays.**v. 21, n. 1, p. 17-28, 1999.
- 25
26 GARCIA-ZEPEDA, E.A.; COMBARDIERE, C.; ROTHENBERG, M.E.; SARAFI, M.;
27 HAMID, Q.; MURPHY, P. M.; LUSTER, A. D. Human monocyte chemoattractant protein
28 (MCP)-4: a novel CC chemokine with activities on monocytes, eosinophils, and basophils,
29 induced in allergic and non-allergic inflammation, that signals through the CC chemokine
30 receptors CKR-2 and CCR-3. **J. Immunol.**, v. 157, p. 5613–5626, 1996.
- 31
32 GAZZINELLI, R.T., OSWALDO, S.H., JAMES, L. The microbicidal activity of interferon-g
33 treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen
34 oxide-mediated mechanism inhabitable by interleukin-10 and transforming growth factor-b.
35 **European J. Immunol.**, v.22, p. 2501-2506, 1992.
- 36
37 GERMANN, T.; PARTENHEIMER, A.; RUDE, E. Requirements for the growth of
38 TH1 lymphocyte clones. **European Journal of Immunology, Weinheim**, v.20, n.9, p.2035-
39 2040, 1990.
- 40
41 GHARAEI-KERMANI, M.; DENHOLM, E. M.; PHAN, S. H. Costimulation of fibroblast
42 collagen and transforming growth factor beta1 gene expression by monocyte chemoattractant
43 protein-1 via specific receptors. **J Biol Chem.**, v. 271, p. 17779–17784, 1996.
- 44
45 GOMES, J. A. S.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M. G.; ROCHA, M. O. C.; MARTINS-FILHO, O.
46 A.; GAZINELLI, G.; CORREA-OLIVEIRA, R. Evidence that development of severe
47 cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to th1-specific immune response. **Inf.**
48 **Immun.**, v. 71, p. 1185-1193, 2003.
- 49

- 1 GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; LAGRANGE, P. H.; HURTREL, B.; KERR, I.;
2 ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of
3 experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. **Ann Immunol.**, v. 135, n. 3, p.
4 317-32, 1984.
- 5
6 GRANGER, D. N. Role of xanthine oxidase and granulocytes in ischemia-reperfusion injury.
7 **Am J Physiol.**, v. 255, p. 1269-1275, 1988.
- 8
9 GROUX, H.; O'GARRA, A.; BIGLER, M.; ROULEAU, M.; ANTONENKO, S.; de VRIES,
10 J. E.; RONCAROLO, M. G. A CD4+ T cell subset inhibits antigen-specific T-cell responses
11 prevents colitis. **Nature**, v. 389, p. 737-742, 1997.
- 12
13 GU, L.; TSENG, S.; HORNER, R. M.; TAM, C.; LODA, M.; ROLLINS, B. J. Control of
14 TH2 polarization by the chemokine monocyte chemoattractant protein-1. **Nature**, v. 404, p.
15 407-411, 2000.
- 16
17 HALLY, A. A counting method for measuring the volumes of tissue components in
18 microscopical sections. **Quaterly J Microsc Sci**, v. 105, p. 503, 1964.
- 19
20 HESSE, M.; CHEEVER, A. W.; JANKOVIC, D.; WYNN, T. A. NOS-2 mediates the
21 protective anti-inflammatory and antifibrotic effects of the Th1-inducing adjuvant, IL-12, in a
22 Th2 model of granulomatous disease. **Am J Pathol.**, v. 157, n. 3, p. 945-955, 2000.
- 23
24 HEVEL, J. M., WHITE, K. A., MARLETTA, M. A. Purification of the inducible murine
25 macrophage nitric oxide synthase identification as a flavoprotein. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p.
26 22789-22791, 1991.
- 27
28 HIGUCHI, M. L. Doença de Chagas. Importância do parasito na patogenia da forma crônica
29 cardiaca. **Arq. Bras. Cardiol.**, v. 64, p. 251-254, 1995.
- 30
31 HIGUCHI, M. L. Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite
32 relationship. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.**, v. 39, n. 1, p. 53-60, 1997.
- 33
34 HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A.;
35 BROMBACH. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptible
36 *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric
37 oxide synthase. **Infect. Immun.**, v. 66, p. 1208-1215, 1998.
- 38
39 JONES, E. M.; COLLEY, D. G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C. L.;
40 MCCURLEY, T. L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from
41 inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p.
42 348-357, 1993.
- 43
44 KIERZENBAUM, F.; HOWARD, J. G. Mechanisms of resistance against experimental
45 *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibodies and antibody-forming capacity in
46 the Biozzi high and low responder mice. **J. Immunol.**, v. 116, p.1208, 1976.
- 47
48 KIERSZENBAUM, F.; PIENKOWSKI, M. M. Thymus-Dependent Control of Host Defense
49 Mechanisms Against *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infect Immun.**, v. 24, n. 1, p. 117-120,
50 1979.

- 1
2 KIRSCHHOFF, L. V.; Is *Trypanosoma cruzi* a new threat to our blood supply? **Ann. Inter.**
3 **Med.**,v. 111, p. 773-775, 1989.
4
5 KODELJA, V.; MÜLLER, C.; POLITZ, O.; HAKIJ, N.; ORFANOS, C. E.; GOERDT, S.
6 Alternative Macrophage Activation-Associated CC-Chemokine-1, a Novel Structural
7 Homologue of Macrophage Inflammatory Protein-1a with a Th2-Associated Expression
8 Pattern. **J Immunol.** v. 1, n. 160, p.1411-1418, 1998.
9
10 KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. Resistance to *Trypanosoma cruzi* associated to antiliving
11 trypomastigote antibodies. **J. Immunol.**,v. 128, p. 2009 – 2012, 1982.
12
13 LAGUENS, R. P.; MECKERT, P. C.; CHAMBÓ, J. G. Antiheart Antibody-Dependent
14 Cytotoxicity in the Sera of Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect.**
15 **Immun.** p. 993-997, 1988.
16
17 LAMAS, S.; MARSDEN, P. A.; LI, G. K.; TEMPST, P.; MICHEL, T. Endothelial nitric
18 oxide synthase: molecular cloning and characterization of a distinct constitutive enzyme
19 isoform. **Proc Natl Acad Sci U S A.** v. 15, n. 89, p. 6348-6352, 1992.
20
21 LETTERIO, J. J.; ROBERTS, A. B. TGF-beta: a critical modulator of immune cell function.
22 **Clin Immunol Immunopathol.**, v. 84, n. 3, p. 244-250, 1997.
23
24 LOETSCHER. P.; SEITZ, M.; CLARK-LEWIS, I.; BAGGIOLINI, M.; MOSER, B.
25 Activation of NK cells by CC chemokines. Chemotaxis, Ca²⁺ mobilization, and enzyme
26 release. **J Immunol.** v. 1, n. 156, p. 322-327, 1996.
27
28 LOWENSTEIN, C. J.; GLATT, C. S.; BREDT, D. S.; SNYDER, S. H. Cloned and expressed
29 macrophage nitric oxide synthase contrasts with the brain enzyme. **Proc Natl Acad Sci U S**
30 **A.**, v. 1, n. 89, p. 6711-6715, 1992.
31
32 LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W. L.; PRATA, A. R. Patologia das principais
33 doenças tropicais no Brasil. Doença de Chagas. In: LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; RASO,
34 P.; TAFURI, W.L. **Bogliolo Patologia.** 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1987.
35 p.1047-1065.
36
37 LOPES, E. .R.; CHAPADEIRO, E.; ANDRADE, Z.; ALMEIDA, H. O; ROCHA, A.
38 Anatomia patológica de corações de chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento.
39 **Mem. Inst. Oswaldo Cruz,** v. 76, p.189-197, 1981.
40
41 LOPES, E. R.; CHAPADEIRO, E. Anatomia patológica da doença de Chagas humana. In:
42 DIAS, J. C. P., COURA, J. R. C. (org.). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma**
43 **abordagem prática para o clínico geral.** 486p. p. 67-84, Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997.
44
45 LOPES, E .R.; CHAPADEIRO, E.; TAFURI, W. L.; PRATA, A. R. Patologia das principais
46 doenças tropicais do Brasil. Doença de Chagas. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo.**
47 **Patologia.** 6. ed. 1328p. p. 1165-1275, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
48

- 1 LORSBACH, R. B.; MURPHY, W. J.; LOWENSTEIN, C. J.; SNYDER, S. H.; RUSSEL, S.
2 W. Expression of the nitric oxide synthase gene in mouse macrophage activated for tumor cell
3 killing. Molecular basis for the synergy interferon-gamma and lipopolysaccharide. **J. Biol.**
4 **Chem.**, v. 268, p. 1908-1913, 1993.
- 5
6 MACEDO, A. M.; PENA, S. D. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for
7 the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 1998.
- 8
9 MACHADO, F. S.; MARTINS, G. A.; ALLBERTI, J. C. S.; MESTRINER, F. L. A. C.;
10 CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. *Trypanosoma-cruzi* infected cardiomyocytes produce
11 chemokines and cytokines that trigger potent nitric oxide-dependent trypanocidal activity.
12 **Am. Heart Association**, v. 102, p. 3003-3008, 2000.
- 13
14 MADY, C.; PEREIRA BARRETO, A. C. P. Biópsia endomiocárdica na forma indeterminada
15 da doença de Chagas. **Arq. Bras. Cardiol.** v. 36, p. 387, 1981.
- 16
17 MANDARIN DE-LACERDA, C. A. Stereological tools in biomedical research. **Anais da**
18 **Academia Brasileira de Ciências**, v. 75, n. 4, p. 469-86, 2003.
- 19
20 MANTOVANI, A. The chemokine system: redundancy for robust outputs. **Immunol**
21 **Today**, v. 20, n. 6, p. 254-257, 1999.
- 22
23 MARLETA, M. A.; YOON, P. S.; IYENGAR, R.; LEAF, C. D.; WISHNOK, J. S.
24 Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric is an intermediate.
25 **Biochemistry**, v. 27, p. 8706-8711, 1988.
- 26
27 MARTINEZ, O. M.; GIBBONS, R. S.; GAROVOY, M. R.; ARONSON, F. R. IL-4 inhibits
28 IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human T cells. **J Immunol.**, v.
29 15, n. 144, p. 2211-2215, 1990.
- 30
31 MARTINS, G. A.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; SILVA, J. S. Nitric oxide-induced
32 apoptotic cell death in the acute phase of *Trypanosomacruzi* infection in mice. **Immunol.**
33 **Lett.**, v. 63, p. 113-120, 1998.
- 34
35 MATSUSHIMA, K.; LARSEN, C. G.; DUBOIS, G. C.; OPPENHEIM, J. J. Purification and
36 characterization of a novel monocyte chemotactic and activating factor produced by a human
37 myelomonocytic cell line. **J Exp Med.**, v. 169, p. 1485-1490, 1989.
- 38
39 MAYER, B.; SCHMIDT, K.; HUMBERT, P.; BÖHME, E. Biosynthesis of endothelium-
40 derived relaxing factor: a cytosolic enzyme in porcine aortic endothelial cells Ca²⁺-
41 dependently converts L-arginine into an activator of soluble guanylyl cyclase. **Biochem**
42 **Biophys Res Commun.**, v. 31, n. 164, p. 678-685, 1989.
- 43
44 MELO, R. C.; BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. **J**
45 **Parasitol.**, v. 64, n. 3, p. 475-482, 1978.
- 46
47 MEZADRI, T. J; THOMÁZ, V. A; AMARAL, V. L. L. **Animais de laboratório: 9 cuidados**
48 **na iniciação experimental.** 154p. Florianópolis, UFSC, 2004.
- 49

- 1 MICHAJLOWSKY, V.; SILVA, N. M.; ROCHA, C. D.; VIEIRA, L. Q.; LANNES-VIEIRA,
2 J.; GAZINELLI, R. T. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling
3 tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during
4 *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Pathol.**, v.159, p. 1723-1733, 2001.
5
- 6 MICHALANY, J. **Técnica Histológica em Anatomia Patológica**. São Paulo: Pedagogia e
7 Universitária,1980. 277p. p. 123-180. Cap. 11: Métodos selecionados de colorações e de
8 impregnações argênticas
9
- 10 MIGNONE, C. **Alguns aspectos da anatomia patológica da cardite chagásica crônica**.
11 Tese (Professor Catedrático de Anatomia Patológica). Faculdade de Medicina, Universidade
12 de São Paulo, 1958. 238p.
13
- 14 MONCADA, S.; PALMER, R. M.; HIGGS, E. A. Nitric oxide: physiology, pathophysiology,
15 and pharmacology. **Pharmacol. Rev.**, v. 43, p. 109-142, 1991.
16
- 17 MONCADA, S. The L-arginine: nitric oxide pathway. **Acta Physiol. Scand.**, v.145, p. 201-
18 227, 1992.
19
- 20 MOORE, K. W.; VIEIRA, P.; FIORENTINO, D. F.; TROUNSTINE, M. L.; KHAN, T. A.;
21 MOSMANN, T. R. Homology of cytokine synthesis inhibitory factor (IL-10) to the Epstein-
22 Barr virus gene BCRF1. **Science.**, v. 8, n. 248, p. 1230-1234, 1990.
23
- 24 MORTARA, R. A.; PROCÓPIO, D. O.; BARROS, H. C.; VERBISCK, N. V.; ANDREOLI,
25 W. K.; SILVA, R. B. S.; DA SILVA, S. Features of Host Cell Invasion by Different Infective
26 Forms of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, Vol. 94, Suppl. I:
27 135-137, 1999.
28
- 29 MORTATTI, R. C.; MAIA, L. C. S.; OLIVEIRA, A. V.; MUNK, M. E. Immunopathology of
30 Experimental Chagas' Disease: Binding of T Cells to *Trypanosoma cruzi*-Infected Heart
31 Tissue. **Infect Immun.**, v. 58, n. 11, p. 3588-3593, 1990.
32
- 33 MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R.
34 L. Two types of murine helper T Cell clone. I Definition according to profile of lymphokine
35 activities and secreted proteins, **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348-2357M, 1986.
36
- 37 MULLIGAN, J. M.; WHITE, K. A.; MARLETA, M. A. Tissue injury caused by deposition of
38 immune complex is L-arginin dependent. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 88, p. 6338-6342, 1991.
39
- 40 MUÑOZ-FERNANDEZ, M. A.; FERNANDEZ, M. A.; FRESNO, M. Synergism between
41 tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophages activation for the killing of
42 intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism, **Europ. J.**
43 **Immunol.**, v.22, p. 301-307, 1992.
44
- 45 NELSON, P. J.; KRENSKY, A. M. Chemokines, lymphocytes and viruses: what goes around,
46 comes around. **Curr Opin Immunol.**, v. 10, p. 265-70, 1998.
47

- 1 NICKELL, S. P.; GEBREMICHAEL, A.; HOFF, R.; BOYER, M. H. Isolation and functional
2 characterization of murine T cell lines and clones specific for the protozoan parasite
3 *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.**, v. 1, n. 3, p. 914-921, 1987.
- 4
5 NICKELL, S. P.; KEANE, M.; SO, M. Further Characterization of Protective *Trypanosoma*
6 *cruzi*-Specific CD4+ T-Cell Clones: T Helper Type 1-Like Phenotype and Reactivity with
7 Shed Trypomastigote Antigens. **Infect Immun.**, v. 61, n. 8, p. 3250-3258, 1993.
- 8
9 NOGUEIRA, N.; COHN, Z. A. *Trypanosoma cruzi*: in vitro induction of macrophage
10 microbicidal activity. **J Exp Med.**, v. 1, n. 148, p. 288-300, 1978.
- 11
12 ORLOFSKY, A.; LIN, E. Y.; PRYSTOWSKY, M. B. Selective induction of the beta
13 chemokine C10 by IL-4 in mouse macrophages. **J Immunol.**, v. 15, n. 152, p. 5084-5091,
14 1994.
- 15
16 PALOMINO, S. A.; AIELLO, V. D.; HIGUCHI, M. L. Systematic mapping of hearts from
17 chronic chagasic patients: the association between the occurrence of histopathological lesions
18 and *Trypanosoma cruzi* antigens. **Ann Trop Med Parasitol.**, v. 94, p. 571-579, 2000.
- 19
20 PELEMAN, R.; WU, J.; FARGEAS, C.; DELESPESE, G. Recombinant interleukin 4
21 suppresses the production of interferon gamma by human mononuclear cells. **J Exp Med.**, v.
22 1, n. 170, p. 1751-1756, 1989.
- 23
24 PRATA, A. Classificação da infecção chagásica no homem. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.
25 23, p.109-113, 1990.
- 26
27 RASSI, A. Clínica: **fase aguda**. In: BRENER, Z. ; ANDRADE, Z.A. *Trypanosoma cruzi* e
28 doença de Chagas. p. 249-264, Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1979.
- 29
30 REED, S. G. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophages
31 activation, and prevents acute disease, immune suppression an in experimental *Trypanosoma*
32 *cruzi* infections. **J. Immunol.**, v. 140, p. 4342-4347, 1988.
- 33
34 REED, S. G.; Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. In: LIEW FY, COX FEG (eds):
35 Immunology of Intracellular Parasitism. **Chem. Immunol., Basel**, v. 70, p. 124-143, 1998.
- 36
37 REIS, D.D.; JONES, E.M.; TOSTES, S. JR.; LOPES, E.R.; GAZZINELLI, G.; COLLEY,
38 D.G.; MCCURLEY, T.L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic
39 myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of
40 granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 48, p.637-44, 1993.
- 41
42 RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; ROSSI, M. A.; LAUS, J. L.; SILVA, J. S.; SAVINO, W.;
43 MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to
44 syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J**
45 **Exp Med.**, v. 1, n. 175, p. 29-39, 1992.
- 46
47 RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; ROSSI, M. A. Imunopatologia. In: J. R. Cançado and M.
48 Chuster – Cardiopatia chagásica. Belo Horizonte. **Fundação Carlos Chagas**, p. 10-22, 1985.
- 49

- 1 ROBERSON, E. L.; HANSON, W. L. *Trypanosoma cruzi*: effects of anti-thymocyte serum in
2 mice and neonatal thymectomy in rats. **Exp Parasitol.**, v. 34, n. 2, p. 168-180, 1973.
3
- 4 ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, v. 1; n.90, p. 909-928, 1997.
5
- 6 ROLLINS, B. J.; WALZ, A.; BAGGIOLINI, M. Recombinant human MCP-1/JE induces
7 chemotaxis, calcium flux and the respiratory burst in human monocytes. **Blood**, v 78, p. 1112-
8 1116, 1991.
9
- 10 ROMAGNANI, S. The Th1/Th2 paradigm. **Immunol Today**, v. 18, p. 263-266, 1997.
11
- 12 ROSSI, M. A.; SILVA, J. S. Permeability alteration of the sarcolemmal membrane,
13 particularly at the site of macrophage contact, in experimental chronic *Trypanosoma cruzi*
14 myocarditis in mice. **Int J Exp Pathol.**, v. 71, n. 4, p. 545-555, 1990.
15
- 16 ROSSI, M. A.; RAMOS, S. G. Coronary microvascular abnormalities in Chagas' disease. **Am.**
17 **Heart J.**, v. 132, p. 207-210, 1996.
18
- 19 ROSSI, D.; ZLOTNIK, A. The biology of chemokines and their receptors. **Annu Rev**
20 **Immunol.**, v. 18, p. 217-242, 2000.
21
- 22 ROUGER, K.; LOUBOUTIN, J. P.; VILLANOVA, M.; CHEREL, Y.; FARDEAU, M. X-
23 Linked vacuolated myopathy TNF- α and IFN- γ expression in muscle fibers with MHC class I
24 on sarcolemma. **Am. J. Pathol.**, v. 158, p.355-359, 2001.
25
- 26 RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; HONTEBEYRIE-
27 JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in
28 *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann Inst Pasteur**
29 **Immunol.**, v. 139, n. 3, p. 225-236, 1988.
30
- 31 SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to
32 *Leishmania major* in mice. **Nat Rev Immunol.**, v. 2, n. 11, p. 845-858, 2002.
33
- 34 SAM, F.; SAWYER, D. B.; XIE, Z.; CHANG, D. L.; NGOY, S.; BRENNER, D. A.; SIWIK,
35 D. A.; SINGH, K.; APSTEIN, C. S.; COLUCCI, W. S.. Mice lacking inducible nitric oxide
36 synthase have improved left ventricular contractile function and reduced apoptotic cell death
37 late after myocardial infarction. **Circ Res.**, v. 89, p. 351-356, 2001.
38
- 39 SANTOS-BUCH, C. A.; TEIXEIRA, A. R. L. The immunology of experimental Chagas'
40 disease. III. Rejection of allogeneic heart cells *in vitro*. **J. Exp. Med.**, v. 140, p. 38-53, 1974.
41
- 42 SARAFI, M. N. ; GARCIA-ZEPEDA, E. A.; MACLEAN, J. A.; CHARO, I.F.; LUSTER, A.
43 D. Murine monocyte chemoattractant protein (MCP)-5: a novel CC chemokine that is a
44 structural and functional homologue of human MCP-1. **J Exp Med.**, v. 6, n. 185, p. 99-109,
45 1997.
46
- 47 SCHMUNIS, G. A.; CAPPAS, S. M.; TRAVERSA, O. C.; JANOVSKEY, J.F. The effect of
48 immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in
49 mice. **Trans R Soc Trop Med Hyg.**, v. 65, n. 1, p. 89-94, 1971.
50

- 1 SEDER, R. A.; GAZZINELLI, R.; SHER, A.; PAUL, W. E. Interleukin 12 acts directly on
2 CD4+ T cells to enhance priming for interferon gamma production and diminishes interleukin
3 4 inhibition of such priming. **Proc Natl Acad Sci U S A.**, v. 1, n. 90, p.1088-1092, 1993.
4
- 5 SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-
6 derived cytokines. **Annu Rev Immunol.**, v. 10, p. 385-409, 1992.
7
- 8 SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D.;
9 REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma*
10 *cruzi* infection. **J Exp Med.**, v. 1, n. 175, p. 169-174, 1992.
11
- 12 SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C.; CUNHA, F. Q. Tumor
13 necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing
14 nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. **Infect. Immun.**,
15 v. 63, 4862-4867, 1995.
16
- 17 SILVA, J. S.; ALIBERTI, J. C.; MARTINS, G. A.; SOUZA, M. A.; SOUTO, J. T.; PÁDUA,
18 M. A. The role of IL-12 in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz J Med Biol Res.**
19 v. 1, n. 31, p. 111-115, 1998.
20
- 21 SCOTT, P. Selective differentiation of CD4+ T helper cell subsets. **Curr Opin Immunol.**, v.
22 5, n. 3, p. 391-397, 1993.
23
- 24 SOUZA, W. O parasito e sua interação com os hospedeiros. In: BRENER, Z, ANDRADE,
25 Z.A., BARRAL-NETO, M. **Trypanossoma cruzi e Doença de Chagas**. 2. ed. 431p. 88-126,
26 Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.
27
- 28 TAFURI, W.L. **Patogênese**. In: **Cançado, J.R.; Chuster, M. Cardiopatia Chagásica. Belo**
29 **Horizonte**: Fundação Carlos Chagas, 1985.
30
- 31 TAKEHARA, H. A.; DA SILVA, A. M.; BRODSKYN, C. I.; MOTA, I. A comparative
32 study of anti-*Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in
33 mice. **Immunol Lett.** v. 2, p. 81-85, 1989.
34
- 35 TAKEHARA, H. A.; PERINI, A.; DA SILVA, M. H.; MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of
36 different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp Parasitol.** v. 52,
37 n. 1, p. 137-146, 1981.
38
- 39 TALVANI, A.; RIBEIRO, C. S.; ALIBERTI, J. C.; MICHAJLOWSKY, V.; SANTOS, P. V.;
40 MURTA, S. M.; ROMANHA, A. J.; ALMEIDA, I. C.; FARBER, J.; LANNES-VIEIRA, J.;
41 SILVA, J. S.; GAZZINELLI, R. T. Kinetics of cytokine gene expression in experimental
42 chagasic cardiomyopathy: tissue parasitism and endogenous IFN-gamma as important
43 determinants of chemokine mRNA expression during infection with *Trypanosoma cruzi*.
44 **Microbes Infect.** v. 8, p. 851-866, 2000.
45
- 46 TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M.;
47 WITTNER, M. Chagas' disease. **Clin Microbiol Rev.** v. 4, p.400-419, 1992.

- 1 TARLETON, R. L. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-
2 induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J Immunol.** v. 2, n.144, p. 717-
3 724, 1990.
- 4
- 5 TARLETON, R. L.; KOLLER, B. H.; LATOUR, A.; POSTAN, M. Susceptibility of beta 2-
6 microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature.**, v.26p. 356-367; 338-
7 340, 1992.
- 8
- 9 TEIXEIRA, A. R. L.; SANTOS-BUCH, C. A. The Immunology of Experimental Chagas'
10 Disease II. Delayed hypersensitivity to *trypanosoma cruzi* antigens. **Immunology**, v.28, p.
11 401-410, 1975.
- 12
- 13 TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and
14 *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol.** v. 18, n. 6, p.262-265, 2002.
- 15
- 16 TIBAYRENC, M.; BRENIERE, S.F. *Trypanosoma cruzi*: major clones rather than principal
17 zymodemes. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** v. 83 Suppl 1, p. 249-55, 1988.
- 18
- 19 TOSTES JUNIOR, S., LOPES, E.R., PEREIRA, F.E., CHAPADEIRO, E. Miocardite
20 chagásica crônica humana: estudo quantitativo dos linfócitos CD4+ e dos CD8+ no exsudato
21 inflamatório. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p.127-134, 1994.
- 22
- 23 TRINCHIERI, G..Interleukin-12 and its role in the generation of TH1 cells. **Immunol**
24 **Today.** v. 7, p. 14, p. 335-338, 1993.
- 25
- 26 TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS,
27 H.; CARLIER, Y. Interleukin-6 (IL-6) Production in Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*:
28 Effect of Its Paradoxical Increase by Anti-IL-6 Monoclonal Antibody Treatment on Infection
29 and Acute-Phase and Humoral Immune Responses. **Infect Immun.** v. 2, n. 62, p. 692-696,
30 1994.
- 31
- 32 UGUCCIONI, M.; LOETSCHER, P.; FORSSMANN, U.; DEWALD, B.; LI, H. D.; LIMA,
33 S. H.; LI, Y. L.; KREIDER, B.; GAROTTA, G.; THELEN, M.; BAGGIOLINI, M. Monocyte
34 chemotactic protein 4 (MCP-4), a novel structural and functional analogue of MCP-3 and
35 eotaxin. **J.Exp. Med.** v.183, p.2379-84, 1996.
- 36
- 37 VAN DAMME, J.; PROOST, P.; LENAERTS, J. P.; OPDENAKKER, G. Structural and
38 functional identification of two human, tumor-derived monocyte chemotactic proteins (MCP-
39 2 and MCP-3) belonging to the chemokine family. **J. Exp Med.** v. 176, n. 1, p. 59-65, 1990.
- 40
- 41 VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q.; SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of
42 *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect.**
43 **Immunol.**, v.62, p.5177-5182, 1994.
- 44
- 45 VIANA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patológica na moléstia de Chagas. **Mem.**
46 **Inst. Oswaldo Cruz**, v. 3, p. 276, 1911.
- 47
- 48 WAGHABI, M. C.; COUTINHO, C. M.; SOEIRO, M. N.; PEREIRA, M. C.; FEIGE, J. J.;
49 KERAMIDAS, M.; COSSON, A.;MINOPRIO, P.; VAN LEUVEN, F.; ARAÚJO-JORGE, T.
50 Increasead *Trypanosoma cruzi* invasion and heart fibrosis associated with high transforming

- 1 growth factor beta levels in mice deficient in alpha (2)-macroglobulin. **Infect Immun.** v. 70, p.
2 5115-5123, 2002.
- 3
- 4 WAYNFORTH, H. B.; FLECKNELL, P. A. Experimental and surgical technique
5 11 in the rat. 2. ed. **London: Academic Press**, 1992. 328p.
- 6
- 7 WENDEL, S.; BRENER, Z.; RASSI, A.; CAMARGO, M. Chagas Disease (**American**
8 **Trypanosomiasis**): **it's impact on transfusion and clinical medicine.** Soc. Brasil. Hematol.
9 e Hemoterapia, ISBT, 1992.
- 10
- 11 WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease: tenth program report.** WHO
12 Tech. Rep. Ser. Nº 811, 1991.
- 13
- 14 YEUNG, R. S. M.; PENNINGER, J.; MAK, T. W. T-cell development and function in gene-
15 knockout mice. **Curr Opinion Immunol.** v.6, p. 298-307, 1994.
- 16
- 17 YOSHIMURA, T.; MATSUSHIMA, K.; OPPENHEIM, J. J.; LEONARD, E. J. Neutrophil
18 chemotactic factor produced by lipopolysaccharide (LPS)-stimulated human blood
19 mononuclear leukocytes: partial characterization and separation from interleukin 1 (IL 1).
20 1987. **J Immunol.** v. 175, n. 9, p. 5569-74, 1987.
- 21
- 22 YOSHIMURA, T.; YUHKI, N.; MOORE, S. K.; APPELLA, E.; LERMAN, M. I.;
23 LEONARD, E. J. Human monocyte chemoattractant protein- 1 (MCP-1). Full-length cDNA
24 cloning, mononuclear leukocytes, and expression in mitogen-stimulated blood sequence
25 similarity to mouse competence gene JE. **Federation of European Biochemical Societies.** v.
26 244, n. 2, p. 481-493, 1989.

This document was created with Win2PDF available at <http://www.win2pdf.com>.
The unregistered version of Win2PDF is for evaluation or non-commercial use only.
This page will not be added after purchasing Win2PDF.