

Capa

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Biologia Celular e Molecular

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DE CININAS
NA PATOGENIA DA MIOCARDITE MURINA DECORRENTE
DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*.

RAFAELA VIEGAS RYMER

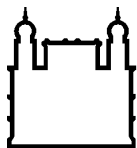
Rio de Janeiro
2008

Lombada

DISSERTAÇÃO MBCM -IOC

R.V. RYMER

2008



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

RAFAELA VIEGAS RYMER

Estudo da participação do sistema de cininas na patogenia da miocardite murina decorrente da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Orientador (es): Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado
Profa. Dra. Elizangela da Silva Monteiro

RIO DE JANEIRO
2008

R995

Rymer, Rafaela Viegas.

Estudo da participação do sistema de cininas na patogenia da miocardite murina decorrente da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*./ Rafaela Viegas Rymer. – Rio de Janeiro, 2008.

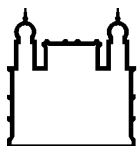
xvii, 131 f.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz, Curso de Pós-graduação em Biologia Celular e Molecular, 2008.

Bibliografia: f. 100-131

1. Cininas. 2. Miocardite murina. 3. *Trypanosoma cruzi*. 4. Doença de Chagas I.Título.

CDD: 612.18



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

AUTOR: RAFAELA VIEGAS RYMER

**ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NA PATOGENIA DA
MIOCARDITE MURINA DECORRENTE DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO
*Trypanosoma cruzi.***

ORIENTADOR (ES): Prof. Dr. Marcelo Pelajo Machado
Profa. Dra. Elizangela da Silva Monteiro

Aprovada em: 05/12/2008

EXAMINADORES:

Prof. Dr. Henrique Leonel Lenzi - Presidente
Prof. Dra. Lycia de Brito Gitirana
Prof. Dr. Alberto Felix Antônio da Nobrega

Rio de Janeiro, 05 de Dezembro de 2008

Esta dissertação foi orientada pelos Doutores Marcelo Pelajo Machado e Elizangela da Silva-Monteiro, e realizada no Laboratório de Patologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz/RJ. Esse trabalho recebeu apoio financeiro da CAPES.

Aos meus pais, Aurora e Roberto
pelo amor incondicional e por todos os ensinamentos.

Ao meu padrinho querido, Douglas
pelo amor, carinho e preocupação.

A minha avó e segunda mãe, Norma,
por todo o amor dedicado e pela falta que você faz

AGRADECIMENTOS

A minha mãe, agradeço pelos inúmeros colos e beijos e por todas as broncas, afinal foram essas demonstrações de amor que moldaram a pessoa que eu sou hoje. Agradeço a Deus por ter me dado uma mãe tão maravilhosa. Espero um dia poder ser tão boa mãe para meus filhos como você é para mim. Muito obrigada mãe. Te amo!

Pai, obrigada por estar novamente ao meu lado. Meu lugar é onde está a minha família, e minha família nunca vai estar completa sem você. Obrigada pelo apoio, carinho e pelas inúmeras vezes que você me salvou dos meus panes automobilísticos. Te amo!

A minha irmãzinha, Juju, agradeço pelo amor, pelas conversas, pelas brigas... Sei que muitas vezes nós mudamos os papéis e você se torna a irmã mais velha, mas quero que saiba que pode contar comigo sempre. Assim como eu conto com você. Aproveitando que estou agradecendo à você, lembrei que tenho que agradecer aos nossos pais, por terem me dado uma irmã tão maravilhosa quanto você. Te amo muito!!!!

Agradeço muito a minha família, por estar sempre ao meu lado e por ser meu porto seguro. A minha vó Suzana, meus tios Cristina e Zé, minha madrasta (boadrasta) Edit, minha priminha e seu marido Nananda e Guilherme, meus primos Fernando e Renatinha, meu cunhadinho Rafinha e minha bolinha peluda Skol. Amo muito vocês!!!

Ao meu padrinho e tio, que não está mais entre nós, mas que foi muito importante na minha vida. Obrigada por ter estado sempre ao meu lado quando eu precisei. Obrigada por ter sido o responsável pelo meu primeiro estágio na Fiocruz. Obrigada por tudo. Te amo muito! Você faz muita falta!!

Ao meu primo, Guilherme, que foi embora tão cedo... Obrigada por ter feito parte de minha vida. Nunca vou esquecer das nossas brincadeiras aqui em casa na piscina, com o Bateau Mouche do playmobil e a galinha na boia. Ou da gente brincando na sua casa de comandos em ação e com o forte do playmobil, ou da

gente em Búzios. Foram tantos bons momentos... Crescer junto a você foi muito bom, e sua ausência será sempre sentida. Você foi e sempre será muito importante na minha vida. Te amo demais!!! Sinto a sua falta.

A todos os meus amigos, por todo o apoio e por não me permitirem esquecer das minhas obrigações com a recorrente pergunta: “E aí, quando você defende?” Agradeço principalmente a Adriana, Ana Paula, Roberta, Tatiana, Pedro, Cecília, Carol, e Juli. Obrigada.

A minha orientadora, Eliz, obrigada por toda a confiança e atenção despendida, por todas as discussões, pelo carinho e pelos vários puxões de orelha. Obrigada pelos finais de semana de trabalho e pelas dicas por telefone. Obrigada por tudo!

Ao meu orientador, Marcelo, obrigada por ter aberto as portas do laboratório de patologia para mim, e por ter me acolhido no seu grupo de pesquisa após 1 ano de mestrado. Obrigada pela consideração, pelas correções e pelas sofridas análises de lâminas.

Ao Dr. Lenzi, pelas inúmeras dicas e boa vontade, pelos capítulos de livro e artigos enviados, pelo auxílio com a análise das lâminas e, apesar da distância, pela presença e participação. Muito obrigada!!!

As minhas alunas de iniciação científica, rrsrsrs Roberta e Rafaela, obrigada pelas inúmeras horas de experimento, pelas cantorias, pela ajuda, por todas as risadas, pelo carinho, pelas discussões e pelos brownies... Obrigada por terem estado ao meu lado. Vocês tornaram essa difícil jornada em uma caminhada bem mais prazerosa. Não sei como vai ser trabalhar sem vocês. Vou sentir muita falta. Obrigada meninas!!!

A todos os integrantes do laboratório de patologia, que de alguma forma, direta ou indiretamente, ajudaram na elaboração dessa dissertação. Seja pela atenção no confocal (Bernardo e PP), na manutenção dos animais e ciclos (Fátima, Ci, Iolanda e Andrea), no corte e coloração de lâminas (Luciana, Luzia Barros, Luzia Caputo e Marcelo Barbosa), no auxílio na secretaria (Rosi e Alexandra), na

manutenção do laboratório (Andréa), suporte com os computadores (Júnior), auxílio na imunistoquímica (Dra. Éster e Adelaide) ou simplesmente dicas e discussões de trabalho (Dra. Bárbara, Priscila, Arnon, Tatiane, Tiana, Dra. Sâmia, Flávia, Isabella, Juliana, Waldemiro, Rodrigo e Dra Lycia). Agradeço especialmente a revisão e ajuda com as cópias finais a Dra. Barbara e a Priscila. Obrigada meninas, vocês foram muito importante nessa fase final.

Aos nossos colaboradores no Laboratório de Imunologia Molecular do Instituto de Biofísica Carlos Chagas filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro. Principalmente ao Dr. Julio Scharfstein e a Dra. Verônica Schmitz. Obrigada pela oportunidade de trabalhar com um projeto tão interessante. Fico muito feliz em poder contribuir para o trabalho de vocês. Obrigada!

A todos os integrantes do Laboratório de Esquistosomose experimental, minha primeira casa científica, obrigada pelos ensinamentos, carinho e apoio. Obrigada Ana Maria, Mônica, Patrícia, Dra Mirian, Paulinha, João, Haroldo, Dona Jadir, Gracinha e Adriano.

Aos amigos que eu fiz ao longo do caminho, no Laboratório Nacional de Computação Científica – LNCC e no laboratório de Pesquisas sobre o Timo. Um agradecimento especial ao Wallace, por todo o incentivo e ajuda.

Aos integrantes do serviço de produção e tratamento de imagem, em especial ao Rodrigo e Bruno, pela ajuda essencial no tratamento das imagens, montagem das pranchas e impressão. Obrigada.

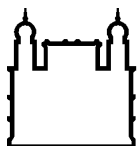
A coordenação do programa de pós-graduação em biologia Celular e Molecular. Obrigada por oferecer um curso de tamanha excelência.

Aos funcionários do departamento de ensino, principalmente a Daniele Lobato e Eduardo. Pela atenção e por todos os pepinos resolvidos. Obrigada.

A FAPERJ, pelo auxílio financeiro durante os 2 anos de tese.

Todos sabemos que, sem as rochas, as ondas não subiriam tão alto.

Roger Nimier



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ESTUDO DA PARTICIPAÇÃO DO SISTEMA DE CININAS NA PATOGENIA DA MIOCARDITE MURINA DECORRENTE DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*.

RESUMO:

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Rafaela Viegas Rymer

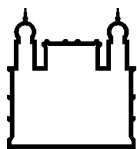
Uma das principais patologias relacionadas à Doença de Chagas é a cardiopatia chagásica, sendo uma das principais causas de morte durante a fase aguda da infecção. A cardiopatia aguda difere da crônica, devido ao processo inflamatório intenso e a presença de ninhos de parasitas, diferente do processo fibrótico e praticamente ausência de parasitas, observado durante a fase crônica.

As cininas são um grupo de proteínas vasoativas que apresentam uma relação estreita com a infectividade do *Trypanosoma cruzi*. Diversos autores descrevem a capacidade do *T. cruzi* em ativar o sistema de cininas e infectar células, sendo sua infectividade, potencializada, pela inibição da degradação dessas moléculas. Cininas podem induzir resistência à infecção pelo *T. cruzi* através da ativação de células dendríticas, pela via de sinalização dependente de B₂R. Recentemente, foi demonstrado que camundongos tratados com captopril durante o curso da infecção desenvolvem menos fibrose e necrose do tecido cardíaco e redução da inflamação.

Assim, nós decidimos investigar o papel do sistema de cininas na formação da cardiopatia chagásica, durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*.

Nossos resultados demonstram que o sistema de cininas não é capaz de modular a curva de parasitemia, nem a celularidade de órgãos linfóides primários e secundários durante a fase aguda da infecção experimental, com a exceção de HOE-140, que foi capaz de inibir o aumento da celularidade descrito para linfonodos subcutâneos durante a fase aguda. Por outro lado, as cininas são capazes de modular a expressão de moléculas de matriz extracelular no coração. Nós observamos que a potencialização do sistema de cininas aumenta o infiltrado inflamatório na fase aguda, e que o bloqueio do B₂R parece agravar essa situação, enquanto que o processo de formação da fibrose é inversamente proporcional ao aporte celular.

Nossos dados sugerem que a via de cininas participa da formação da cardiopatia, durante a fase aguda da infecção e que possivelmente existe um mecanismo compensatório agindo através de B₁R, para assumir parte da atividade vasoativa de B₂R.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

OSWALDO CRUZ INSTITUTE

STUDY OF THE PARTICIPATION OF THE KININ SYSTEM ON THE PATHOGENESIS OF THE MURINE CARDIOMYOPATHY FOLLOWING BY THE EXPERIMENTAL *Trypanosoma cruzi* INFECTION.

ABSTRACT:

Rafaela Viegas Rymer

One of the major pathologies related to Chaga's Disease is the cardiomyopathy, being one of the main cause of death during the acute phase of the infection. The acute cardiomyopathy differs from the chronic, due to the intense inflammatory process and the presence of parasite's nests, opposed to the fibrotic and almost absence of parasite's observed during the chronic phase.

Kinins are a group of vasoactive proteins that have a tight relationship with *Trypanosoma cruzi*'s infection. Authors described the *T. cruzi*'s capacity to activate the kinin system and infect cells, and that its infectivity is potentiated by the inhibition of kinin's degradation. Kinins may induce acquired resistance to *T. cruzi* infection through the activation of dendritic cells via B₂R/kinin signaling pathway. A recent work demonstrated that mice treated with captopril during the course of infection, present less fibrosis and necrosis of the cardiac tissue and reduction of inflammation.

Thus, we decided to investigate the role of the kinin system on the formation of the chagasic cardiomyopathy.

Our results demonstrate that the kinin system can't modulate the parasitemy curve nor the cellularity of primary and secondary lymphoid organs during the acute phase of the experimental infection, with the exception of HOE-140, who down modulated the increased cellularity described in subcutaneous lymph nodes during the acute phase. On the other hand, kinins can modulate the expression of extracellular matrix molecules on the heart. We observed that the potentiation of the kinin system increases the inflammatory infiltrate during the acute phase, and the blockage of the B₂R seems to aggravate it, while the fibrosis process is inversely proportional to the inflammation.

Our data suggests that the kinin system participates in the formation of the cardiopathy, during the acute phase of the infection, and there might be compensatory mechanism acting through the B₁R to assume some of B₂R's vasoactive activity during B₂R blockage.

ABREVIATURAS E SIGLAS:

α 2M – α 2-Macroglobulina

A – Átrio

APC – Célula Apresentadora de Antígeno

Arg – Arginina

AV – Átrio Ventricular

B₁R – Receptor de Bradicinina 1

B₂R – Receptor de Bradicinina 2

BK – Bradicinina

BOD – Demanda Bioquímica de Oxigênio

BSA – Albumina de Soro Bovino

cAMP – Adenosina Monofosfato cíclico

CAP – Captopril/Inibidor da enzima conversora de angiotensina

cGMP – Guanosina Monofosfato cíclico

CO₂ – Dióxido de carbono

CPM – Carboxipeptidase M

CPN – Carboxipeptidase N

CRD – Domínio de Reconhecimento a Carboidratos

DAG – Diacilglicerol

DC – Células Dendríticas

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle Medium

DP – Duplo Positivas

DTH – Hipersensibilidade do Tipo Tardia

ECA (ACE) – Enzima Conversora de Angiotensina

ECAi – inibidor da Enzima Conversora de Angiotensina - Captopril

ERK – Quinase Regulada por Sinal Extracelular

FN – Fibronectina

Gal-3 – Galectina-3

G_i – Proteína G inibitória

Gly – Glicina

GPI – Glicosilfosfatidilinositol

G_s – Proteína G estimulatória

HE – Hematoxilina eosina

HK – Cininigênio de alto peso molecular

HOE-140 – Icatiban/Inibidor B₂ específico
IFN- γ – Interferon gama
Ig – Imunoglobulina
IL – Interleucina
IP₃ – Inositol-1,4,5-trifosfato
Kb – Kilobase
kDa – KiloDalton
KI – Cininase I
KII – Cininase II
LK – Cininogênio de baixo peso molecular
LN – Lamina
LPS – Lipopolissacarídeo
Lys – Lisina
Lys-BK – Lisil-Bradiginina (Calidina)
MAPK – Proteína Quinase Ativada por Mitógeno
MEC – Matriz extracelular
Met – Metionina
MHC – Complexo de Histocompatibilidade Principal
NEP – Endopeptidase Neutra
NK – “Natural Killer”
NO – Óxido Nítrico
O₂ - Oxigênio
OMS – Organização Mundial da Saúde
PAMPs – Padrões Moleculares Associados à Patógenos
PBS – Salina Tamponada Fosfatada
pH – Potencial Hidrogeniônico
Phe – Fenilalanina
pI – Ponto Isoelétrico
PKA – Proteína Quinase A
PMA-PRS – Ácido Fosfomolibdico- Picrosírius Red
PMN's – Polimorfonucleares
Pro – Prolina
RGDS – Arginina; Glicina; Ácido aspártico; Serina
RNA – Ácido ribonucleico
SBF – Soro Bovino Fetal

Ser – Serina

T. cruzi – *Trypanosoma cruzi*

TCT – Tripomastigotas de Cultura

TEC – Células Epiteliais Tímicas

TGF- β – Fator de Crescimento Tumoral-beta

TLR2 – Receptores “Toll-Like” do tipo 2

TNF- α – Fator de Necrose Tumoral alfa

TNF- γ - Fator de Necrose Tumoral gama

Treg – Célula T regulatória

Tyr – Tirosina

VD – Ventrículo direito

VE – Ventrículo Esquerdo

ÍNDICE:

1. INTRODUÇÃO: -----	1
1.1 Doença de Chagas -----	1
1.1.1 Breve histórico -----	1
1.1.2 Biologia do <i>Trypanosoma cruzi</i> : ciclo -----	2
1.1.3 Transmissão -----	4
1.1.4 Fase aguda -----	6
1.1.4.1 Resposta imunitária durante a fase aguda -----	8
1.1.5 Fase crônica -----	9
1.1.5.1 Resposta imunitária durante a fase crônica -----	11
1.1.6 Matriz extracelular e matriproteínas na cardiopatia chagásica ----	14
1.1.6.1 Matriproteínas – Galectinas -----	17
1.2 Cininas -----	20
1.2.1 Introdução -----	20
1.2.2 Receptores -----	21
1.2.3 Biologia do sistema de cininas -----	23
1.2.4 Função -----	25
1.2.5 Cininas e <i>Trypanosoma cruzi</i> -----	25
2. RACIONAL: -----	29
3. OBJETIVOS: -----	30
3.1 Metas específicas -----	30
4. MATERIAIS E MÉTODOS-----	31
4.1 Animais e infecção -----	31
4.2 Tratamento -----	31
4.3 Parasitemia -----	32
4.4 Obtenção dos tecidos e células -----	32
4.5 Histopatologia -----	33
4.6 Colorações e impregnação por prata-----	33
4.6.1 Hematoxilina Eosina (HE) -----	34
4.6.2 Giemsa de Lennert -----	34
4.6.3 Tricromática de Masson -----	34
4.6.4 Reticulina de Gomori -----	35
4.6.5 Picrosírius convencional (Sirius Red)-----	35
4.6.6 Picrosírius modificado para confocal (PMA-PRS) -----	36

4.6.7 Resorcina-Fucsina (oxidada) -----	36
4.6.8 Resorcina-Fucsina (não-oxidada) -----	37
4.7 Imunofluorescência -----	37
4.8 Gráficos e estatística -----	38
5. RESULTADOS: -----	39
5.1 Parasitemia -----	39
5.2 Celularidade -----	41
5.3 Estudo histopatológico da cardite aguda -----	44
5.3.1 Composição e intensidade do infiltrado inflamatório -----	44
5.3.1.1 Grupo controle -----	44
5.3.1.2 Grupo infectado -----	44
5.3.1.3 Grupo infectado e tratado com captopril -----	45
5.3.1.4 Grupo infectado e tratado com captopril + HOE-140 -----	46
5.3.1.5 Grupo infectado e tratado com HOE-140 -----	46
5.3.2 Composição e intensidade da Fibrose -----	66
5.3.2.1 Picosírius para microscopia confocal (PMA-PRS) -----	66
5.3.2.2 Reticulina de Gomori -----	67
5.3.2.3 Tricromática de Masson -----	68
5.3.2.4 Resorcina-Fucsina não-oxidada -----	69
5.4 Expressão de galectina-3 e MEC no coração -----	83
6. DISCUSSÃO: -----	89
7. CONCLUSÃO: -----	98
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS: -----	100

1. INTRODUÇÃO:

A cardiopatia, considerada uma das principais complicações clínicas da doença de Chagas, acomete 30% dos pacientes infectados e pode se manifestar muitos anos após o contato com o parasito. Os mecanismos moleculares envolvidos na ativação da resposta imunitária durante a fase aguda, podendo estar relacionados à suscetibilidade ou resistência à fase crônica, ainda não são compreendidos. O nosso trabalho tem como objetivo estudar a participação do sistema de cininas, como moléculas pró-inflamatórias, relacionadas à dor, vasodilatação e aumento de permeabilidade dos vasos, na cardite aguda, em modelos experimentais infectados pelo *Trypanosoma cruzi*, com a cepa DM28c. Pretendeu-se relacionar o aporte celular para o coração, secreção e deposição de moléculas de matriz extracelular, que em conjunto formam o processo inflamatório do tecido cardíaco, com o sistema de cininas, aumentando a disponibilidade de cininas e bloqueando o receptor constitutivo desta via, B₂R.

Assim, procurou-se agregar novos conceitos ao estudo da tripanosomíase experimental, mostrando a participação de um importante sistema endógeno na formação da cardite aguda.

1.1 Doença de Chagas.

1.1.1 Breve Histórico.

O médico brasileiro, Carlos Chagas, durante uma expedição em 1908 a Minas Gerais, identificou no sangue de um sagüi, um protozoário do gênero *Trypanosoma* e o designou de *Trypanosoma minasense*. Após encontrar protozoários flagelados no intestino de um inseto hematófago e inferindo que esses poderiam ser parasitos naturais do inseto ou formas evolutivas do tripanossomo, Carlos Chagas os enviou a Oswaldo Cruz, em Manguinhos. Após, a constatação de que os protozoários eram infectantes para sagüis criados em laboratório e, que não se tratava do *Trypanosoma minasense*, mas de uma nova espécie, Carlos Chagas nomeou o protozoário flagelado de *Trypanosoma cruzi* em homenagem a Oswaldo Cruz. A nota anunciando esta descoberta foi redigida em 17 de dezembro de 1908 e publicada na revista do Instituto

de Doenças Tropicais de Hamburgo. Em 1909, Carlos Chagas observou, pela primeira vez, o parasito no sangue de uma criança febril. Somente em 22 de Abril deste mesmo ano, a revista Brasil Médico publicou sua descoberta (www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home).

A doença de Chagas, ou tripanossomíase americana, tradicionalmente acomete indivíduos de origem rural, que habitam residências de baixa qualidade, onde o inseto vetor pode facilmente co-habitar. Com a crescente urbanização da população rural, principalmente na última década, o risco de transmissão da doença de Chagas aumentou muito nas áreas urbanas, obrigando os estados a desenvolverem triagens mais rigorosas de doadores de sangue, uma vez que os insetos vetores, normalmente, não estão presentes em meios urbanos (Dias, 2007). Atualmente, a doença de Chagas é endêmica em 18 países das Américas Central e do Sul e, segundo estimativas, mais de 60 milhões de pessoas encontram-se em áreas de risco, com 12 a 14 milhões de pessoas infectadas, na América Latina (WHO, 2002). No Brasil, estima-se que 41 milhões de pessoas estejam em áreas de risco, com 1,9 milhões de pessoas infectadas (XI reunião INCOSUR/Chagas 2002). Dias (2007) estimou que 70% dos indivíduos chagásicos no Brasil estejam vivendo em meio urbano (Dias, 2007).

1.1.2 Biologia do *Trypanosoma cruzi*: ciclo.

A infecção ocorre predominantemente pelo contato da pele ou mucosa de mamíferos hospedeiros com a urina ou fezes do inseto, infectado pelo parasito, em suas formas tripomastigota e epimastigota. Os vetores da infecção são insetos hematófagos da subfamília Triatominae, família Reduviidae, gêneros *Triatoma*, *Panstrongylus* e *Rhodnius* conhecidos popularmente por “barbeiro”. Já foi descrito que o *T. cruzi* é capaz de infectar mais de 100 espécies de mamíferos de diferentes ordens, incluindo animais domésticos e silvestres. A forma infectante, tripomastigota, infecta a maioria dos tipos celulares de mamíferos, incluindo fibroblastos, células epiteliais, células endoteliais, cardiomiócitos e macrófagos (de Souza, 2005). A internalização do parasito se inicia através de adesão à célula hospedeira. Diversos estudos indicam que a adesão decorre de um processo de reconhecimento celular, no qual glicoproteínas e proteínas do tipo lectina, presentes tanto na célula hospedeira quanto no parasito, estão

envolvidas (de Araújo-Jorge, 1989; Ciavaglia *et al.*, 1993). Tripomastigotas entram nas células hospedeiras por dois mecanismos, os quais envolvem uma interação precoce com os lisossomos da célula hospedeira (Tardieux *et al.*, 1992; Woosley *et al.*, 2003). A fusão com o lisossomo durante a entrada do parasito ou logo após é um evento crítico para que o *T. cruzi*, complete o seu ciclo intracelular (Andrade & Andrews, 2004). Proteases do parasito estão envolvidas nesse processo, como é o caso da cruzipaína. Essas proteases, ao serem bloqueadas por inibidores específicos, diminuem, significativamente, o processo de invasão da célula hospedeira por tripomastigotas (de Araújo-Jorge *et al.*, 1992). Após a penetração nas células hospedeiras, o *T. cruzi* rompe o vacúolo parasitóforo, pela ação de uma proteína lítica dependente de pH ácido e, escapa para o meio citoplasmático (Andrews & Whitlow, 1989; Ley *et al.*, 1990; Andrews *et al.*, 1990). Após entrar em contato com o citosol, o parasito se diferencia na forma amastigota. Essa forma é morfológica e antigenicamente distinta da forma tripomastigota, sendo capaz de se replicar no citosol (Brener, 1973). Quando a célula hospedeira se rompe, muitas formas infectantes desse flagelado são liberadas no espaço intersticial, podendo infectar células adjacentes ou penetrar na corrente sanguínea, possibilitando a infecção de outros órgãos ou tecidos. As formas tripomastigotas presentes na corrente sanguínea são as responsáveis pela disseminação da doença, pois são essas as formas infectantes ingeridas pelo inseto vetor. Depois de ingeridos, os parasitos são levados ao estômago do inseto, onde as formas tripomastigotas sofrem outra diferenciação e, em seguida, migram para o intestino, onde se multiplicam como formas epimastigotas. Ao migrarem para o reto do triatomíneo, o parasito transforma-se na forma tripomastigota metacíclica infectante, sendo eliminado juntamente com as fezes e urina do inseto, iniciando novamente o ciclo (de Souza, 2000).

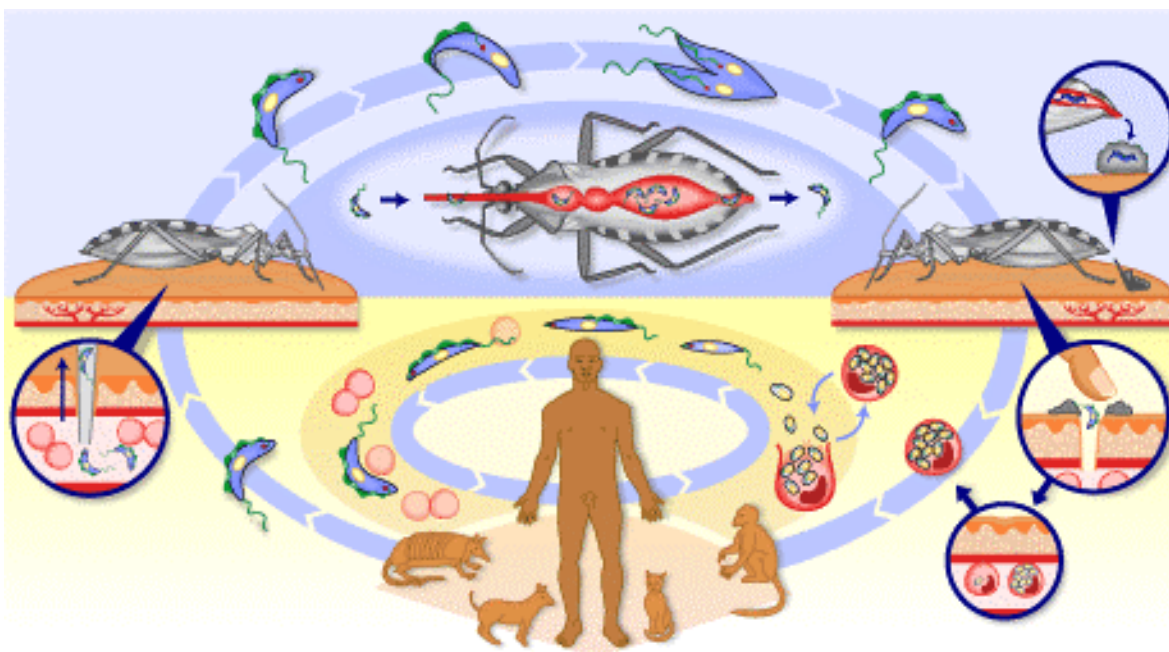


Figura 1.1: Ciclo do *Trypanosoma cruzi*. Figura original obtida do site: TDR/Wellcome Trust

No decorrer dos anos, após a sua descoberta, diversos autores descreveram diferentes respostas em seus modelos experimentais. Análises genéticas demonstraram a existência de diferentes cepas do *T. cruzi* (Andrade, 1999). A utilização de novos e diversos métodos moleculares possibilitou revelar a complexa diversidade genética desse parasito, gerando diferentes classificações, dependendo do método utilizado. Atualmente, as cepas de *T. cruzi* são classificadas em dois principais grupos, denominadas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (Andrade *et al.*, 1970; Andrade *et al.*, 1985). Essa denominação foi aceita após um consenso entre especialistas, que propuseram a unificação das várias classificações, baseadas em diferentes marcadores (Anonymous, 1999). *T. cruzi* I é observado principalmente em animais e triatomídeos selvagens. Enquanto, *T. cruzi* II é normalmente encontrado em humanos (Fernandes *et al.*, 1998; Zingales *et al.*, 1998).

1.1.3 Transmissão.

A doença de Chagas possui três ciclos de transmissão: doméstico, peridoméstico e silvestre, sendo o primeiro de maior importância epidemiológica. No entanto o ciclo

peridoméstico, muitas vezes, serve de ponte para os outros ciclos. A susceptibilidade do homem e de animais domésticos ao *T. cruzi* e a proliferação de triatomíneos nas habitações, levaram à disseminação do parasito. Dessa forma, o ciclo doméstico passou a ter fundamental importância na expansão da infecção chagásica, podendo existir independente do ciclo silvestre (Barreto, 1979; Forattini, 1980).

A transmissão natural ou primária da doença de Chagas, na década de 70, era responsável por aproximadamente 80% das infecções humanas. No entanto, nas duas décadas seguintes, a infecção transfusional ganhou importância epidemiológica (Dias, 2007). O aumento nos casos de doença de Chagas através de infecções transfusionais se deu com a migração de indivíduos infectados para os centros urbanos e devido à falta de um controle efetivo na seleção de doadores de sangue (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2005). A infecção transfusional é a principal causa do aparecimento de casos de doença de Chagas nos Estados Unidos e na Europa (Tarleton, 2007). A enfermidade, no entanto, pode ser transmitida também por via congênita e oral. Ainda, não existe um tratamento efetivo com relação à via congênita, de maneira que a detecção e tratamento precoces constituem a melhor estratégia (Dias & Macedo, 2005; Secretaria de vigilância da saúde/MS, 2005). A infecção oral, no caso do homem, ocorre de forma ocasional e esporádica, podendo ocorrer pela ingestão de alimentos contaminados com o inseto e/ou seus dejetos (Dias, 2006; www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/240305_nota.pdf ; Coura *et al.*, 1994).

A infecção humana pode ser muito grave, com mortalidade significativa, principalmente, em crianças durante a fase aguda e, levando ao acometimento de órgãos, durante a fase crônica. As formas agudas aparentes se manifestam em 3% dos casos, em área endêmica. As formas indeterminadas, em 50%, enquanto, as formas cardíacas, em 30% e as digestivas entre 7% e 8% (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2005).

Diversos métodos de controle da doença de Chagas são utilizados na prevenção, detecção e tratamento. Porém, ainda são extremamente limitados com relação aos aspectos cruciais; os atuais métodos e estratégias de controle vetorial possuem limitações significativas, os diagnósticos clínicos da doença são variáveis e de confiabilidade incerta, as drogas para tratamento são inadequadas e as vacinas são inexistentes (Tarleton, 2007).

1.1.4 Fase Aguda.

Os mecanismos que sucedem à presença do parasito no hospedeiro são: primeiramente uma intensa reação inflamatória, com a participação de células mononucleares, seguida de reações generalizadas com infiltrado de células mononucleares, neutrófilos e eosinófilos (Andrade, 1991). A infecção aguda pelo *T. cruzi* é seguida por uma forte ativação do sistema imunitário, apresentando uma ativação inespecífica de macrófagos (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1976; Brener & Gazzinelli, 1997) e células “Natural Killer” (NK) (Hatcher *et al.*, 1981), acompanhada por uma ativação policlonal de linfócitos T e B (Minoprio *et al.*, 1986; Minoprio *et al.*, 1987). Os mecanismos envolvidos nessa forte ativação do sistema imunitários ainda não são claros, porém, estudos discutem a participação de glicoconjugados presentes na superfície de tripomastigotas e amastigotas nesses processos (Zingales *et al.*, 1982; Scharfstein *et al.*, 1983).

A fase aguda da doença de Chagas se caracteriza por fenômenos clínicos que se estabelecem nos primeiros dois a quatro meses de infecção (Rassi *et al.*, 2000a). O período de incubação varia entre 4 e 10 dias, mas pode não ser identificado, pois o quadro clínico é oligossintomático, podendo até ser assintomático, em alguns casos. A fase aguda é caracterizada por febre de intensidade variável e, diretamente relacionada com o grau de parasitemia (em torno de 38°C), mal-estar geral, cefaléia, astenia e hiporexia, inflamação dos linfonodos, hepato e esplenomegalia (Rassi *et al.*, 2000b). No local da penetração do parasito pode ocorrer uma reação inflamatória, conhecida como chagoma de inoculação (Mazza & Freire, 1940). O edema inflamatório unilateral das pálpebras (sinal de Romaña) ocorre quando indivíduos são picados pelo inseto nas pálpebras ou, as fezes contaminadas entram em contato com a mucosa dos olhos (Romaña, 1935). As manifestações fatais ou que podem constituir uma ameaça à vida, incluem miocardite, meningite e encefalite.

As manifestações cardíacas são difusas e de grande intensidade, geralmente acompanhadas de pericardite e, às vezes, de certo grau de endocardite. O quadro da miocardite chagásica aguda é muito semelhante a miocardites agudas de outras etiologias. Ao contrário do que ocorre na fase crônica, as alterações cardíacas da fase

aguda têm uma característica inflamatória intensa e não fibrótica (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2005).

Por sua vez, as alterações radiológicas consistem em graus variáveis de aumento da área cardíaca, que ocorre devido à presença de líquido, de natureza inflamatória ou não, na cavidade pericárdica (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2005).

Dentre as manifestações de sistema nervoso, destacam-se as convulsões de intensidade e periodicidade variáveis. Os sintomas se manifestam, principalmente, em crianças de pouca idade, inclusive lactentes (Rassi *et al.*, 2000c). O comprometimento hepático é a manifestação mais comum relacionada ao sistema digestório, e se expressa por lesões de natureza inflamatória e degenerativa, sem caráter evolutivo e que tendem a regredir com a cronicidade da infecção. Ocorre também um comprometimento digestivo, com a aperistalse do esôfago e megacólon, devido a lesões no sistema nervoso autônomo periférico (Rassi *et al.*, 2000d).

O tratamento terapêutico durante a fase aguda é realizado, através da administração dos compostos Nifurtimox (Lampit, Bayer HealthCare) e Benzonidazol (Rochagan, Roche Pharmaceuticals), sendo este último o mais utilizado. Entretanto, ambos apresentam efeitos colaterais relevantes e por vezes intensos, necessitam ser utilizados por períodos longos e apresentam eficácia variável (Urbina & Docampo, 2003). Os efeitos colaterais dessas drogas são: cefaléias, vertigens, anorexia, perda de peso, dermatites, lassidão e anemia (Rassi *et al.*, 2000e). Atualmente, a Organização Mundial da Saúde (OMS) e outras entidades ligadas à saúde, indicam que o tratamento terapêutico com esses compostos só seria indicado durante a fase aguda da doença de Chagas e, por um período curto da fase crônica (alguns anos) (www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm). No entanto, diversos estudos proporcionam razões para questionar essa recomendação, uma vez que demonstram que ambas as drogas são capazes de diminuir a parasitemia e moderar a progressão da doença, em todas as suas fases (Tarleton, 2007).

Em cerca de 90% dos casos, todas as manifestações da fase aguda, desaparecem espontaneamente e progressivamente, em algumas semanas ou meses. Somente em 10% dos indivíduos a doença evolui, levando ao óbito. As principais

patologias associadas são a insuficiência cardíaca e meningoencefalite (Rassi *et al.*, 2000f).

1.1.4.1 Resposta imunitária durante a fase aguda.

Independente da porta de entrada para o *T. cruzi*, os eventos relacionados à entrada e expansão do parasito são bastante semelhantes em animais e humanos.

Uma das primeiras células do sistema imunitário a entrar em contato com o *T. cruzi*, são os macrófagos. Esses são capazes de reconhecer e endocitar os parasitos, formando fagolisossomos. Dentro dos fagolisossomos, os parasitos podem escapar para o citosol e começam a se multiplicar. Isso inicia uma série de interações celulares e moleculares que mobilizam a resposta imunitária inata do hospedeiro (Kretzli & Brener, 1976; Romeiro *et al.*, 1984). Os macrófagos começam a produzir Interleucina 12 (IL-12), que leva à ativação de células NK. Células NK ativadas, por sua vez, produzem Interferon-gama (IFN- γ). O IFN- γ é uma citocina responsável por ativar e melhorar a resposta microbida de macrófagos (Lima-Martins *et al.*, 1985) e tem papel importante no início da infecção, o que foi demonstrado em camundongos deficientes do receptor de IFN- γ . Esses animais mostraram-se muito mais suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* (Hölscher *et al.*, 1998). O fator de necrose tumoral-alfa (TNF- α) induz, sinergicamente com IL-12, a atividade microbida de macrófagos. Animais deficientes dos receptores de TNF- α apresentam alta parasitemia e aumento da mortalidade (Derouich-Guergour *et al.*, 2001). Por outro lado, animais suscetíveis à infecção apresentam aumento na produção de TNF- α , por macrófagos, quando comparados com animais resistentes (Russo *et al.*, 1989). Citocinas regulatórias como interleucina 10 (IL-10) e fator de crescimento tumoral-beta (TGF- β) possuem importante papel para regular os efeitos letais das citocinas pró-inflamatórias (Gazzinelli *et al.*, 1992). IL-10 é uma citocina que apresenta funções imunossupresivas por controlar negativamente a produção de IFN- γ , óxido nítrico (NO) e antígenos de complexos de histocompatibilidade principais (MHC) classe II, em macrófagos. Camundongos deficientes para IL-10 morrem precocemente durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*, enquanto, camundongos controle (não deficientes de IL-10) sobrevivem à infecção aguda, apresentando uma síndrome semelhante a intoxicação, possivelmente, mediada pela superprodução de TNF- α

(Aliberti *et al.*, 2001; Hölscher *et al.*, 2000). Além disso, IL-10 e TGF- β são importantes citocinas regulatórias de macrófagos ativadas, inibem a síntese de NO, assim como as atividades tripanosomicidas dos macrófagos (Gazzinelli *et al.*, 1992).

Os linfócitos possuem papel crucial na resposta contra doenças infecciosas. Durante a fase aguda, foi observada uma intensa ativação policlonal de linfócitos T e B (Dutra *et al.*, 1994). Porém, nem todos os linfócitos ativados, durante a fase aguda, são específicos ao *T. cruzi*. Ao contrário, o que observamos é uma resposta inespecífica com células reativas a antígenos não parasitários (Minoprio *et al.*, 1986).

Células T CD8⁺ possuem papel importante como reguladoras do perfil de citocinas produzidas pelas células T CD4⁺. Esse evento ocorre na etapa inicial da resposta imunológica, influenciando a direção e o perfil da resposta imunitária (Kemeny *et al.*, 1994). Camundongos deficientes em β 2-microglobulina são mais suscetíveis à infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton *et al.*, 1992). Além disso, células infectadas, *in vitro*, são reconhecidas por linfócitos T CD8⁺ obtidos de animais infectados (Nickell *et al.*, 1993). O perfil de citocinas produzidas por linfócitos T CD4⁺ é crucial para a resposta à infecção. Trabalhos utilizando diferentes modelos experimentais demonstraram que respostas predominantemente Th1 induzem uma maior resistência à infecção, enquanto que a predominância Th2, gera susceptibilidade (Miller *et al.*, 1996; Rodrigues *et al.*, 1999; Schnapp *et al.*, 2002). Kotner e Tarleton em 2007 estudaram o papel dos linfócitos T regulatórios (Treg) (CD4⁺ CD25⁺) no modelo experimental de infecção pelo *T. cruzi* em murinos. Através da depleção com anticorpos monoclonais anti-CD25, observaram que as células Treg CD4⁺ CD25⁺ não são necessárias para a evasão das respostas imunitárias iniciais e eventuais, e que as Treg não são responsáveis pela disfunção das células T CD8⁺ em sítios de persistência parasitária (Kotner & Tarleton, 2003).

1.1.5 Fase Crônica.

Durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer um período sem manifestações clínicas aparentes, mas com a presença comprovada da infecção, caracterizando os chamados indivíduos assintomáticos. Os indivíduos assintomáticos, na maioria dos casos, apresentam um bom estado de saúde e boa capacidade de

trabalho. No entanto, são de grande importância epidemiológica, uma vez que esses indivíduos, em sua maioria, desconhecem o fato de estarem doentes e não buscam tratamento. Por outro lado, são capazes de transmitir a doença, caso o inseto vetor alimente-se de seu sangue.

O período indeterminado ocorre durante a fase crônica da doença, logo após a fase aguda. Os indivíduos indeterminados podem desenvolver os sintomas clínicos, anos ou décadas mais tarde. Em alguns casos, o indivíduo não desenvolve as manifestações clínicas e permanece o resto da vida como indeterminado (Ribeiro & Rocha, 2000). O Ministério da Saúde estima que 50% dos chagásicos apresentam a forma indeterminada da doença (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2005).

Os aspectos característicos da doença são observados durante o período sintomático, da fase crônica. Esse período se caracteriza por uma drástica diminuição dos índices de parasitismo a níveis subpatentes. Estima-se que 20% a 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* apresentem alterações do miocárdio, de severidade variada, dez a vinte anos após a infecção e, 7% a 8% apresentam alterações no tubo digestivo (esôfago e cólon) (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2005).

A forma digestiva crônica se caracteriza por alterações ao longo do trato digestivo, ocasionada por destruição neuronal simpática dos plexos nervosos, causando alterações na motilidade e morfologia do trato digestivo. Dentre as alterações mais comuns estão o megaesôfago e megacólon. O tratamento da forma digestiva crônica depende do estágio que a doença foi diagnosticada, sendo utilizadas dietas específicas, laxativos ou lavagens, e, nos estágios mais avançados, a dilatação ou correção cirúrgica (Secretaria de vigilância em saúde/MS, 2005).

A cardiopatia chagásica é a forma mais comum de cardiomiopatia nas Américas Central e Sul e, é a principal causa de morte cardiovascular em áreas endêmicas (Rassi *et al.*, 2006). Cerca de 30% dos indivíduos crônicos desenvolvem essa forma, apresentando manifestações clínicas significativas, que podem levar à morbidade e mortalidade (Marin-Neto *et al.*, 2000). A cardiopatia chagásica crônica é incapacitante e representa um problema econômico nos países em desenvolvimento.

A análise histológica de tecidos, provenientes de biópsias e necrópsias, mostra uma intensa fibrose, inflamação e hipertrofia das fibras cardíacas. A fibrose é mais pronunciada no ventrículo esquerdo e ápice e varia em severidade e localização

(intersticial e/ou difusa) (Zacks *et al.*, 2005). O aspecto da lesão cardíaca é um infiltrado composto por um grande número de macrófagos e células T (96%), apresentando uma predominância de 2:1 do subtipo T CD8⁺ para o subtipo T CD4⁺. O infiltrado está relacionado com a lesão da fibra cardíaca, que leva à fibrose e posterior hipertrofia compensatória (Higuchi *et al.*, 1987; Higuchi *et al.*, 1993; Tostes *et al.*, 1994). O número de células T CD8⁺ varia em relação à presença de antígenos parasitários, enquanto, o número de células T CD4⁺ se mantém inalterado (Higuchi *et al.*, 1997).

Células T obtidas a partir de células mononucleares de sangue periférico, de pacientes chagásicos assintomáticos são predominantemente linfócitos T CD4⁺. Por outro lado, os linfócitos T obtidos de pacientes com sintomas cardíacos ou gastrointestinais exibem o fenótipo de células T CD8⁺, sugerindo uma possível participação dessas células nos mecanismos imunopatológicos (Cuna & Cuna, 1995). Tecidos cardíacos, obtidos em necrópsias de pacientes com cardiomiopatia chagásica grave, revelaram que as lesões inflamatórias eram principalmente caracterizadas por linfócitos T CD8⁺, muitos dos quais expressando granzima A. Além disso, foi caracterizada a presença de macrófagos expressando TNF- α , raras células NK e linfócitos B (Reis *et al.*, 1993).

O início precoce do tratamento, quando bem conduzido, pode beneficiar significativamente o prognóstico dos pacientes, aumentando a sobrevida e melhorando a qualidade de vida. O tratamento da cardiopatia chagásica crônica, no entanto, não é o mesmo da fase aguda. Durante a fase crônica são recomendadas drogas utilizadas em outras cardiopatias, como carditônicos, diuréticos, antiarrítmicos e vasodilatadores. Nos casos mais graves, pode ser necessária a implantação de marcapasso e/ou de desfibrilador implantável. Recentemente, com avanços na terapia celular, foi desenvolvido um protocolo de transplante autólogo de células-tronco, que experimentalmente se mostraram capazes de reconstituir as fibras cardíacas, reduzindo a proporção de infiltrado inflamatório e de fibrose locais (Dohmann *et al.*, 2008).

1.1.5.1 Resposta imunitária durante a fase crônica.

Os eventos que levam à cardiopatia chagásica crônica ainda não são bem compreendidos. Duas hipóteses tentam explicar a instalação dessa cardiopatia: a

primeira postula a formação de respostas auto-reativas contra o tecido cardíaco (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 1992), enquanto que a segunda relaciona a persistência de antígenos parasitários, que podem disparar respostas inflamatórias, levando à destruição tecidual (Tarleton, 2003).

Diversos autores descrevem a presença de auto-anticorpos contra laminina (LN) (Milei *et al.*, 1993), miocárdio, músculo esquelético, endocárdio, vasos e interstício (Cossio *et al.*, 1974). Dentre os anticorpos presentes no soro de pacientes chagásicos, foram encontrados alguns que reagem contra receptores muscarínicos e adrenérgicos de cardiomiócitos (Borda *et al.*, 1984; Sterin-Borda *et al.*, 1991).

Teixeira e colaboradores demonstraram que a infecção crônica pelo *T. cruzi*, induz o aparecimento de linfócitos, com citotoxicidade específica contra fibras do miocárdio (Santos-Buch & Teixeira, 1974; Teixeira & Santos-Buch, 1975; Teixeira *et al.*, 1975). O mimetismo molecular, que leva à geração de respostas auto-imunes, é demonstrado com o reconhecimento cruzado, por linfócitos, a antígenos do *T. cruzi* e fibras do miocárdio (miosina) ou células nervosas. Esses dados foram obtidos tanto em modelos experimentais quanto em pacientes (Rizzo *et al.*, 1989; Cunha-Neto *et al.*, 1995; Levin *et al.*, 1989; Sadigursky *et al.*, 1988; Hontebeyrie-Joskowicz *et al.*, 1987). A transferência de linfócitos T CD4⁺ de animais infectados, para transplantes cardíacos singenéticos (não infectados), em animais normais, provoca lesões cardíacas semelhantes às vistas nos animais cronicamente infectados, levando à rejeição do transplante (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 1992). Tarleton demonstrou que esse efeito não ocorre com todas as linhagens de camundongos e, que para algumas, tais como C3H é necessária a presença do parasito para que ocorra a rejeição do transplante cardíaco singenético (Tarleton *et al.*, 1997). Recentemente, Ribeiro-dos-Santos (2001) demonstrou que uma linhagem de célula T CD4⁺ gerada a partir de células obtidas de animais cronicamente infectados, mantida em cultura com extrato de tecido cardíaco não infectado, induz rejeição em transplantes cardíacos singenéticos, morte em mioblastos e reconhecimento de antígenos parasitários (Ribeiro-dos-Santos *et al.*, 2001). Além disso, a transferência adaptativa dessa linhagem celular para camundongos *nude* não infectados induz intensa miocardite (Soares *et al.*, 2001).

As células T CD4⁺ constituem em torno de 5% das células encontradas nos sítios inflamatórios. As que apresentam perfil auto-reativo geram uma resposta de

hipersensibilidade tardia contra extratos do parasito e nervo periférico (Fernandez *et al.*, 1992). As células T CD8⁺ são predominantes nos infiltrados inflamatórios (Reis *et al.*, 1993; Tarleton *et al.*, 1994), sendo responsáveis pela citólises e fibroses encontradas nos tecidos cardíacos. Camundongos *nudes* infectados pelo *T. cruzi* apresentam intenso parasitismo tecidual, porém, sem aspecto inflamatório no coração (Soares *et al.*, 2001). Assim, fortes respostas imunes celulares, na infecção experimental pelo *T. cruzi*, são necessárias para iniciar as respostas imunes que levam a danos no coração (DosReis *et al.*, 2005). Aparentemente, respostas Th2 favorecem a permanência do parasito no miocárdio, durante a fase crônica. Porém, dados experimentais demonstram que células T CD4⁺, em particular o subtipo Th2, são responsáveis pelo controle da infecção parasitária e, que ambas Th1 e Th2, podem estar envolvidas nas respostas auto-imunes (Spinella *et al.*, 1990). Por outro lado, o *T. cruzi* diminui a expressão das moléculas de superfície CD3, CD4, e CD8 (Sztein *et al.*, 1990), favorecendo sua própria sobrevivência.

Cunha-Neto demonstrou a presença de anticorpos, em pacientes chagásicos, que reconhecem miosina cardíaca e o antígeno parasitário B-13^[88]. Em seguida, o mesmo grupo demonstrou que células T obtidas de pacientes chagásicos reagem cruzadamente com miosina cardíaca e antígeno B13 (Cunha-Neto *et al.*, 1996).

A miocardite chagásica apresenta aspectos histopatológicos muito similares à cardiopatia auto-imune induzida por inoculação com miosina cardíaca (Soares *et al.*, 2001). Durante a fase aguda, soro de camundongos A/J apresenta anticorpos que reconhecem fortemente a miosina cardíaca e desenvolvem hipersensibilidade do tipo tardia (DTH) contra miosina cardíaca (Leon *et al.*, 2001). Alguns autores acreditam que as respostas auto-imunes observadas na fase crônica são disparadas ainda na fase aguda da infecção (Soares *et al.*, 2001).

O *T. cruzi* pode também agir provocando ou realçando uma resposta auto-reativa, mantida sob controle por mecanismos supressores, em primeiro lugar, por infectar fibras cardíacas, levando a necrose e liberação de antígenos, gerando assim uma intensa inflamação, ainda na fase aguda da infecção. Em segundo lugar, o *T. cruzi* pode afetar as propriedades de células apresentadoras de antígeno profissionais, tais como macrófagos e células dendríticas (DC). Neste contexto, foi demonstrado que as moléculas do *T. cruzi* podem modular a produção de citocinas pró-inflamatórias por

macrófagos (Almeida *et al.*, 2000) e afetar a maturação de DCs (Van Overtvelt *et al.*, 1999). Em terceiro lugar, a resposta imune cruzada, contra antígenos parasitários e tecidos do hospedeiro, pode gerar respostas auto-reativas.

Na infecção experimental do *T. cruzi*, os níveis elevados de IFN- γ são produzidos durante a fase aguda da doença (Hoft *et al.*, 1993; Zhang & Tarleton, 1996). Linfócitos IFN- γ ⁺ estão presentes em maior número, principalmente nos grupos de pacientes nos quais antígenos de *T. cruzi* estão ausentes ou escassos, sugerindo que essa citocina está relacionada ao controle da infecção (Reis *et al.*, 1997). Esta produção pode resultar na intensa estimulação dos macrófagos, levando à produção de IL-12 e interleucina 18 (IL-18) (Frosch *et al.*, 1996; Camargo *et al.*, 1997). Reed e colaboradores observaram que a administração de IL-2 restaura a resposta imune na infecção experimental pelo *T. cruzi* (Reed *et al.*, 1984). Análises por imunistoquímica, de citocinas presentes no miocárdio de pacientes chagásicos crônicos, revelaram uma resposta celular T auxiliar “*helper*” altamente diminuída, com poucos linfócitos produzindo interleucina 4 (IL-4). O número de células IL-4⁺ aumentou em casos onde os pseudocistos de amastigotas de *T. cruzi* eram encontrados em abundância, sugerindo que essa citocina está envolvida com a disseminação do parasito (Reis *et al.*, 1997). Adicionalmente, os antígenos imunodominantes da superfamília de transialidase do *T. cruzi* induzem respostas do tipo Th1, em seres humanos e ratos (Millar & Kahn, 2000). Assim, a persistência do parasito poderia sustentar a liberação de antígenos próprios, a presença de pequenos focos inflamatórios no coração e a produção de citocinas inflamatórias, que podem potencializar uma resposta auto-reativa. A possibilidade de re-infecção com o *T. cruzi*, em indivíduos que vivem em áreas endêmicas, pode também influenciar no desenvolvimento de auto-reatividade, enquanto as cargas novas de parasitos podem induzir a liberação dos auto-antígenos e de mediadores solúveis. De fato, foi relatado que a frequência dos indivíduos infectados, que desenvolvem cardiomiopatia chagásica crônica, diminuiu nas áreas onde a transmissão do parasito foi controlada (Coura *et al.*, 1997).

1.1.6 Matriz extracelular e matriproteínas na cardiopatia chagásica.

A infecção pelo *T. cruzi* pode resultar em uma importante miocardite aguda e, posteriormente, em uma progressiva cardiomiopatia crônica, caracterizada por uma resposta inflamatória acentuada e severa fibrose do miocárdio, substituindo o tecido danificado (Elizari, 1999; Higuchi, 1999). Diversos estudos evidenciaram que o *T. cruzi* interage com os componentes da matriz extracelular (MEC) do hospedeiro, produzindo produtos de clivagem que, por sua vez, possuem um papel importante na mobilização do parasito e na sua infectividade. Esses antígenos liberados pelo parasito podem ocasionar o remodelamento da MEC, acarretando numa visível dilatação estrutural e modulação funcional, resultando em hipertrofia e insuficiência cardíaca (Rossi, 1998; Rossi, 2001). A infecção e as respostas inflamatórias geradas contra ela levam à migração celular, gerando um processo de adesão célula-célula e célula-MEC específico a esses eventos. As moléculas que estão envolvidas nesse processo são moléculas de MEC e receptores de integrinas, metaloproteases, quimiocinas, selectinas e galectinas, entre outras. As interações do parasito com as células ou a rede de MEC são fundamentais para a entrada do parasito no ambiente celular.

A fibronectina (FN) é uma glicoproteína de MEC, com alto peso molecular, presente na membrana basal, formando uma rica rede de sustentação para os tecidos (Hynes & Yamada, 1982). Participa de inúmeras interações entre a superfície celular e o microambiente extracelular (Yamada, 1983). Estudos evidenciaram que essa glicoproteína de MEC promove a adesão e internalização de tripomastigotas por macrófagos e fibroblastos (Wirth & Kierszenbaum, 1984) e amastigotas por macrófagos humanos ou murinos (Noisin & Villalta, 1989). Ouassi e colaboradores demonstraram que tripomastigotas de *T. cruzi* reconhecem e se ligam especificamente à seqüência de aminoácido RGDS (arginina – glicina – ácido aspártico – serina) da FN, que inibe a infecção de células hospedeiras (Ouassi *et al.*, 1986). A expressão de receptores de FN em parasitos está correlacionada com a capacidade do parasito em aderir e invadir a célula hospedeira (Low & Tarleton, 1997). A detecção por imunistoquímica de componentes de MEC, no tecido cardíaco, durante a fase crônica da infecção experimental, revelou uma expressão aumentada de FN, juntamente com o aparecimento de infiltrados inflamatórios, sugerindo um papel para a FN na migração de células inflamatórias, durante processos infecciosos (Andrade *et al.*, 1989; Marino *et al.*, 2003). Dados recentes demonstraram a super-expressão de transcritos de proteínas

de MEC (incluindo diversos tipos de colágeno e FN), durante os estágios iniciais e tardios da infecção por *T. cruzi* (Garg *et al.*, 2003).

Laminina (LN), um dos principais elementos estruturais de todas as membranas basais, incluindo as do coração e de músculo esquelético (Ehrig *et al.*, 1990), apresenta diversas atividades biológicas. Diversos estudos detectaram aumento nos depósitos de LN junto às fibras do miocárdio, no tecido cardíaco, proveniente de modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi* (Milei *et al.*, 1993; Andrade *et al.*, 1989; Sanchez *et al.*, 1993). Silva-Barbosa e colaboradores demonstraram que a injeção de anticorpos anti-LN ou anti- $\alpha 6\beta 1$, em transplantes singenéticos, bloqueiam a migração de células T CD4⁺ para os transplantes, inibindo o processo inflamatório, e por conseguinte, a rejeição do coração transplantado (Silva-Barbosa *et al.*, 1997). Além disso, um novo membro da família de glicoproteínas de *T. cruzi*, de 80-85 KiloDalton (kDa), foi demonstrado como ligante para LN (Giordano *et al.*, 1999). Ulrich e colaboradores desenvolveram aptâmeros de ácido ribonucléico (RNA) capazes de competir com a MEC do hospedeiro pelo sítio de ligação ao *T. cruzi*. Esses dados demonstram a inibição da invasão de células hospedeiras pelo parasito (Ulrich *et al.*, 2001; Ulrich *et al.*, 2002).

Uma das principais características da miocardite chagásica é o acúmulo denso de colágeno, em torno de cada fibra ou grupo de fibras (Higuchi, 1999). O colágeno é uma proteína estrutural que possui um papel importante na substituição de miócitos necróticos. No entanto, essa fibrose diminui a maleabilidade tecidual, prejudicando o funcionamento do órgão (Weber *et al.*, 1993). Análises bioquímicas revelaram que os colágenos I, III e IV são os principais colágenos fibrilares encontrados em tecidos cardíacos normais ou de pacientes chagásicos (Bishop *et al.*, 1990; Chapman *et al.*, 1990). Andrade e colaboradores (1989) demonstraram aumento na expressão de colágeno III e IV no coração de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, aumento esse, que está associado com a progressão da inflamação (Andrade *et al.*, 1989). No mesmo ano, Savino e colaboradores observaram um intenso aumento da expressão de colágeno tipo IV, no córtex e na medula de timos atroficos de camundongos infectados pelo *T. cruzi* (Savino *et al.*, 1989). Marino e colaboradores observaram aumento da expressão de colágeno tipo IV em outros órgãos linfóides, como o baço e linfonodos, e em tecidos não-linfóides, como músculo esquelético de camundongos C3H/He

infectados com a cepa Colombiana de *T. cruzi* (Marino *et al.*, 2003). Esses dados indicam que a expressão anormal de componentes de MEC, durante a infecção pelo *T. cruzi*, não se restringe ao coração. Moléculas de *T. cruzi* foram descritas como tendo um papel crucial em facilitar a mobilização de parasitos, através de moléculas de MEC. Dentre essas proteínas de *T. cruzi*, ligantes de MEC, está a cruzipaína, com atividade enzimática, capaz de degradar colágeno tipo I e FN (Santana *et al.*, 1997; Scharfstein & Morrot, 1999).

1.1.6.1 Matriproteínas – Galectinas.

A superfície celular e as moléculas de MEC estão cobertas por glicoconjugados que podem interagir com diferentes proteínas, proporcionando, de forma direta ou indireta, a interação entre células e MEC. Proteínas capazes de reconhecer os carboidratos presentes em diversos glicoconjugados apresentam-se como interessantes moléculas de estudo. Lectinas são proteínas capazes de reconhecerem glicoconjugados presentes nas células ou em MEC (Brewer, 2002; Sacchetti *et al.*, 2001). Atualmente, foi proposta a utilização do termo matriproteínas, para algumas das famílias de lectinas, que compõem essa superfamília (Bornstein & Sage, 2002; Murphy-Ullrich, 2001; Elola *et al.*, 2007). Entre elas estão as galectinas, que são lectinas animais que reconhecem açúcares β -galactosídeos e desempenham diversas funções no organismo, como modular a adesão celular a MEC (Brewer, 2002; Cooper, 2002; Liu & Rabinovich, 2005; Vasta *et al.*, 2004; Toscano *et al.*, 2007). A família de galectinas é composta por 15 galectinas, altamente conservadas em todo o reino animal e são encontradas em todos os tecidos, desempenhando inúmeras funções biológicas, como o controle da morte e vida celular (Liu *et al.*, 2002; Leffer, 2001; Gabius *et al.*, 2002). Galectina-3 (Gal-3) é uma das galectinas mais bem estudadas, sendo encontrada em solução como um monômero com dois domínios funcionais, peso molecular entre 29 e 35 kDa, dependendo da espécie (Dumic *et al.*, 2006). Seus domínios consistem de uma porção N-terminal, ligado por um pequeno domínio rico em prolina (Pro), tirosina (Tyr) e glicina (Gly) ao domínio C-terminal, onde está localizado o domínio de reconhecimento a carboidrato (CRD) (Barondes *et al.*, 1994). A porção N-terminal de gal-3 pode se

auto-associar, formando uma ponte entre seus ligantes e mediar a ligação cruzada de contrarreceptores (Kuwabara & Liu, 1996; Perillo, *et al.*, 1998).

Gal-3 é abundante não somente no citoplasma, mas também extracelularmente, sendo externalizada por mecanismos secretórios não clássicos (Lukyanov *et al.*, 2005; Menon & Hughes, 1999; Nickel, 2005; Hughes, 1999). Essa lectina animal é abundante em macrófagos ativados, monócitos, células epiteliais, fibroblastos, podendo ser também encontrada em outros tipos celulares (Hughes, 1997; Hughes, 1999).

Por reconhecer lactosaminas presentes na estrutura de MEC, gal-3 interage com proteínas de MEC, como LN e elastina (Liu, 2000), modulando a adesão celular (Sato & Hughes, 1992). A estrutura de gal-3 permite a regulação de sua atividade adesiva, via mecanismos que são carboidrato-dependente. O domínio N-terminal de gal-3 é capaz de formar auto-associações e pode servir como uma ponte, podendo tanto inibir quanto induzir a adesão de célula à matriz (Kuwabara & Liu, 1996). Além disso, dados recentes demonstram que a porção N-terminal participa do reconhecimento dos açúcares pelo CRD, já que a clivagem desse domínio leva à perda da atividade lectínica (Kuwabara & Liu, 1996; Hsu *et al.*, 1992; Massa *et al.*, 1993; Nieminen *et al.*, 2007). Ensaios, *in vitro*, demonstraram que gal-3 é capaz de induzir a adesão de neutrófilos à LN, podendo possuir um papel importante no aporte de neutrófilos para os sítios inflamatórios (Kuwabara & Liu, 1996). Em melanomas, gal-3 inibe a adesão à MEC e o papel de-adesivo de gal-3 pode estar relacionado com o potencial evasivo (Ochieng *et al.*, 1998). Gal-3 é capaz de induzir ou inibir a adesão célula-célula. Em DC, gal-3 induz a adesão a linfócitos ativados por L-selectina, facilitando a apresentação antigênica, podendo possuir um importante papel na resposta imunitária adquirida (Swarte *et al.*, 1998), enquanto, no timo, inibe a adesão de timócitos a células epiteliais tímicas (TEC) (Villa-Verde *et al.*, 2002). Mecanismos bioquímicos podem modular a atividade adesiva de gal-3, como a fosforilação de gal-3, que inibe sua ligação à MEC (Rabinovich *et al.*, 2002). A porção N-terminal de gal-3 é necessária para auto-associações, e é sensível à degradação por metaloproteases 2 e 9. A expressão dessas enzimas pode levar a uma diminuição no número de moléculas associadas à MEC e facilitar a invasão de células tumorais (Perillo *et al.*, 1998).

Por interagir com glicoproteínas de superfície presentes em neutrófilos, gal-3 os leva à ativação, induz aumento na produção de superóxidos, de maneira dose-

dependente, sendo esse efeito inibido por lactose (Yamaoka *et al.*, 1995). Além disso, gal-3 é capaz de potencializar a produção de interleucina 1 (IL-1) induzida por lipopolissacarídeo (LPS) *in vitro* e de promover a quimiotaxia de monócitos (Jeng *et al.*, 1994; Sano *et al.*, 2000).

Os níveis de gal-3 estão elevados em células neoplásicas de muitos tumores, tais como os de tireóide e hipófise. Nesse sentido, altas concentrações de gal-3 em tumores, poderiam estar relacionadas à ocorrência de metástases (Raz *et al.*, 1990). Os efeitos de gal-3 no crescimento, adesão e sobrevivência celular, podem se relacionar diretamente ao crescimento e tumorigenicidade das células transformadas. É possível que essa molécula facilite a geração de metástases por alterar interações adesivas normais entre células tumorais e MEC. Há autores que correlacionam o aumento significativo de gal-3 no soro de paciente oncológico, com a presença de metástases (Iurisci *et al.*, 2000).

Recentemente, foi proposto que gal-3 aumenta a capacidade de interação do *T. cruzi* com LN, em um monômero carboidrato-dependente (Moody *et al.*, 2000). Além disso, a infecção de células do músculo liso, da artéria coronária pelo *T. cruzi*, parece ser dependente de gal-3 (Kleshchenko *et al.*, 2004). O bloqueio da expressão de gal-3 induz aumento no número de plasmócitos, com melhor eliminação do parasito e diminuição na geração de células B de memória, induzidas por IL-4 (Acosta-Rodríguez *et al.*, 2004). DCs infectadas pelo *T. cruzi* apresentam aumento na expressão de gal-3 e seus ligantes, mas diminuem a sua capacidade de aderir a glicoproteínas de MEC (Vray *et al.*, 2004). Recentemente, Silva-Monteiro e colaboradores demonstraram aumento na expressão de gal-3, em timo de animais infectados pelo *T. cruzi* (Silva-Montiro *et al.*, 2007). Gal-3 é capaz de induzir morte em timócitos e modular a migração de timócitos duplo-positivos (DP) imaturos (CD4⁺CD8⁺). Animais deficientes de gal-3 não desenvolvem atrofia tímica, observada durante a fase aguda da infecção experimental. Timócitos DP, CD4⁺ CD8⁺ de animais deficientes de gal-3, não sofrem morte maciça, além de não serem exportados para a periferia, como visto nos animais selvagens infectados (Silva-Montiro *et al.*, 2007).

1.2. Cininas.

1.2.1 Introdução.

Diversos trabalhos estudam moléculas capazes de modular positiva ou negativamente o sistema imunitário inato e adquirido, numa tentativa de entender a patologia causada pelo *T. cruzi*. Nesse contexto, um grupo de moléculas vasoativas, designadas coletivamente por cininas, tornou-se alvo de inúmeros estudos, devido à sua sutil relação com o *T. cruzi*.

Cinina é a designação geral para um grupo de deca/octapeptídeos vasoativos que incluem as bradicininas (BK), lisil-bradicininas (Lys-BK/ calidina) e seus metabólitos (Bhoola *et al.*, 1992). A ativação da via das cininas se inicia com a clivagem da pré-caliceína pelo fator de Hageman (fator XIIa) da cascata de coagulação (Bhoola *et al.*, 1992). Após clivar a pré-caliceína, o fator de Hageman, libera a forma ativa dessa molécula, a caliceína. As caliceínas podem ser encontradas em células glandulares, neutrófilos e fluidos biológicos e, estão divididas em dois grupos distintos: tecidual e plasmática (Fiedler, 1979; Movat, 1979), que diferem no seu peso molecular, ponto isoelétrico (pI), especificidade do substrato, características imunológicas, tipo de cinina liberada e importância funcional (Bhoola *et al.*, 1992). A caliceína tecidual é codificada por diversos genes de uma mesma família, expressa em uma variedade de tipos celulares (Clemens, 1994; Clemens, 1997), enquanto a caliceína plasmática é codificada por um único gene e expressa no fígado (Clemens, 1994).

Devido a sua capacidade proteolítica, caliceínas são capazes de liberar cininas de seu substrato endógeno, cininogênio (Müller-Esterl, 1989). Cininogênios são coletivamente designados como proteínas multifuncionais, envolvidas em reações de cascata, durante a coagulação e inflamação. Podem atuar como inibidores enzimáticos e, assim, proteger as células, de danos causados pelas cisteíno-proteases (Müller-Esterl, 1989). No homem, o cininogênio, presente somente no sangue pode ser classificado como cininogênio de alto peso molecular (HK) (626 resíduos). O cininogênio de baixo peso molecular (LK) (409 resíduos) está presente no sangue e em tecidos (Müller-Esterl *et al.*, 1986). Os cininogênios são transcritos de um único gene,

localizado no cromossomo 3 (Fong *et al.*, 1991). Editorações (*Splicing*) alternativas do pré-RNA_m produzem dois RNA_m, de tamanhos (3.5 e 1.7 Kilobases - kb) e funções diferentes (Colman & Schmaier, 1997; Schmaier *et al.*, 1999). De um modo geral, a clivagem do LK, pela calicreína tecidual, forma a proteína vasoativa calidina ou lisil-bradicinina (Lys-BK), enquanto que a calicreína plasmática cliva o HK, formando a BK.

Tradicionalmente descritas como moduladoras da inflamação aguda e dor, as cininas são moduladoras gerais da homeostase vascular, aumentando a permeabilidade vascular e atuando como hipotensoras (Shigematsu *et al.*, 2001; Schmaier, 2004). Além disso, são autacóides potentes na produção da dor, atuam na contração da musculatura lisa da árvore bronco-pulmonar, intestino e útero e aumentam a motilidade de espermatozóides (Bhoola *et al.*, 1992). No endotélio, promovem a liberação de NO, prostaciclina e fator de hiperpolarização derivado do endotélio (Regoli & Barabé, 1980; Toda *et al.*, 1987; Schini *et al.*, 1990; Mombouli & Vanhoutte, 1995). Na circulação periférica, as cininas podem induzir vasodilatação e aumento na circulação do sangue, pela redução do tônus da musculatura lisa arterial; extravasamento plasmático, pela contração do endotélio capilar (Regoli & Barabé, 1980) e vasoconstrição pela estimulação da musculatura lisa, em vasos venosos (Gaudreau *et al.*, 1981).

Em modelos de estados inflamatórios (Dray & Perkins, 1993), asma (Barnes, 1992), alergia (Polosa, 1993) e após trauma e lesões (Rodell, 1996), as cininas promovem a migração de células do sangue para o tecido e ativam diversos componentes teciduais, como mastócitos, fibroblastos, macrófagos, células do sistema imunitário (Bhoola *et al.*, 1992), musculatura lisa de quase todos os órgãos, os sistemas nervosos autônomos simpático (Tousignant *et al.*, 1987) e parasimpático (Lopes & Couture, 1992) e os nervos sensoriais (Steranka *et al.*, 1988; Geppetti, 1993). Esses inúmeros efeitos ocorrem pela ativação de receptores específicos.

1.2.2 Receptores.

As cininas possuem a capacidade de se ligar a dois receptores distintos: o receptor de bradicinina 1 (B₁R) e o receptor de bradicinina 2 (B₂R). O B₁R é pouco presente ou ausente em tecidos normais, tendo sua expressão regulada positivamente

quando ocorre dano tecidual por trauma ou inflamação ou pela liberação de interleucina 1 beta (IL-1 β) (Marceau, 1993; Marceau *et al.*, 1998). O B₂R é constitutivo, sendo expresso em neurônios, células endoteliais, células do músculo liso e DC imaturas (Aliberti *et al.*, 2003). O B₂R possui uma maior afinidade por cininas “nativas”, geradas de calicreínas teciduais ou plasmáticas (BK e Lys-BK). Já o B₁R reconhece, com alta afinidade, des-Arg⁹-calidina e des-Arg⁹-BK, sendo estas geradas a partir das cininas “nativas” pela remoção da arginina (Arg) C-terminal (Bhoola *et al.*, 1992). O B₂R sofre uma eficiente dessensibilização, parando a resposta biológica rapidamente. Já o B₁R não é dessensibilizado tão rapidamente, gerando respostas mais duradoras (Austin *et al.*, 1997; Levesque *et al.*, 1995).

Os receptores B₁ e B₂ são proteínas de sete domínios, transmembranares e funcionam ligados à proteína específica G α_{q11} , levando à geração de mensageiros secundários pela fosfolipase C β como inositol-1,4,5-trifosfato (IP₃), diacilglicerol (DAG) e cálcio (Scharfstein, 2006). O aumento de cálcio em células vasculares, pode ativar a via do NO/guanosina monofosfato cíclico (cGMP) que induz a vasodilatação (Higashida *et al.*, 1986). Em algumas células, a estimulação dos receptores de cininas pode induzir a produção de prostaglandinas, pela ativação da fosfolipase A₂ e D, resultando na liberação de ácido araquidônico (Burch & Axelrod, 1987). O receptor B₂ pode modular os níveis intracelulares de adenosina monofosfato cíclico (cAMP) e proteína quinase A (PKA), ao se ligar à proteína G estimuladora ou inibidora (G_s ou G_i). Essa interação do receptor B₂ com a proteína G ativa pequenas proteínas, como G Rho, Rac e/ou Cdc42 pela interação com a proteína G $\alpha_{12/13}$. Esse mecanismo leva a mudanças na reorganização do citoesqueleto e, conseqüentemente, modula a forma e a motilidade celular (Blaukat *et al.*, 2000). A sinalização gerada pela interação de cininas e seus receptores pode ativar a cascata quinase regulada por sinal extracelular (ERK)/proteína quinase ativada por mitógeno (MAPK) via G_i (Blaukat *et al.*, 2000).

As altas concentrações de bradicinina são pró-inflamatórias, induzindo maior adesão de leucócitos pela formação do fator formador de plaquetas (Shigematsu *et al.*, 2002). Por outro lado, baixas doses de bradicinina levam a produção de NO, via B₂R, prevenindo a emigração e adesão de leucócitos, além de atenuar a interrupção da barreira microvascular (Shigematsu *et al.*, 1999). Ambas as funções, dependentes da

concentração de bradicinina, indicam que essas proteínas desenvolvem um duplo papel na inflamação.

O B₂R, quando ativados por agonistas, sofre dessensibilização e é internalizado (Austin *et al.*, 1997), promovendo a rápida reversibilidade do efeito biológico *in vitro*. Entretanto, B₁R, não é dessensibilizado nem internalizado, mantendo a resposta biológica por mais tempo (Austin *et al.*, 1997; Levesque *et al.*, 1995). Essa diferença na biologia dos dois receptores, pode ser explicada pela presença de uma alça “loop” C-terminal, contendo resíduos de Serina (Ser) e Tyr, que são sítios de fosforilação, presentes apenas no B₂R (Hausdorff *et al.*, 1989; Lohse, 1993; Ferguson *et al.*, 1996).

1.2.3 Biologia do Sistema de Cininas.

Depois de produzidas, as cininas são rapidamente inativadas por metalopeptidases, denominadas cininases, encontradas no tecido e no plasma. As cininases, por sua vez, também são divididas em dois grupos: as cininases I (KI) e as cininases II (KII) (Erdös, 1990). Na família KI estão as carboxipeptidase N (CPN) de origem plasmática e carboxipeptidase M (CPM) presente na membrana celular. As cininases da família KI inativam cininas através da remoção do resíduo de aminoácido Arg⁹ formando os metabólitos des-Arg⁹-BK e Lys-des-Arg⁹-BK que são reconhecidos pelo B₁R (Bhoola *et al.*, 1992). Na família KII estão a enzima conversora de angiotensina (ECA) e a endopeptidase neutra (NEP). A ação da família KII, sobre cininas, consiste na liberação do dipeptídeo Fenilalanina⁸ (Phe⁸) -Arg⁹. A cininase KII-ECA, além de liberar o dipeptídeo Phe⁸-Arg⁹ é capaz de degradar o domínio C-terminal pela clivagem do dipeptídeo Ser⁶-Pro⁷ (Bhoola *et al.*, 1992).

Atualmente, inibidores e antagonistas seletivos capazes de bloquear ou modificar o sistema de cininas, em pontos específicos, são utilizados com o objetivo de compreender melhor essa via. Captopril (CAP) é capaz de inibir a ação da ECA, ao se ligar ao sítio de ligação a peptídeos da ECA, inibindo a produção catalítica de angiotensina II. A inibição da ECA promove aumento nos níveis de bradicinina. Captopril reduz a pressão arterial sistêmica e a resistência vascular periférica, aumentando o rendimento cardíaco, através da modulação nas vias de angiotensina II e BK. Além do potencial anti-hipertensivo, captopril apresenta-se como uma molécula

anti-inflamatória, por modular angiotensina II e, subseqüentemente, BK (Godsel *et al.*, 2003).

Outro composto, amplamente utilizado é o antagonista B₂R seletivo, conhecido como Icatibant (HOE-140). Este é um potente e seletivo antagonista, pertencente à segunda geração de antagonistas de B₂R. Apresenta alta afinidade para tecidos humanos, de coelhos, porquinhos da índia e camundongos (Regoli *et al.*, 1998). Possui uma ação duradoura (>60 min), devido a sua estrutura que impede a degradação enzimática e sua prolongada interação com o receptor B₂ (Hock *et al.*, 1991; Wirth *et al.*, 1991; Lembeck *et al.*, 1991; Gobeil *et al.*, 1996). HOE-140 é considerado um antagonista “*non-equilibrium*”, porque interage com os mesmos sítios, no receptor, que BK. Porém, se dissocia lentamente e previne a ocupação completa do receptor, pelo seu agonista. HOE-140 é um peptídeo sintético derivado da seqüência de BK relativamente grande e, por isso, não possui todas as propriedades farmacocinéticas favoráveis, que são requisitos para a aplicação terapêutica em humanos (Regoli *et al.*, 1998).

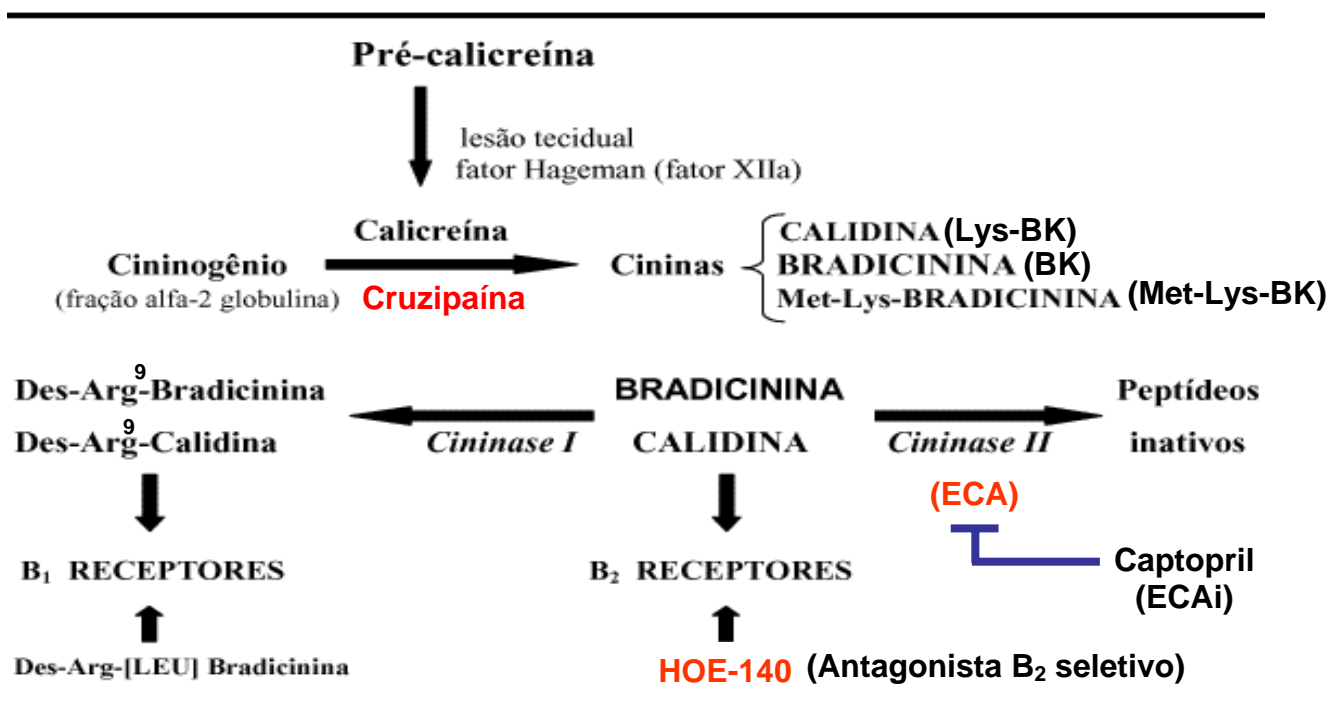


Figura 1.2: Esquema representativo do sistema endógeno de cininas. Modificado a partir de Ramalho 2000.

1.2.4 Função.

Além de induzir a formação de edema, promover vasodilatação e sensações de dor, as cininas são capazes de ativar o endotélio e induzir a expressão de moléculas de adesão. BK é quimioatraente para neutrófilos, eosinófilos, monócitos e macrófagos alveolares (Shigematsu *et al.*, 2002). Shigematsu e colaboradores demonstraram que na presença de BK ocorre maior aderência, rolamento e emigração de leucócitos, além de maior extravasamento de proteínas. Os efeitos de BK foram completamente inibidos pela co-administração de HOE-140, inibidor seletivo do receptor B₂, demonstrando que o efeito observado é mediado através deste receptor (Shigematsu *et al.*, 2002). Ahluwalia e colaboradores demonstraram que a migração de neutrófilos induzida por IL-1 β ocorre através do receptor B₁ (Ahluwalia & Perretti, 1996), e que essas células possuem sítios de ligação para HK (Gustafson *et al.*, 1989). Além disso, injeção de bradicinina induz um aumento dose-dependente de eosinófilos na cavidade pleural de camundongos 24 horas após o estímulo (Pasquale *et al.*, 1991). Em linhagens celulares murinas de macrófagos, BK e seu metabólito des-Arg⁹-BK induzem a liberação de TNF e IL-1 (Tiffany & Burch, 1989). Ambas as moléculas também estimulam a secreção de citocinas, como IL-1, -2, interleucina 3 (IL-3) e interleucina 6 (IL-6), por células esplênicas (Paegelow *et al.*, 1995).

1.2.5 Cininas e *Trypanosoma cruzi*.

No contexto da infecção experimental, foi demonstrado que a principal cisteíno-protease do *T. cruzi*, denominada cruzipaina, é capaz de ativar o sistema de cininas, pela clivagem do cininogênio (Del Nery *et al.*, 1997). A cruzipaina é codificada por aproximadamente 130 genes relacionados intimamente e, sintetizada como uma pré-proteína, que sofre processamento por mecanismos auto-catalíticos (Campetella *et al.*, 1990; Eakin *et al.*, 1992). A forma madura possui 57 kDa e tem atividade enzimática, exercida por seus domínios catalíticos tipo-papaína “*papain-like*” que atuam em uma ampla faixa de potencial hidrogeniônico (pH) e possuem grande estabilidade (Murta *et al.*, 1990). A cruzipaina é homóloga a outras proteases, membros da superfamília das papaínas, com exceção da sua extensão no domínio C-terminal, encontrado apenas em

tripanossomatídeos (Aslund *et al.*, 1991). Essa proteína é expressa em todos os estágios de vida do parasito e em todas as cepas, variando apenas seu grau de expressão. A expressão da cruzipaina é, notavelmente, maior em formas replicativas intracelulares do *T. cruzi* (Bonaldo *et al.*, 1991; Campetella *et al.*, 1992).

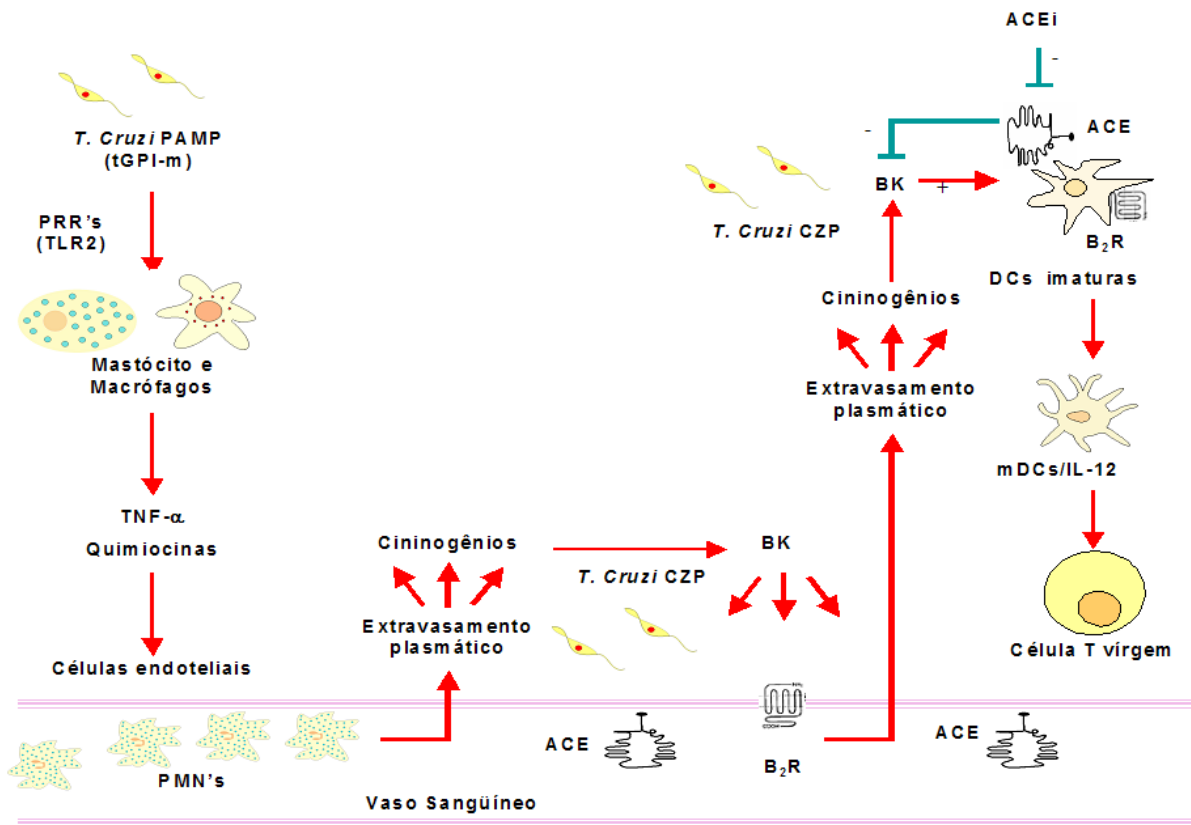
Essa enzima apresenta similaridades com a calicreína tecidual humana (Chagas *et al.*, 1995; Del Nery *et al.*, 1995), liberando cininas bioativas a partir do cininogênio humano. O cininogênio é um membro da superfamília das cistatinas, que são inibidores de cistenil-proteases (Barret, *et al.*, 1986) de maneira que os cininogênios deveriam ser capazes de inativar a cruzipaina (Scharfstein *et al.*, 1995; Stoka *et al.*, 1995). Porém, foi demonstrado por espectrometria de massa, que cruzipaina é capaz de clivar o cininogênio humano, liberando Lys-BK (calidina) (Del Nery *et al.*, 1997).

Em 2000, Scharfstein e colaboradores demonstraram que a invasão de células hospedeiras, expressando B₂R é drasticamente aumentada devido à sinalização por peptídeos de cininas. Além disso, o tropismo do parasito por órgãos específicos pode ser influenciado pela maior ou menor presença de cininases, como a ECA no tecido (Scharfstein *et al.*, 2000). Arnholdt e colaboradores demonstraram, em 1993, que linhagens de células T geradas de indivíduos infectados pelo *T. cruzi* proliferam e produzem IFN- γ , mas não IL-4, após estimulação *in vitro* com cruzipaina. Esses dados indicam que cruzipaina induz uma resposta imunitária, em humanos, do tipo Th1 (Arnholdt *et al.*, 1993).

Em 2002, Lima e colaboradores observaram que heparan sulfato potencializa a liberação de cininas por tripomastigotas de *T. cruzi*, pois aumenta a atividade catalítica da cruzipaina em liberar cininas (Lima *et al.*, 2002). Aliberti e colaboradores, em 2003, observaram que BK exógena induz potentemente a maturação de DC e leva à polarização para Th1, por uma via dependente de interleucina 12 (IL-12). O sinal desencadeado em DC, por cininas, é controlado pela ação da degradação de cininas por peptidases, dessensibilização do receptor B₂R e produção de citocinas anti-inflamatórias, como IL-10 (Aliberti *et al.*, 2003). A interação da cruzipaina com a α 2-macroglobulina (α 2M), formando o complexo α 2M/Cruzipaina e, seu direcionamento para o receptor multifuncional *scavenger* CD91, promove a rápida internalização do complexo, por células apresentadoras de antígeno (APC), via endocitose dependente de CD91, otimizando a apresentação do peptídeo de cruzipaina e, contribuindo para a

geração de clones de CD8 específicos para cruzipaina, identificados em pacientes chagásicos (Fonseca *et al.*, 2005).

Em 2006, o grupo chefiado por Julio Scharfstein, propôs um modelo de infecção subcutânea baseado no estímulo ou bloqueio do sistema de cininas, em dose única. Neste modelo o reconhecimento de padrões moleculares associados à patógeno (PAMP's), pelos receptores "toll-like" do tipo 2 (TLR2), presentes na superfície de macrófagos ou mastócitos induzem a ativação dessas células e secreção de mediadores inflamatórios, como TNF- α e quimiocinas. Após o extravasamento do plasma, o cininogênio se acumula rapidamente no endotélio, onde ocorre a adesão de células polimorfonucleares (PMN's) circulantes. Por sua vez, a cruzipaina do parasito, cliva o cininogênio acumulado, liberando cininas, que ativam B₂R nas células endoteliais, levando a um maior extravasamento de plasma. Conforme a inflamação progride, o nível endógeno de cininas também aumenta, devido ao processamento do cininogênio, pela cruzipaina. Atuando como sinais de perigo, as cininas induzem a maturação de DC CD11c⁺ pela interação como B₂R, expresso por DC, e estimulam a produção de IL-12, montando uma resposta adquirida do tipo Th1. Por outro lado, os efeitos inatos das cininas são balanceados pela ação de degradação da ECA, presente no endotélio e em DC (Monteiro *et al.*, 2006).



Monteiro et al, 2006

Figura 1.3: Modelo esquemático ilustrando a dinâmica da inflamação induzida pelo *T. cruzi*. Esquema ilustrando o reconhecimento de PAMPs de *T. cruzi*, como mucinas ligadas a âncoras de glicosilfosfatidilinositol (GPI), por TLR2 desencadeando a ativação do sistema de cininas e resultando na indução da resposta imune adaptativa. Figura obtida de Monteiro e colaboradores, 2006.

Em 2007, Scharfstein, no mesmo modelo de dose única, propôs que DC ativadas via B₂R produzem IL-12 e expressam complexos peptídeo-MHC, na superfície celular, assim como moléculas co-estimulatórias apropriadas. Essas células migram pelos vasos linfáticos até as zonas T dos linfonodos, onde promovem ativação e diferenciação de células T CD4⁺ e linfócitos T CD8⁺, em células efetoras antígeno-específicas. Os linfócitos T efetores CD4⁺, Th1 e CD8⁺ produzem fator de necrose tumoral-gama (TNF-γ) e outras citocinas pró-inflamatórias, saem do linfonodo ganhando a circulação e alcançam os tecidos periféricos parasitados, como o coração, auxiliando na contenção do parasito (Scharfstein *et al.*, 2007).

2. RACIONAL:

A doença da Chagas, nas suas formas aguda e crônica, apresenta importantes modificações histopatológicas no tecido cardíaco. Essas alterações vão desde a inflamação do órgão, com a presença de diversas células inflamatórias e edema até a destruição tecidual. Além disso, a cruzipaina, principal cisteíno-protease de *T. cruzi* é capaz de ativar a via de cininas, favorecendo a invasão celular pelos tripomastigotas e, agindo como uma importante molécula moduladora da interação parasito-hospedeiro, tanto na vertente relacionada à infectividade do parasita, quanto na modulação da resposta inflamatória. Diversos autores descrevem o importante papel da via de cininas, na inicialização da resposta inflamatória. Ainda, Scharfstein e colaboradores demonstraram que a via de cininas pode modular diversas respostas imunitárias, observadas na infecção experimental pelo *T. cruzi*. Baseado nessas observações que comprovam a íntima relação entre o *T. cruzi* e o sistema de cininas, nós decidimos estudar o papel dessa via, na formação da patogenia cardíaca proveniente da infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*.

3. OBJETIVOS:

3.1 Objetivo Geral.

Cininas são proteínas pró-inflamatórias capazes de modular a migração celular e produção de citocinas. No contexto da infecção experimental pelo *T. cruzi*, apresentam importante papel na geração das respostas imunitárias adquiridas. Assim, nosso trabalho visa estudar a participação do sistema de cininas, na indução da miocardite murina, decorrente de infecção aguda por *Trypanosoma cruzi*.

3.2 Metas Específicas.

- Analisar a curva de parasitemia dos animais infectados com *T. cruzi* e infectados e tratados com captopril, HOE-140 e captopril + HOE-140.
- Quantificar a celularidade do timo e linfonodos subcutâneos dos animais submetidos ou não à infecção e aos diferentes tratamentos.
- Descrever as alterações histopatológicas dos corações dos diferentes grupos experimentais.
- Avaliar a presença e a distribuição de moléculas de matriz extracelular e de galectina-3, em todos os grupos.

4. MATERIAIS E MÉTODO:

4.1 Animais e Infecção.

Foram utilizados camundongos C57BL/6 machos com 4-5 semanas de vida. Os animais foram fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório – CECAL-FIOCRUZ/RJ. Os animais foram infectados subcutaneamente (coxim plantar), com 10^6 parasitos, diluídos em salina-fosfato tamponada (PBS), por animal, em um volume de 10 μ l, inoculados em uma única pata.

Os tripomastigotas, cepa Dm28c, da espécie *Trypanosoma cruzi*, foram obtidos de cultura de células VERO LLC-MK2 (Tripomastigotas de cultura - TCT), cultivados em Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM) (SIGMA, St Louis, EUA), suplementadas com 2% de soro bovino fetal – (SBF) (Hyclone, Utah, EUA) a 37°C em ambiente atmosférico de dióxido de carbono (CO₂) 5%. Os parasitos, recém liberados, foram lavados três vezes com PBS, antes de serem utilizados nas infecções experimentais.

4.2 Tratamento.

Os animais foram tratados, uma hora antes da infecção, com uma única dose intraperitoneal de 10 mg/Kg de captopril (SIGMA, St Louis, EUA) e/ou uma única dose subcutânea de 100 μ g/Kg de HOE-140 (Aventis Pharmaceuticals, Bridgewater, EUA). Foram gerados os seguintes grupos experimentais, especificados abaixo:

	CONTROLE	INFECTADO (10 ⁶ TcT/animal)	CAPTOPRIL (10mg/Kg)	HOE-140 (100 µg/Kg)
GRUPO 1	X	--	--	--
GRUPO 2	--	X	--	--
GRUPO 3	--	X	X	--
GRUPO 4	--	X	--	X
GRUPO 5	--	X	X	X

Tabela 4.1: Relação dos grupos experimentais gerados após os tratamentos e a infecção.

4.3 Parasitemia.

Para a avaliação da parasitemia nos diversos grupos de infecção experimental utilizados, 5µL de sangue foram colhidos da cauda dos animais, nos dias 4, 7, 11 e 18 pós-infecção. Para a obtenção do número total de parasitos, 100 campos foram contados em microscópio óptico (Axioskop – Zeiss, Oberkochen, Alemanha). Os valores obtidos com a contagem foram transferidos para uma fórmula de conversão, onde foram obtidos os valores totais de parasitos por animal.

Fórmula de Conversão: **Número de parasitos (100 campos) x 26.912.**

4.4 Obtenção dos tecidos e células.

Os órgãos foram obtidos durante a fase aguda da infecção, no 30^o dia pós-inoculação. Os camundongos foram eutanasiados utilizando uma mistura de CO₂ e oxigênio (O₂), sendo necropsiados em seguida. Os corações obtidos foram fixados em formalina-Millonig de Carson (Carson *et al.*, 1973) para análises histológicas ou congelados em OCT a -70°C, para procedimentos de imunofluorescência. As células para avaliação da celularidade, dos órgãos linfóides, foram obtidas de timos e linfonodos subcutâneos, axilares e inguinais, por maceração mecânica. Após a maceração, as células obtidas foram ressuspendidas em meio HyQPF- VERO sem soro

(Hyclone, Utah, EUA) e, contadas em câmara de Neubauer. Os dados obtidos com as contagens foram analisados estatisticamente utilizando o software Graphpad Prism 4.0.

4.5 Histopatologia.

Os corações para histologia foram fixados por 72 horas em formalina-Millonig de Carson (Carson *et al.*, 1973), clivados e processados em processador automático de tecidos (Shandon, Citadel 2000, Chicago, EUA). O material foi submetido a banhos de etanol (VETEC, Rio de Janeiro, Brasil), em concentrações crescentes (70%, 80%, 90% e absoluto), xilol (MERCK, Darmstadt, Alemanha) e parafina histológica (Paraplast - MERCK, Darmstadt, Alemanha), no contexto dos processos de desidratação, clarificação e infiltração. Cada banho teve duração de duas horas. Após esses processos, foi feita a inclusão do material em parafina líquida, manualmente. O material parafinado foi seccionado em micrótomo rotativo (Leica RM 2025, Mannheim, Alemanha). Os cortes (5µm) foram depositados em lâminas revestidas com 3-aminopropil-tritoxi-silano de 2 a 4% (silane – SIGMA, St Louis, EUA) e colocados em estufa a 60°C por seis horas para melhor aderência à lâmina. Ao término desse tempo, os cortes foram desparafinados com xilol e hidratados em banhos de etanol em concentrações decrescentes (absoluto, 95% e 70%), seguidos de lavagem em água destilada (duração de três minutos cada etapa). Os cortes assim desparafinados e hidratados foram encaminhados para coloração. Ao término de cada coloração, os preparados histológicos passaram por um novo processo de desidratação em álcool nas mesmas concentrações crescentes, seguido por banhos de xilol e posterior montagem dos preparados histológicos.

4.6 Colorações e Impregnação por prata.

Os preparados histológicos foram corados com hematoxilina-eosina (HE), Tricromática de Masson, Giemsa de Lennert (Merck, Darmstadt, Alemanha), Reticulina de Gomori, Picrosirius (convencional e pré-tratado com ácido fosfomolibdico – PMA-PRS, para confocal) e Resorcina-fucsina (com ou sem pré-oxidação por oxona). À exceção dos cortes corados com PMA-PRS, todos os demais foram analisados em

microscópio óptico de campo claro Axioskop (Zeiss), equipado com câmera mRC5 (Zeiss) para captura de imagens digitais.

4.6.1 Hematoxilina e Eosina (HE).

Após o processo de desparafinização e hidratação, cortes histológicos foram corados por Hematoxilina de Mayer por 20 minutos e em seguida foram lavados em água corrente por 25 minutos. Os preparados histológicos foram colocados em álcool 70% durante três minutos para desidratação, seguido por dois minutos em Eosina-Floxina e rápida lavagem com álcool 95%. Posteriormente, foram desidratados em três banhos de álcool absoluto com duração de três minutos cada e, clarificados em três banhos de xilol por três minutos cada, antes de serem montados com Goma de Damar (Mayer, 1903).

4.6.2 Giemsa de Lennert.

Após o processo de desparafinização e hidratação, cortes foram corados por Giemsa (Merck, Darmstadt, Alemanha) durante uma hora. A solução de Giemsa foi utilizada em uma diluição de 1:4 em água destilada. Após a coloração, foi feita a diferenciação. Para isso, os preparados histológicos foram mergulhados três vezes em Ácido Acético (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 0.5% e em seguida em álcool etílico a 95%, com acompanhamento lâmina a lâmina do processo de diferenciação, em microscópio de campo claro. Após a diferenciação, os preparados histológicos foram desidratados em três banhos de álcool isopropílico (Merck, Darmstadt, Alemanha), com três minutos de duração cada, clarificados e montados (Lennert, 1978).

4.6.3 Tricromática de Masson.

Após o processo de desparafinização e hidratação, cortes foram colocados em fixador de Bouin pré-aquecido a 56°C por uma hora e lavados em água corrente até que a cor amarelada desaparecesse. Em seguida, foram corados com Hematoxilina Férrica de Weigert por dez minutos, lavados novamente em água corrente por dez

minutos e, em água destilada, por um minuto. Os preparados foram então corados em solução de Biebrich Escarlat-Fucsina ácida por cinco minutos e lavados em água destilada durante 20 minutos e, em seguida, colocados em ácido Fosfotúngstico-Fosfomolibdico 5% durante 30 minutos. Após, esse procedimento a solução ácida foi escorrida dos preparados, que foram então incubados com Azul de Anilina por 30 minutos e lavados mais uma vez em água destilada, por cinco minutos. Em seguida foi feito o processo de desidratação a partir de álcool 95% até absoluto (três banhos) com duração de três minutos cada, clarificação e montagem (Lillie & Fullmer, 1976).

4.6.4 Reticulina de Gomori.

Após a desparafinização e hidratação dos cortes, as lâminas foram colocadas em solução de Permanganato de Potássio a 1% por um minuto e lavados em água destilada por dois minutos. Em seguida, foram descorados por ácido Oxálico a 3% por três minutos e lavados em água corrente por três minutos. Posteriormente, foram colocados em solução de Alúmen de Ferro a 2%, por um minuto e lavados em água destilada por dois minutos. Em continuação com o processo de impregnação, os preparados histológicos foram submetidos a uma solução de Nitrato de Prata Amonical, por um minuto e, posteriormente, lavados em água destilada, por cinco minutos. Foi adicionado formol a 10% por três minutos, seguido de lavagem em água corrente, por cinco minutos. Os preparados receberam então uma solução de cloreto de ouro a 1% por três minutos e depois foram lavados em água destilada por dois minutos. Foram, então, colocados em Tiosulfato de Sódio 5% por dois minutos, lavados em água corrente por dois minutos e submetidos a um processo de desidratação, partindo de álcool 70% até o álcool absoluto (três banhos), com duração de três minutos cada e um processo de clarificação em três banhos de xilol por três minutos cada. Ao fim, o material foi montado em Goma de Damar (Gomori, 1936).

4.6.5 Picrosirius convencional (Sírus Red).

Os cortes histológicos foram inicialmente desparafinizados, hidratados e, em seguida, corados pela solução de Picrosírus por uma hora. Foram então lavados

durante dois minutos numa solução de Ácido Clorídrico a 0,01N. Em seguida, foi utilizada a solução de Hematoxilina de Mayer, por dez minutos para contraporar os preparados, seguida de lavagem com água corrente para retirar o excesso de corante. Após esses procedimentos foram realizados processos de desidratação a partir de álcool 70% até o álcool absoluto (três banhos), com duração de três minutos cada. Por último, foi realizada a clarificação em três banhos de xilol por três minutos cada. e o material foi montado para posterior análise em microscopia (Bogomoletz, 1980).

4.6.6 Picrosirius modificado para confocal (PMA-PRS).

Os cortes não corados foram desparafinizados e hidratados. Em seguida foram lavados por dez minutos, em água destilada e colocados em solução de ácido fosfomolibdico 0,2% por um minuto. A seguir, o material foi corado por uma hora e meia, em solução de Picrosirius. Depois de corados, os preparados histológicos foram lavados por dois minutos, em ácido clorídrico a 0,01N e, em seguida, por 45 minutos em álcool 70%. Após essa etapa, o material foi desidratado, iniciando com álcool 70% e, finalizando com álcool absoluto, todos os banhos com duração de três minutos. A clarificação foi realizada em três banhos de xilol, por três minutos cada. Ao fim do processo o material foi montado para as análises em microscópio confocal LSM 510-META (Zeiss, Jena, Alemanha), utilizando laser 543nm de HeNe e filtro LP560 (Dolber & Spach, 1993).

4.6.7 Resorcina-Fucsina (oxidada).

Após a desparafinização e hidratação até o álcool 70%, os cortes histológicos foram oxidados pela Oxona 10% por aproximadamente 45 minutos. Em seguida, foram corados pela Resorcina-Fucsina durante uma hora a 4°C. Para retirar o excesso do corante, foram submetidos a três banhos de álcool 95%, desidratados com três banhos em álcool isopropílico, com duração de três minutos cada e, clarificados em três banhos de xilol, por três minutos cada. Ao fim do processo os preparados corados foram montados em Goma de Damar (Lillie & Fullmer, 1976).

4.6.8 Resorcina-Fucsina (não-oxidada).

Cortes foram desparafinizados e hidratados até o álcool 70% e corados por Resorcina-Fucsina durante uma hora a 4°C. Para retirar o excesso do corante, os preparados foram submetidos a três banhos de álcool 95%, desidratados com três banhos em álcool isopropílico com duração de três minutos e clarificados em três banhos de xilol por três minutos. Em seguida, o material foi montado em Goma de Damar (Lillie & Fullmer, 1976).

4.7 Imunofluorescência.

Fragmentos de coração foram imersos em OCT Tissue Tek e congelados em nitrogênio líquido, para posterior seccionamento (5µm) em criostato (Leica CM1850, Munique, Alemanha). Após o seccionamento, os cortes foram colocados em lâminas com silane, para melhor aderência do tecido, por uma hora e fixados por cinco minutos com acetona a 4°C (Merck, Darmstadt, Alemanha). Em seguida, foram hidratados em PBS por cinco minutos. Após a hidratação, foi adicionada solução de bloqueio (soro normal de carneiro 1:50 em PBS diluída em albumina bovina - BSA a 1%) por 12 horas. Após esse período, os anticorpos primários e Imunoglobulinas (Ig) não-relacionadas foram adicionados aos cortes. Para as análises da presença de galectina-3 foi utilizado o anticorpo primário anti-gal-3 humana (Pharmigen, San Diego, EUA) e para as análises da expressão de moléculas de matriz extracelular foram utilizados os anticorpos anti-LN (Novotec, St Martin-La-Garenne, França), anti-FN (Novotec, St Martin-La-Garenne, França), anti-colágeno III (Southern Biotechnology Associates inc, Birmingham, EUA). Os tecidos foram incubados em estufa de demanda bioquímica de oxigênio (BOD) por uma hora e, em seguida lavados, duas vezes, com PBS por cinco minutos. Após a lavagem, foram adicionados os anticorpos secundários. Como anticorpo secundário para a marcação de gal-3 foi utilizado um anticorpo produzido em galinha anti-Ig de camundongo, conjugado ao fluoróforo Alexa 647 (Molecular Probes, Eugene, EUA). Nas marcações para MEC foi utilizado um anticorpo secundário produzido em cabra anti-Ig de coelho, conjugado ao fluoróforo AlexaFluor 488 (Molecular Probes, Eugene,

EUA). Os preparados histológicos permaneceram por 40 minutos sob incubação em estufa BOD. Após esse período, o material foi lavado, duas vezes, por cinco minutos em PBS e montado com solução *anti-fading* (SlowFade Light Antifade Kit – Molecular Probes, Eugene, EUA). Após secagem, o material foi analisado em microscópio confocal a laser LSM 510-Meta (Zeiss, Jena, Alemanha), utilizando-se laser 488nm de e filtro BP 505-530 e laser 633nm de HeNe e filtro LP650.

4.8 Gráficos e estatística.

Os resultados foram apresentados como média e desvio padrão. As diferenças significativas entre as médias foram asseguradas pelo teste One-way ANOVA, seguido do pós-teste Newman's Keuls. Os valores de $p < 0.05$ (*), $p < 0.01$ (**) e $p < 0.001$ (***) foram considerados significativos. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 4.0.

5. RESULTADOS.

5.1. Parasitemia.

A infecção experimental pelo *T. cruzi* possibilita estudar em modelos *in vivo*, o ciclo do parasito no hospedeiro, o desenvolvimento do quadro infeccioso e a resposta imunitária do hospedeiro. A utilização de modelos murinos e a dicotomia gerada em respostas imunitárias, Th1 e Th2, em diferentes linhagens de camundongos, se tornou um atrativo importante entre parasitologistas e imunologistas. Porém, o avanço na utilização desses modelos demonstrou que a resposta obtida após a infecção experimental é dependente da cepa parasitária, local de inóculo e linhagem de camundongo utilizados (Devera *et al*, 2003). Assim, no intuito de caracterizar o modelo experimental de infecção subcutânea, utilizando a cepa DM28c, decidimos avaliar a parasitemia dos camundongos infectados e submetidos a diferentes tratamentos.

Nossos dados demonstraram que o pico da parasitemia, no modelo de infecção subcutânea, utilizando a cepa DM28c, ocorreu no 7º dia de infecção (figura 4.1). Os tratamentos com captopril, captopril + HOE-140 e HOE-140 não modificaram o padrão da curva ou o pico da parasitemia quando comparados aos animais infectados não-tratados (figura 4.1). Os animais tratados com captopril + HOE-140 apresentaram aumento no número de parasitos circulantes, embora esse aumento não tenha sido significativo, quando comparado aos animais infectados. Por outro lado, os animais infectados tratados apenas com HOE-140 apresentam diminuição no número de parasitos circulantes quando comparados aos animais infectados, embora esses valores também não tenham apresentado significância estatística. Nossos dados demonstraram que os tratamentos com captopril e/ou HOE-140 podem provocar a flutuações na curva de parasitemia, sem gerar mudanças no pico de parasitemia ou apresentar modificações estatisticamente significativas. O gráfico de parasitemia é representativo de quatro experimentos independentes, sendo cinco animais por grupo, em cada experimento.

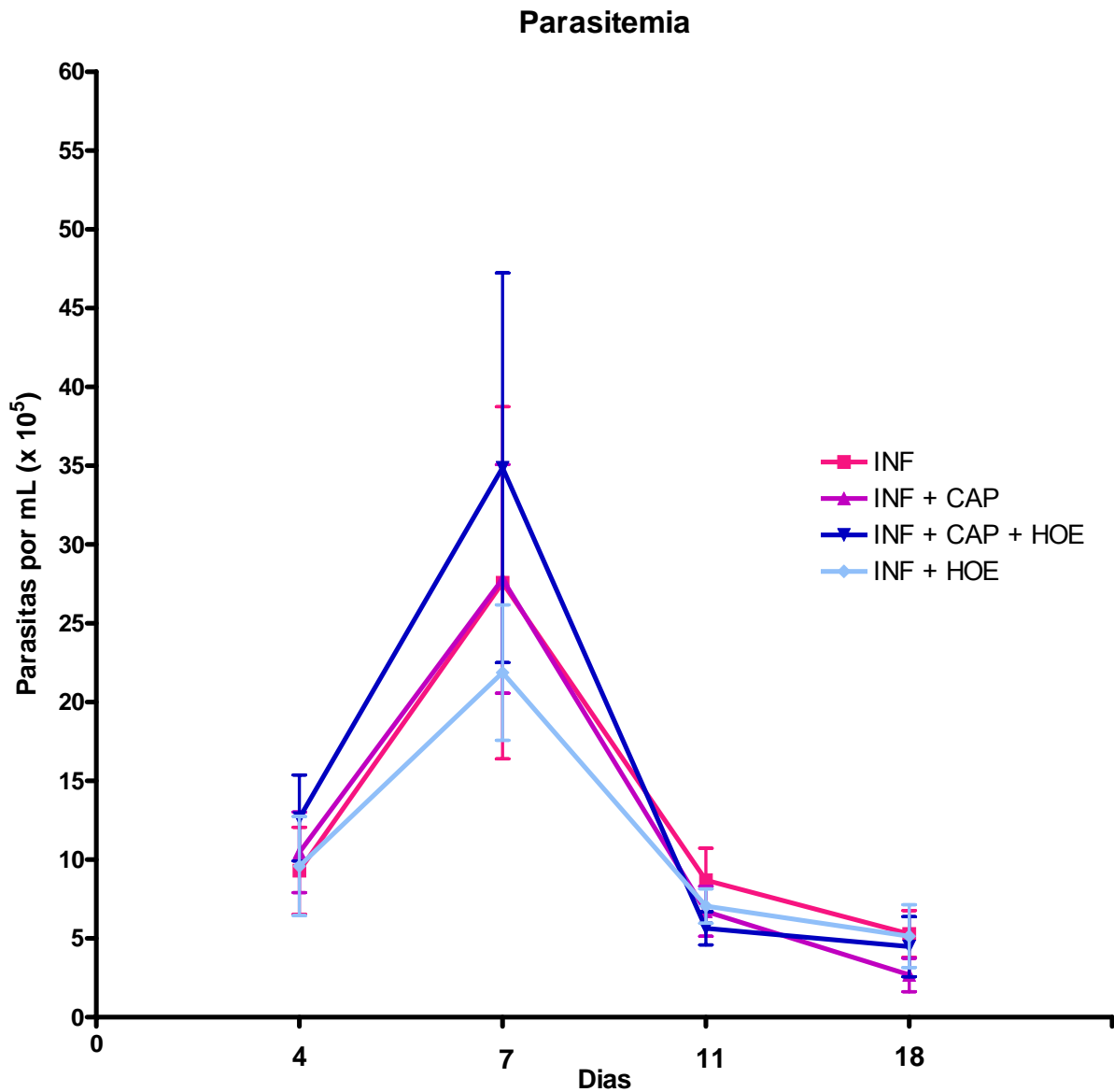


Figura 5.1 – Gráfico representando a parasitemia de animais infectados s/c com 10^6 TCTs/animal, da cepa Dm28c. Os animais foram previamente tratados com diferentes drogas, 1 hora antes da infecção. As cores representam: Rosa, animais infectados; Roxo, animais infectados e tratados com Captopril; Azul escuro, animais infectados e tratados com Captopril e HOE-140; Azul claro, animais infectados e tratados com HOE-140. Gráfico representativo de quatro experimentos independentes, sendo três animais por grupo experimental.

5.2. Celularidade.

No contexto da infecção experimental pelo *T. cruzi*, diversos autores demonstraram aumento na celularidade de linfonodos subcutâneos e baço, como resposta à expansão clonal e inespecífica de linfócitos T e B, observada durante a fase aguda da infecção (Minoprio *et al*, 1986). Entretanto, em linfonodos mesentéricos foi demonstrado um efeito contrário, onde há diminuição em números absolutos de linfócitos, provavelmente, por morrerem por apoptose (deMeis *et al*, 2006). Savino e colaboradores observaram que diferentes cepas de camundongos, infectados intraperitonealmente com *T. cruzi*, apresentavam uma intensa atrofia tímica, com perda da região cortical e diminuição em números absolutos da celularidade tímica (Savino *et al*, 1989). Assim, decidimos investigar em nosso modelo experimental, as alterações observadas por outros grupos, no timo e linfonodos subcutâneos. Para isso foram retirados o timo e linfonodos subcutâneos, de camundongos C57BL-6, durante a fase aguda (30 dias pós-infecção), num total de quatro experimentos independentes.

Nossos dados demonstram que no modelo de infecção experimental subcutânea, ocorre uma intensa diminuição no número total de timócitos obtidos de animais infectados, quando comparados aos animais controles (figura 4.2). Porém, os animais infectados e tratados não apresentam diferenças significativas na celularidade tímica, quando comparados aos animais infectados e não-tratados. Esses dados demonstram que a via de cininas não está diretamente envolvida com a atrofia tímica, observada durante a fase aguda da infecção experimental.

Em nossas análises de celularidade, em linfonodos subcutâneos, axilares e inguinais, observamos que após a infecção experimental pelo *T. cruzi*, ocorre aumento na celularidade, em comparação com os valores obtidos com os animais controles. Entretanto, os animais infectados, tratados com HOE-140, apresentam diminuição na celularidade dos linfonodos subcutâneos, quando comparados com os animais infectados não tratados ou tratados com captopril e, captopril + HOE-140. Os valores observados nos animais infectados e tratados com HOE-140 são similares aos valores obtidos com os animais controles, sugerindo que o bloqueio do receptor B₂ pode estar inibindo o recrutamento celular e a modulação da expansão clonal em linfonodos subcutâneos (figura 4.3).

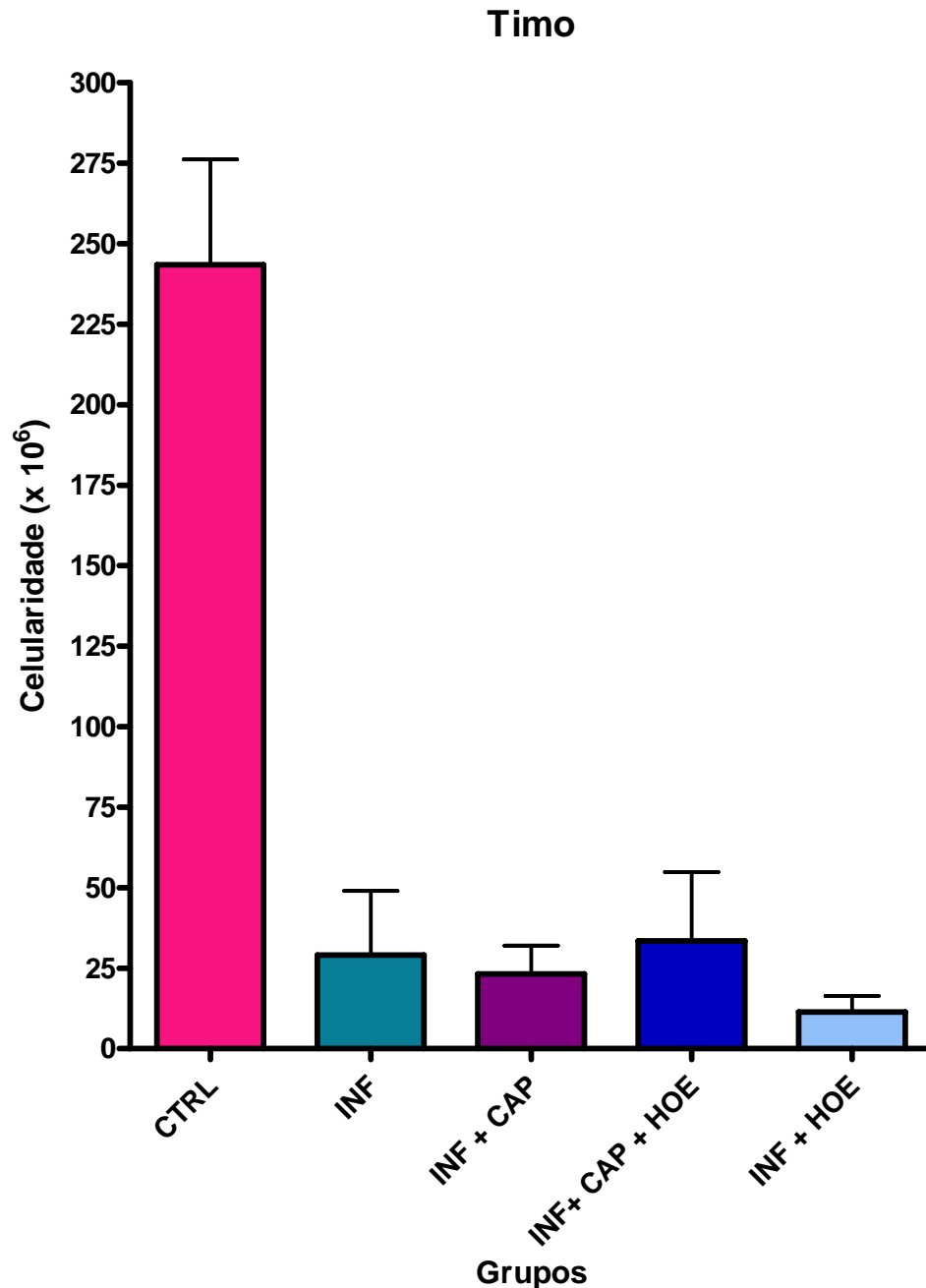


Figura 5.2 – Gráfico representativo da celularidade tímica de animais controles e infectados s/c com 10⁶ TCTs/animal (Dm28c), tratados ou não, após 30 dias de infecção. Os animais foram previamente tratados com diferentes drogas, 1 hora antes da infecção. As cores representam: Rosa, animais controles; Azul piscina, animais infectados; Roxo, animais infectados e tratados com Captopril; Azul escuro, animais infectados e tratados com Captopril e HOE-140; Azul claro, animais infectados e tratados com HOE-140. Gráfico representativo de três experimentos independentes, sendo três animais por grupo experimental. (p< 0.001)

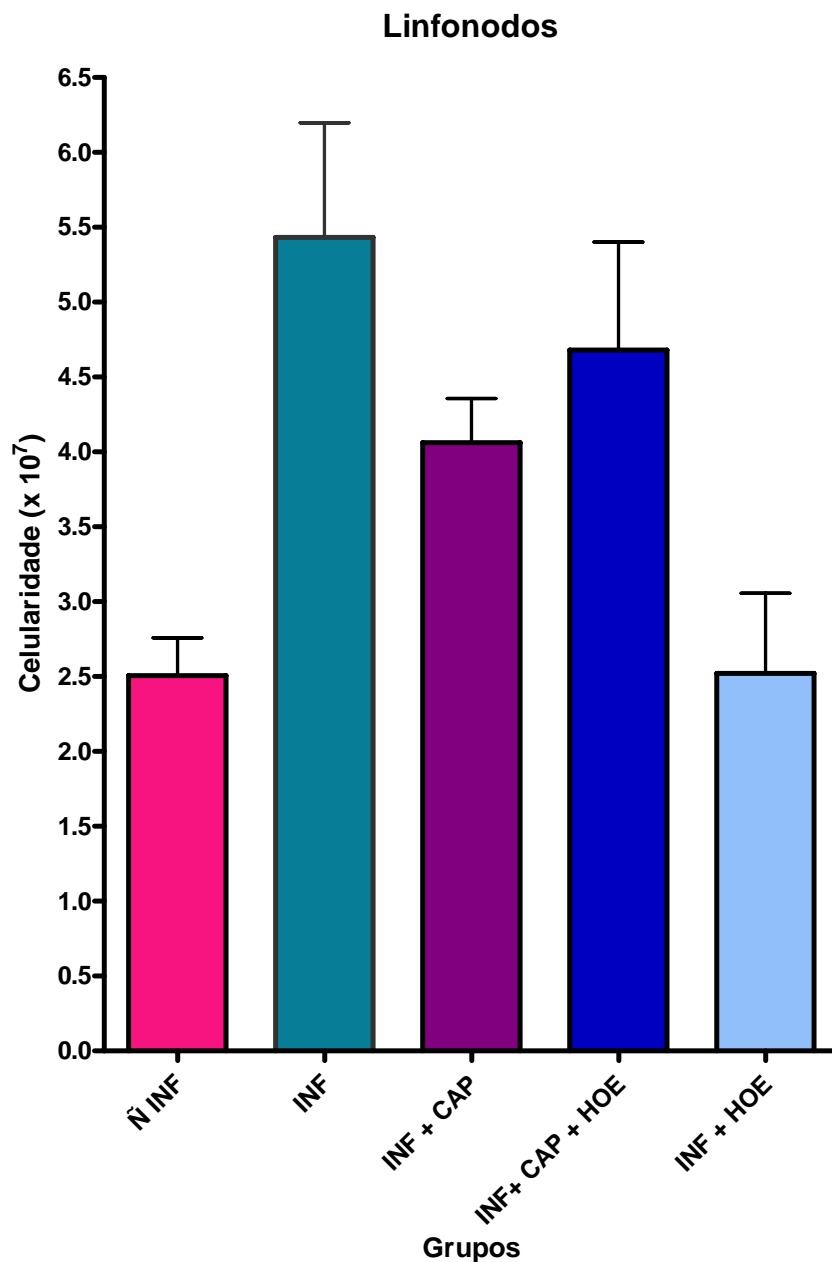


Figura 5.3 – Gráfico da celularidade de linfonodos subcutâneos de animais controles e infectados s/c, com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. Os animais foram previamente tratados com diferentes drogas, 1 hora antes da infecção. As cores representam: Rosa, animais não infectados; Azul piscina, animais infectados; Roxo, animais infectados e tratados com Captopril; Azul escuro, animais infectados e tratados com Captopril e HOE-140; Azul claro, animais infectados e tratados com HOE-140. Gráfico representativo de três experimentos independentes, sendo três animais por grupo experimental. (* $p < 0.01$)

5.3. Estudo Histopatológico da cardite aguda.

A cardite murina é caracterizada por intenso infiltrado inflamatório, composto principalmente por células T CD8⁺, durante a fase crônica da infecção experimental. Em nosso modelo experimental decidimos investigar a formação do quadro de cardite murina durante a fase aguda e a presença de infiltrado inflamatório no coração dos animais infectados, tratados ou não. Para isso, corações de camundongos C57BL-6 com um mês de infecção foram processados e corados, utilizando-se colorações de rotina e especiais. Ao todo foram realizados cinco experimentos independentes.

5.3.1 Composição e intensidade do infiltrado inflamatório.

5.3.1.1 Grupo controle:

Os corações dos animais controles, apresentaram nas regiões atrial (A) (figuras 4.4 A-C), ventricular direita (VD) (figuras 4.5 A,C e E) e ventricular esquerda (VE) (figuras 4.5 D e F) textura tecidual homogênea, integridade das fibras musculares e ausência de fibrose, compatível com padrão de normalidade para o órgão. Além disso, não foi observado, comprometimento dos gânglios nervosos parassimpáticos e filetes nervosos como mostrado nas figuras 4.4 D e F. As válvulas cardíacas apresentaram-se íntegras e sem a presença de infiltrado inflamatório (figura 4.4 E), assim como a região de transição átrio-ventricular (figura 4.5 B). Pela coloração de Giemsa, não foi observado infiltrado inflamatório em nenhuma das regiões do coração (figuras 4.6, A-F). Os animais controles analisados estavam com 9 a 10 semanas de idade, equivalente aos animais infectados dos demais grupos.

5.3.1.2 Grupo infectado:

As análises dos preparados histológicos corados por HE, obtidos de animais infectados não-tratados, mostraram a presença de pequenos e médios focos inflamatórios, sendo a região atrial, o sítio inflamatório preferencial (figuras 4.7 A-F). Na região atrial, observamos pequenos e médios focos inflamatórios, com predileção para

as regiões subendocárdica e subpericárdica (figuras 4.7 A-F). Foi observado nos preparados histológicos ganglionite, perineurite e neurite, nos gânglios parassimáticos e filetes nervosos dos corações obtidos de animais infectados. Esse resultado reproduz dados anteriores da literatura, que descrevem a presença de infiltrado inflamatório em gânglios nervosos do coração, tanto em animais infectados experimentalmente pelo *T. cruzi*, quanto em humanos (figuras 4.8 A e B). Além disso, foi observado comprometimento de válvulas cardíacas, compatível com o padrão para infecção experimental pelo *T. cruzi* (figuras 4.8 C e D). As figuras 4.8 E e F demonstram a presença de infiltrado inflamatório intersticial difuso na região de transição átrio-ventricular.

Na região ventricular, pequenos focos inflamatórios de localização subpericárdica e/ou intersticial foram observados (figuras 4.9 A-F).

A coloração por Giemsa de Lennert, permitiu observar a presença de infiltrado inflamatório cardíaco composto, principalmente, por monócitos e linfócitos e alguns neutrófilos e mastócitos degranulados (figuras 4.10 A e F).

5.3.1.3 Grupo infectado e tratado com captopril:

Pela análise dos preparados histológicos, corados por HE foi possível observar que os animais infectados e tratados com captopril apresentaram aumento de infiltrado inflamatório quando comparados aos animais infectados não-tratados (figuras 4.11; 4.12 e 4.13 A-F e 4.14 A-D). É interessante ressaltar que os animais infectados e tratados com captopril apresentaram mudança no sítio inflamatório preferencial, sendo nestes animais, a região ventricular a mais comprometida. A região atrial apresentou pequenos e médios focos inflamatórios, com localização subpericárdica e subendocárdica (figura 4.11, A-F; 4.12A). A região de transição átrio-ventricular apresentou infiltrado inflamatório, intersticial e difuso (figura 4.12 B e C). Novamente, foi observado comprometimento das válvulas cardíacas (figura 4.12 D). Além da presença de um grande infiltrado inflamatório próximo à válvula tricúspide (figura 4.12 E).

O ventrículo direito apresentou infiltrado inflamatório intersticial difuso, apresentando grandes focos inflamatórios subpericárdicos (figuras 4.12 F; 4.13 A-D). Foi observado a presença de ninho de amastigotas no ventrículo direito (figuras 4.13 D;

4.14 B-D). No ventrículo esquerdo, foi observado pequenos e médios focos inflamatórios subpericárdicos e intersticiais (figuras 4.13 E e F; 4.14 A).

A coloração por Giemsa de Lennert revelou que esse infiltrado inflamatório é principalmente linfo-monocítico, com presença de poucos neutrófilos e mastócitos degranulados, presentes esparçadamente por todo o tecido (figuras 4.14 E-F; 4.15 A-F), portanto, apresentando o mesmo padrão celular observado nos animais infectados e não-tratados.

5.3.1.4 Grupo infectado e tratado com captopril + HOE-140:

Pela análise da coloração por HE, observamos que os corações dos animais infectados e tratados com captopril + HOE-140, apresentaram diminuição no infiltrado inflamatório, quando comparados aos animais infectados tratados com captopril. Os animais infectados e tratados com captopril + HOE-140 apresentaram padrão de infiltrado inflamatório similar ao dos animais infectados e não-tratados (figuras 4.16 e 4.17). A região atrial, apresentou focos pequenos e médios, de infiltrados inflamatórios, subpericárdicos e subendocárdicos (figura 4.16 A-E). Esses animais voltaram a apresentar focos inflamatórios preferenciais na região atrial, como observado nos animais infectados não-tratados. A região de transição átrio-ventricular apresentou infiltrado inflamatório interstiial e difuso com pequenos focos ao longo do tecido (figuras 4.16 F; 4.17 A).

Os ventrículos direito e esquerdo apresentaram pequenos e médios infiltrados inflamatórios focais, preferencialmente, subpericárdico e intersticial (figuras 4.17, B-F).

Ao Giemsa de Lennert, foi mantido o mesmo padrão celular do infiltrado inflamatório, com predominância de linfócitos e monocíticos e, alguns neutrófilos e mastócitos degranulados (figura 4.8, D-F).

5.3.1.5 Grupo Infectado e tratado com HOE-140:

Nos corações de animais infectados e tratados somente com HOE-140, corados por HE, foi observado infiltrado inflamatório semelhante ao visto nos corações dos animais infectados não-tratados (figuras 4.19; 4.20). A região atrial apresentou pequeno

a médio infiltrado inflamatório, nas regiões subpericárdicas e subendocárdicas (figura 4.19 A-E). Novamente, foi observado um padrão inflamatório preferencial para a região atrial, semelhante ao visto nos animais infectados não tratados e tratados com captopril + HOE-140. Na região de transição átrio-ventricular foi encontrado um infiltrado inflamatório intersticial e difuso, com a presença de focos inflamatórios medianos (figura 4.19 F; 4.20 A).

Os ventrículos esquerdo e direito, apresentaram infiltrados inflamatórios, pequenos a médios, com localização subpericárdica e intersticial (figuras 4.20 B-F).

Pela análise dos preparados histológicos, corados por Giemsa de Lennert, foi possível observar um infiltrado linfo-monocítico, alguns neutrófilos e mastócitos degranulados, distribuídos espaçadamente pelo tecido cardíaco (figuras 4.21 A-F).

Nossos resultados demonstraram que nos corações obtidos dos animais infectados, tratados ou não, os infiltrados inflamatórios estão presentes em todas as câmaras cardíacas, apresentando padrões focais a difusos, de tamanhos variados. A localização do infiltrado inflamatório varia entre os tratamentos, podendo ser subpericárdica, subendocárdica ou intersticial. Entretanto, é interessante ressaltar que apenas os animais infectados e tratados com captopril, apresentaram aumento no infiltrado inflamatório quando comparados aos animais infectados não tratados. Além disso, houve mudança no padrão preferencial de câmara cardíaca para o sítio inflamatório, sendo nesses animais, mais presente nos ventrículos, onde também foi observada a presença de ninhos de amastigotas. O padrão do fenótipo celular do infiltrado inflamatório foi constante em todos os grupos, sendo composto, principalmente, por linfócitos e monócitos, seguido de neutrófilos e mastócitos degranulados.

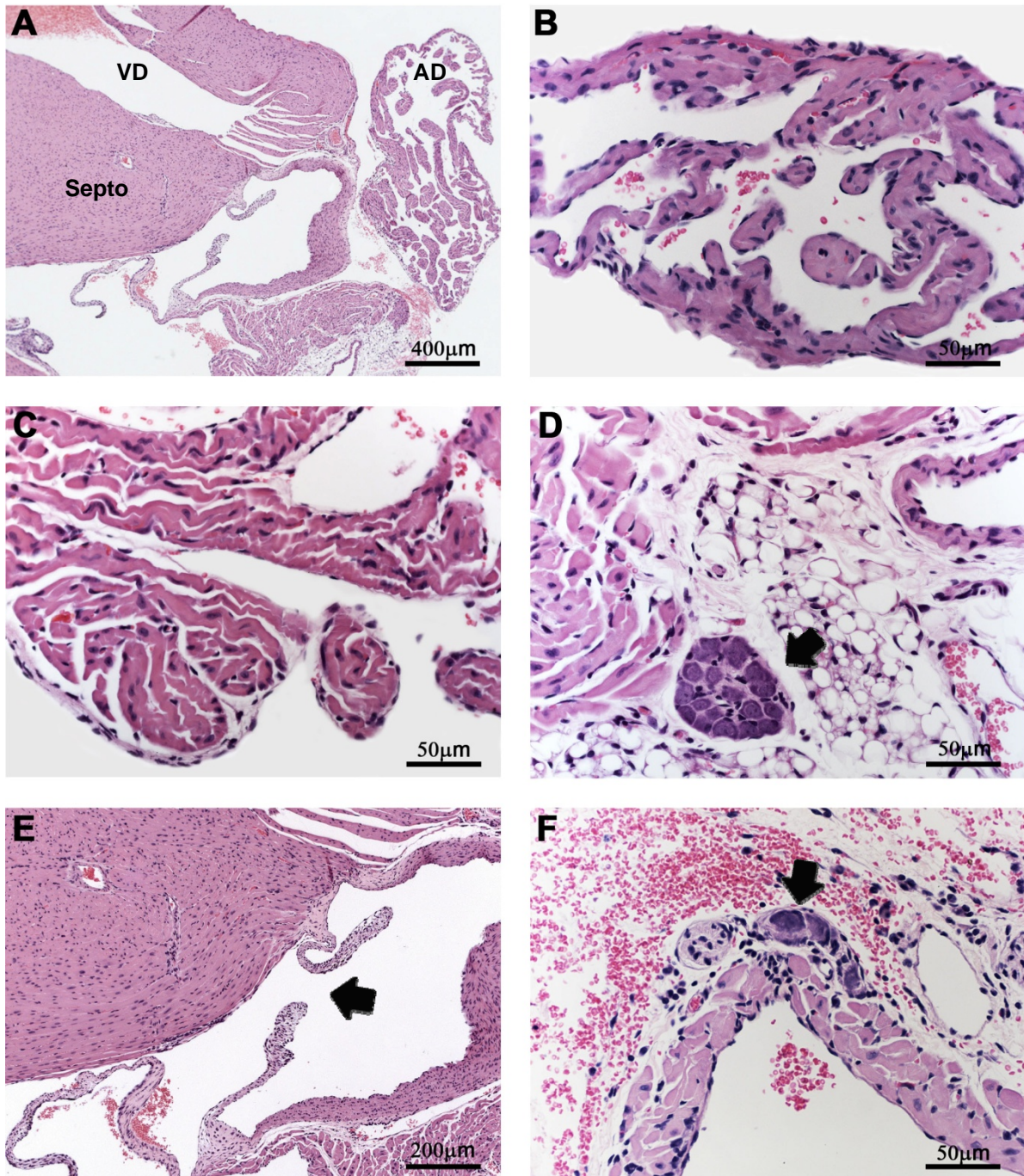


Figura 5.4 – Corações de camundongos C57BL-6 do grupo controle com 9-10 semanas de vida. (A) Visão panorâmica do átrio direito (AD), ventriculo direito (VD) e septo. **(B)** Átrio direito com aspecto normal e integridade de fibras. **(C)** Átrio esquerdo com aspecto normal e integridade das fibras. **(D)** Gânglio parassimpático (seta) com aspecto normal. **(E)** Válvula mitral com suas 2 valvas com aspecto normal sem infiltrado inflamatório. **(F)** Gânglios parassimpáticos e filetes nervosos com aspecto normal. Coloração: HE.

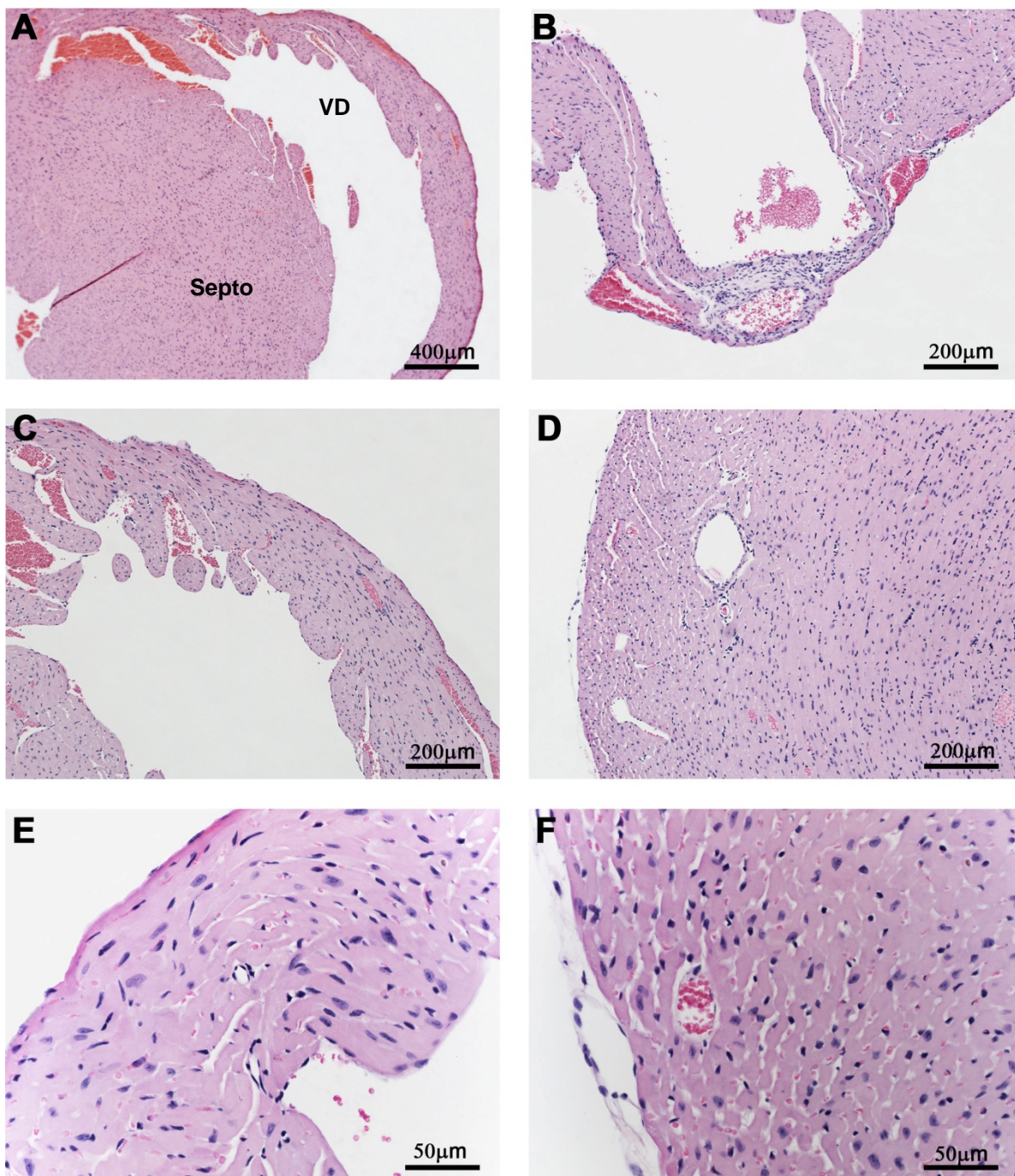


Figura 5.5 – Corações de camundongos C57BL-6 do grupo controle com 9-10 semanas de vida. (A) Visão panorâmica do ventrículo direito (VD) e septo com aspecto normal. **(B)** Transição atrio-ventricular com aspecto normal. **(C)** Ventrículo direito em maior aumento mostrando tecido com aspecto normal. **(D)** Ventrículo esquerdo com aspecto normal. **(E)** Ventrículo direito em maior aumento para melhor observação da estrutura normal. **(F)** Ventrículo esquerdo com aspecto normal sem infiltrados inflamatórios. Coloração: HE.

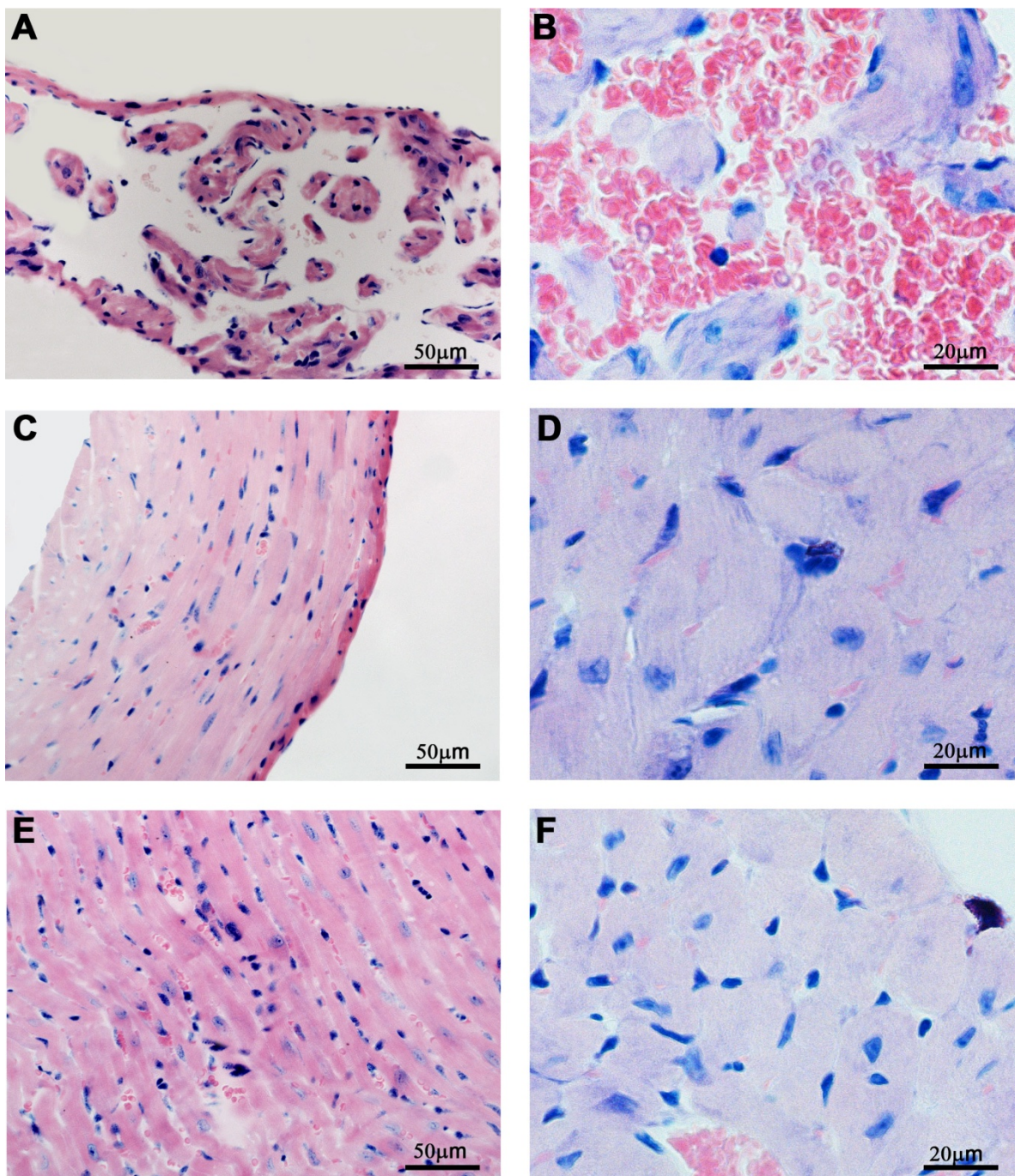


Figura 5.6 – Corações de camundongos C57BL-6 do grupo controle com 9-10 semanas de vida. (A) Átrio com aspecto normal. (B) Átrio em maior aumento mostrando ausência de células inflamatórias. (C) Ventrículo direito mostrando tecido com aspecto normal. (D) Ventrículo direito sem infiltrado inflamatório. (E) Ventrículo esquerdo com aspecto normal. (F) Ventrículo esquerdo sem infiltrado inflamatório. Coloração: Giemsa de Lennert.

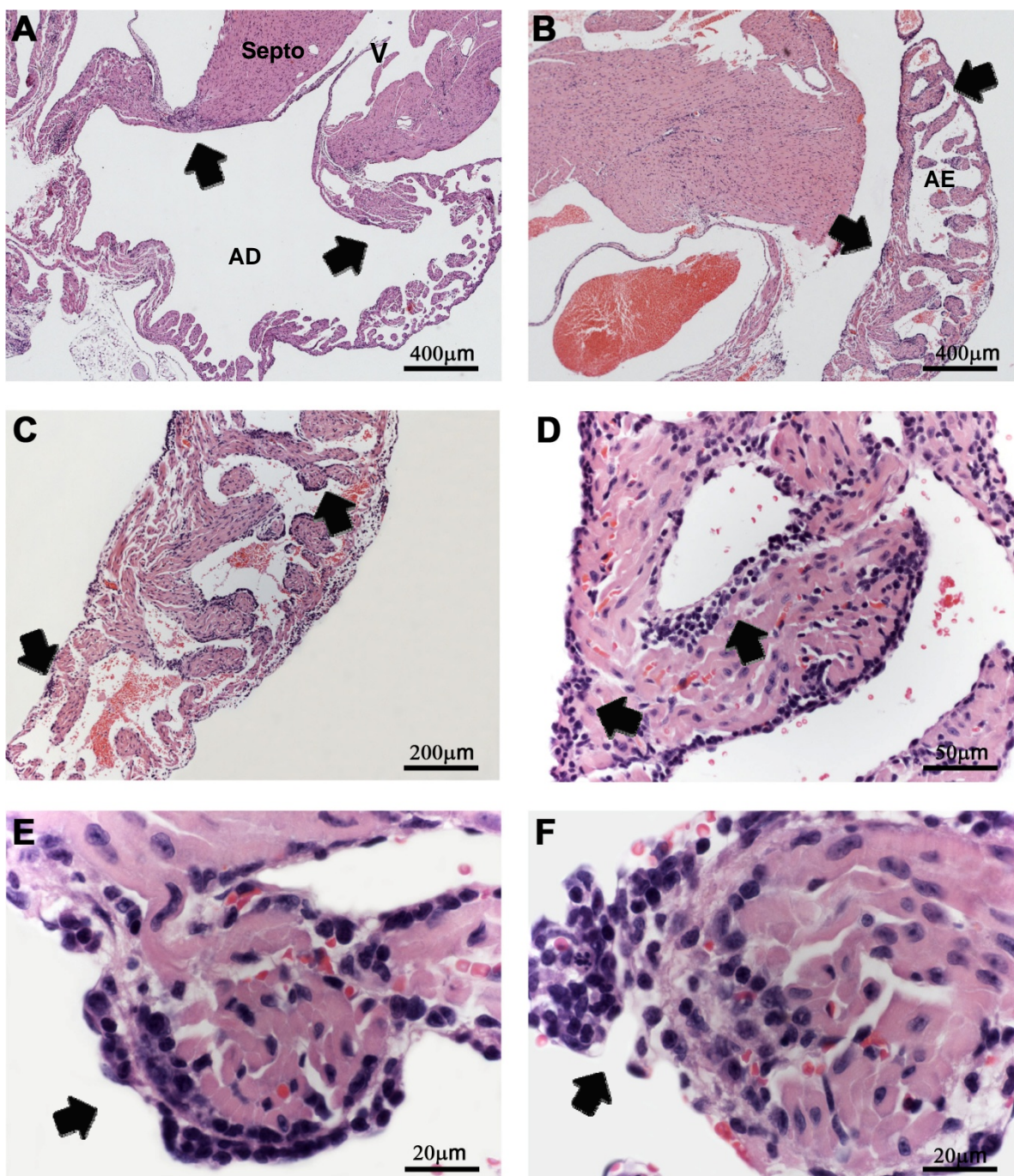


Figura 5.7 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c). (A) Visão panorâmica da região atrial direita (AD) e ventrículo direito (VD) com presença de infiltrados inflamatórios (setas). **(B)** Visão panorâmica do átrio esquerdo (AE) com focos de infiltrados inflamatórios. Setas indicando infiltrados subpericárdicos e subendocárdicos. **(C, D)** Átrio esquerdo com infiltrados inflamatórios subpericárdicos e subendocárdicos (setas). **(E, F)** Infiltrados inflamatórios subendocárdicos (setas). Coloração: HE.

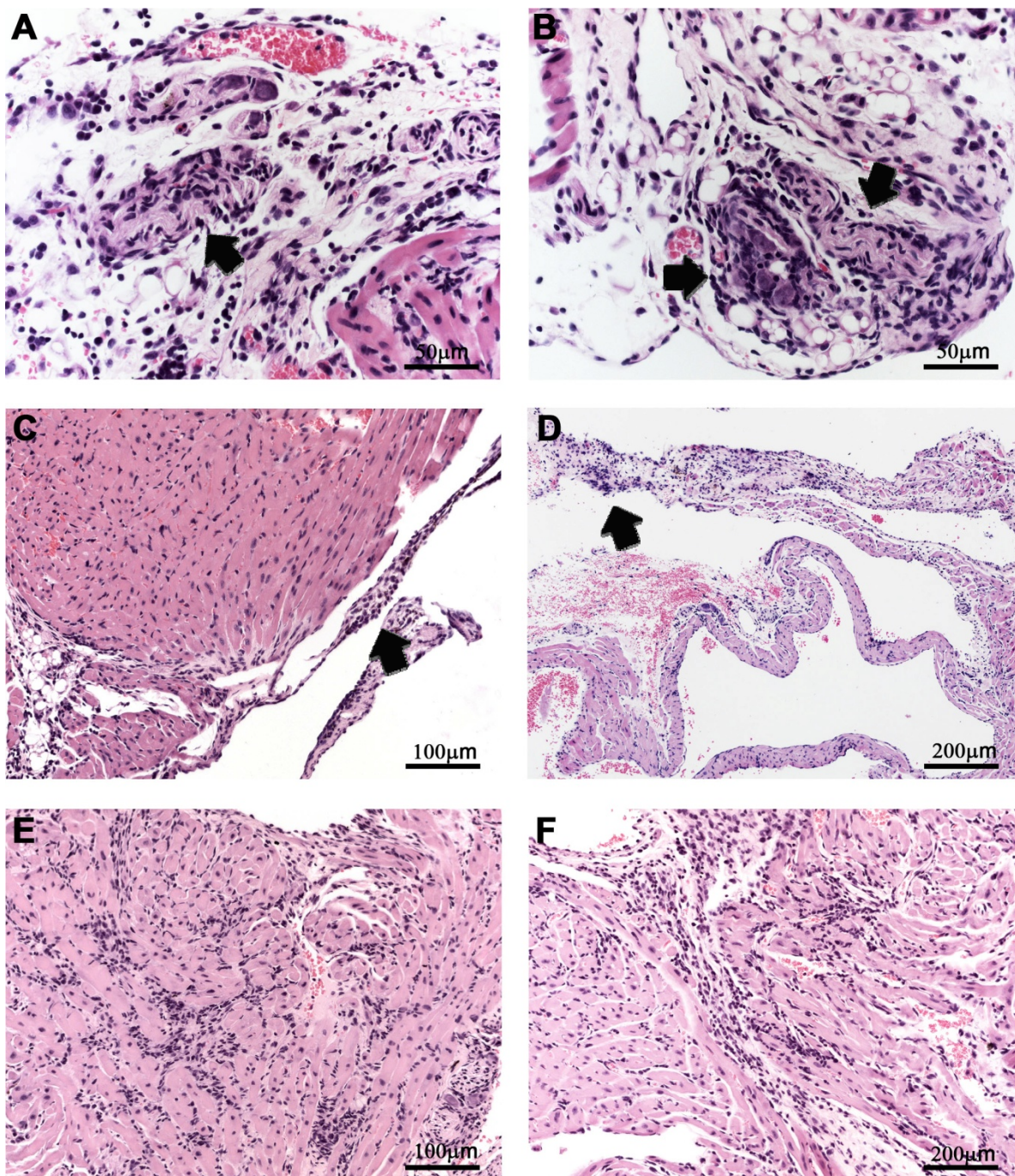


Figura 5.8 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c). (A) Filete nervoso com neurite (seta). (B) Gânglios parassimpáticos com ganglionite e filete nervoso com perineurite (setas). (C, D) Comprometimento de válvula cardíaca (setas). (E, F) Infiltrados inflamatórios intersticiais difusos em transição átrio-ventricular. Coloração: HE.

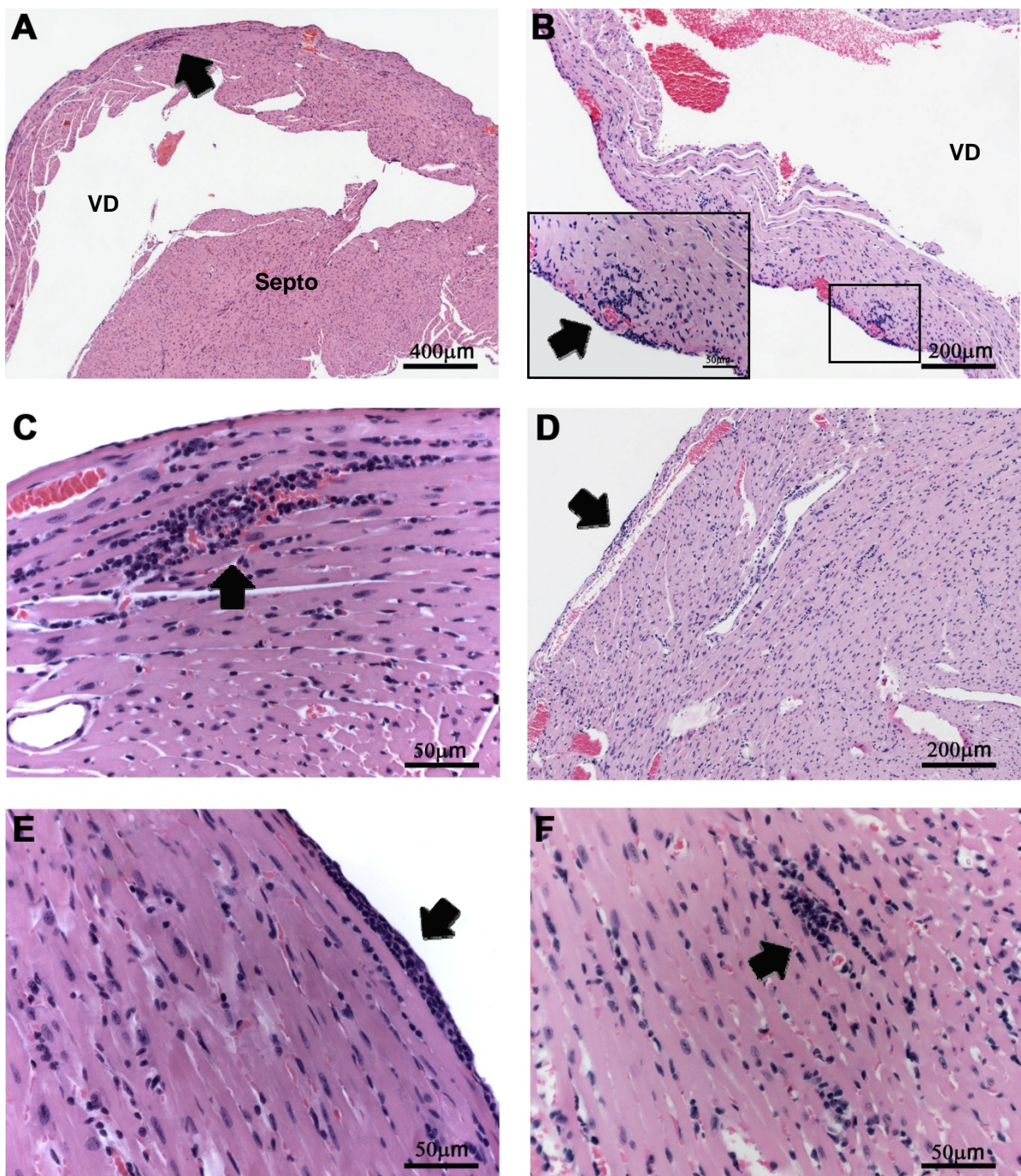


Figura 5.9 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c). (A) Visão panorâmica do ventrículo direito (VD) e septo. Seta indicando infiltrado inflamatório focal intersticial. **(B)** Ventrículo direito (VD) com infiltrado inflamatório perivascular **(C)** Infiltrado inflamatório intersticial no ventrículo direito. **(D)** Ventrículo esquerdo com infiltrado inflamatório subpericárdico. **(E)** Infiltrado inflamatório subpericárdico no ventrículo esquerdo. **(F)** Infiltrado inflamatório intersticial focal no ventrículo. Coloração: HE.

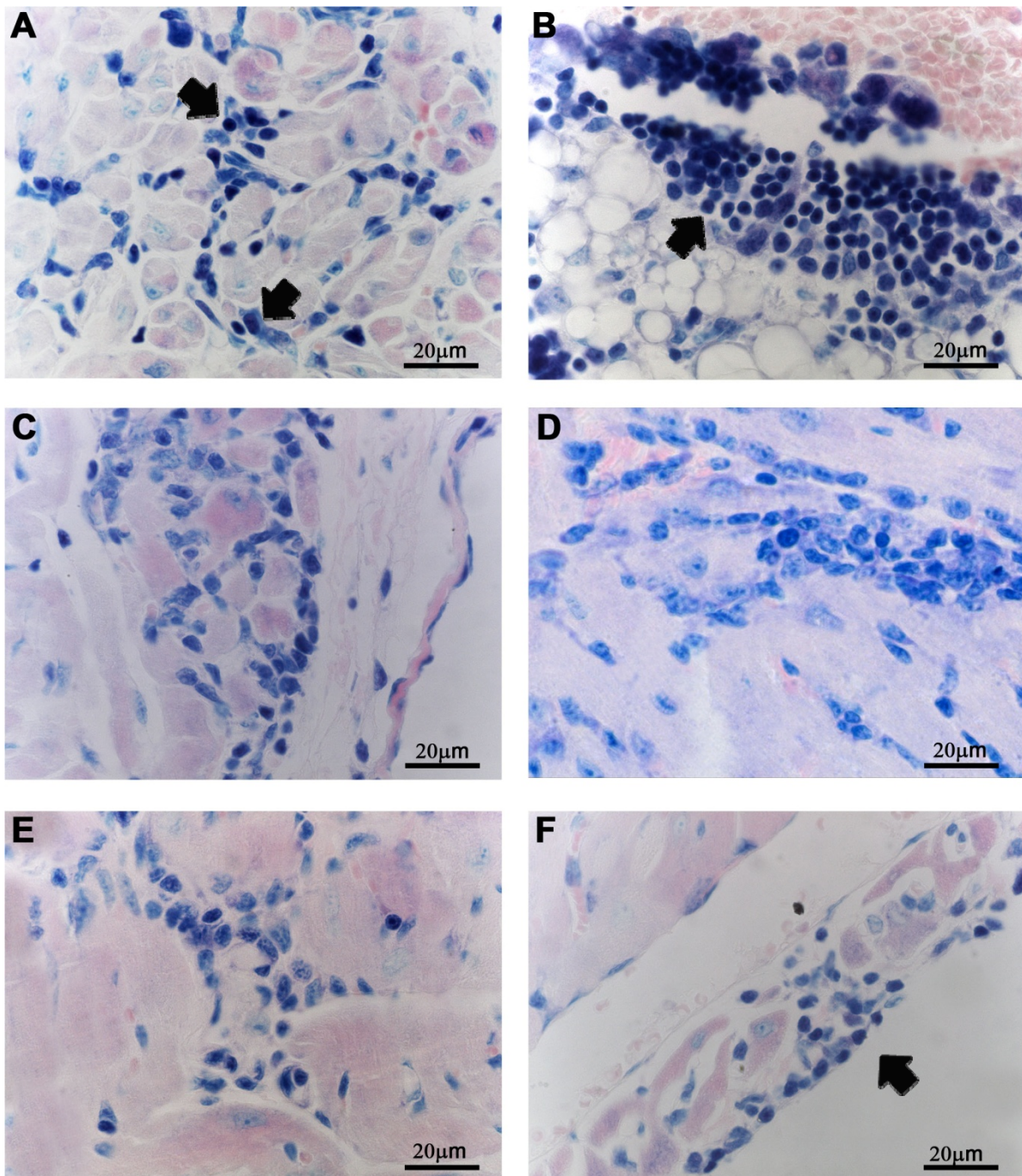


Figura 5.10 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c). (A) Células inflamatórias formando um pequeno foco intersticial na região auricular. Setas indicando monócito e linfócito. (B) Adensamento linfóide próximo ao tecido adiposo micro e macro gótico no átrio. (C, D) Infiltrados inflamatórios intersticiais focais no ventrículo direito. (E) Infiltrado inflamatório intersticial focal no ventrículo esquerdo. (F) Infiltrado inflamatório subpericárdico no ventrículo esquerdo. Coloração: Giemsa de Lennert.

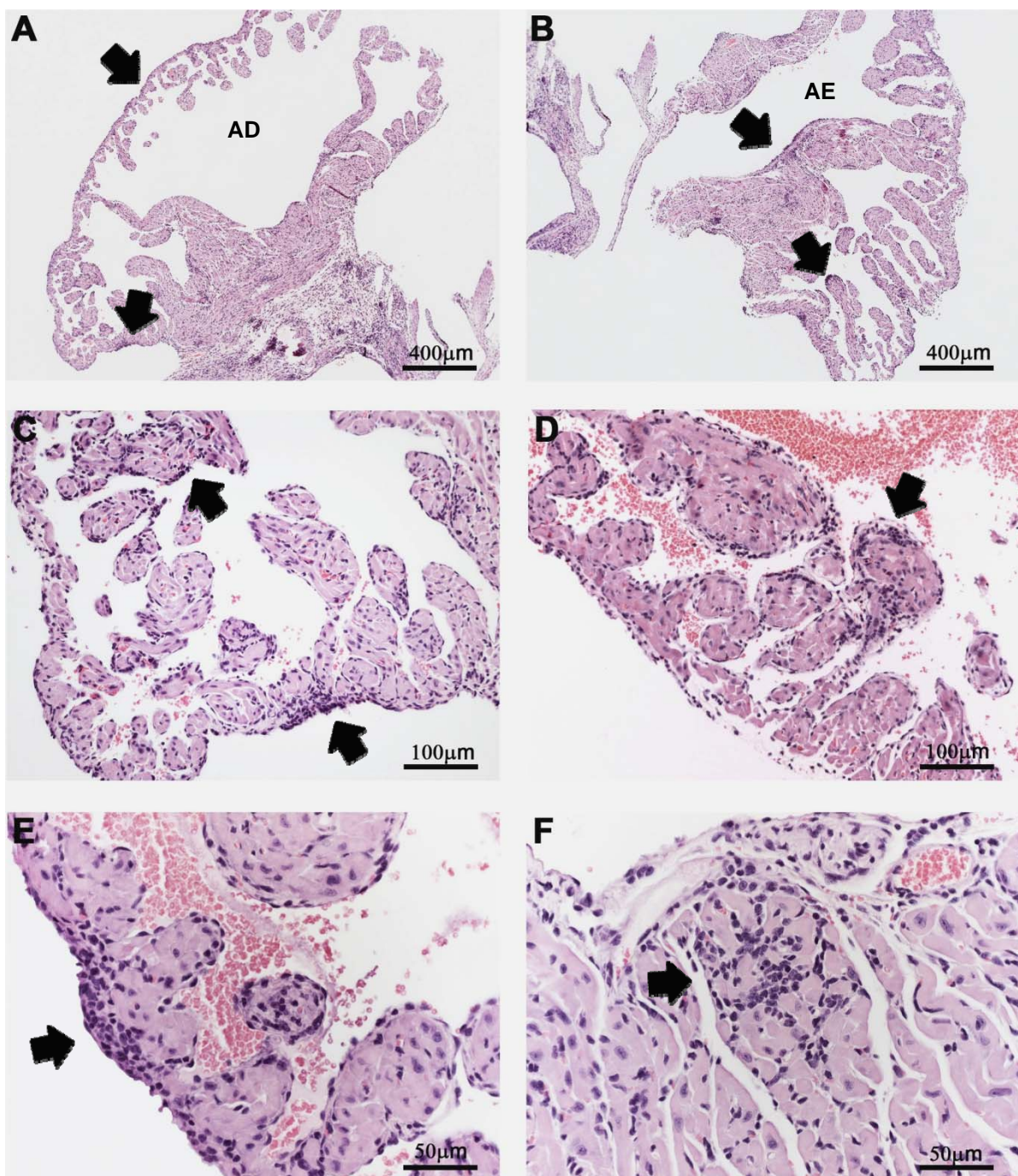


Figura 5.11 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente 1 hora antes da infecção. (A) Visão panorâmica do átrio direito (AD) com infiltrados inflamatórios focais (setas). (B) Visão panorâmica do átrio esquerdo (AE) com infiltrados inflamatórios focais (setas). (C) Átrio direito em maior aumento com setas indicando infiltrados focais subpericárdicos e subendocárdicos. (D) Átrio esquerdo com infiltrado subendocárdico focal. (E) Infiltrado inflamatório subpericárdico focal no átrio direito. (F) Infiltrado inflamatório intersticial focal no átrio esquerdo. Coloração: HE.

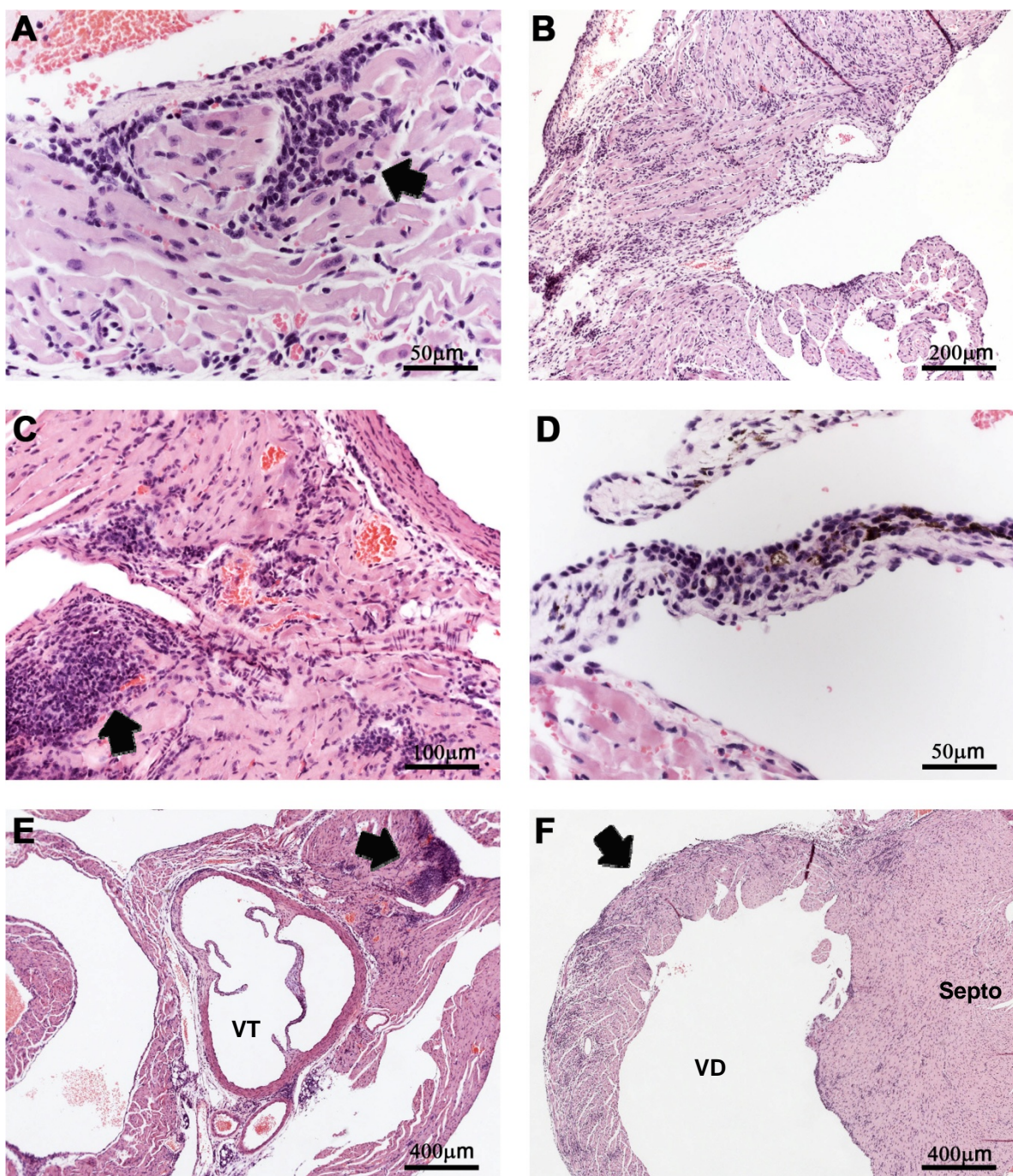


Figura 5.12 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente 1 hora antes da infecção. (A) Átrio esquerdo. Seta indicando infiltrado inflamatório intersticial acompanhando a fibra muscular. (B) Infiltrado inflamatório intersticial difuso na região de transição átrio-ventricular. (C) Infiltrado inflamatório justavascular próximo a artéria pulmonar (seta). (D) Comprometimento da válvula cardíaca. (E) Grande infiltrado inflamatório (seta) próximo à válvula tricúspide (VT). (F) Infiltrado inflamatório difuso no ventrículo direito (VD). Coloração: HE.

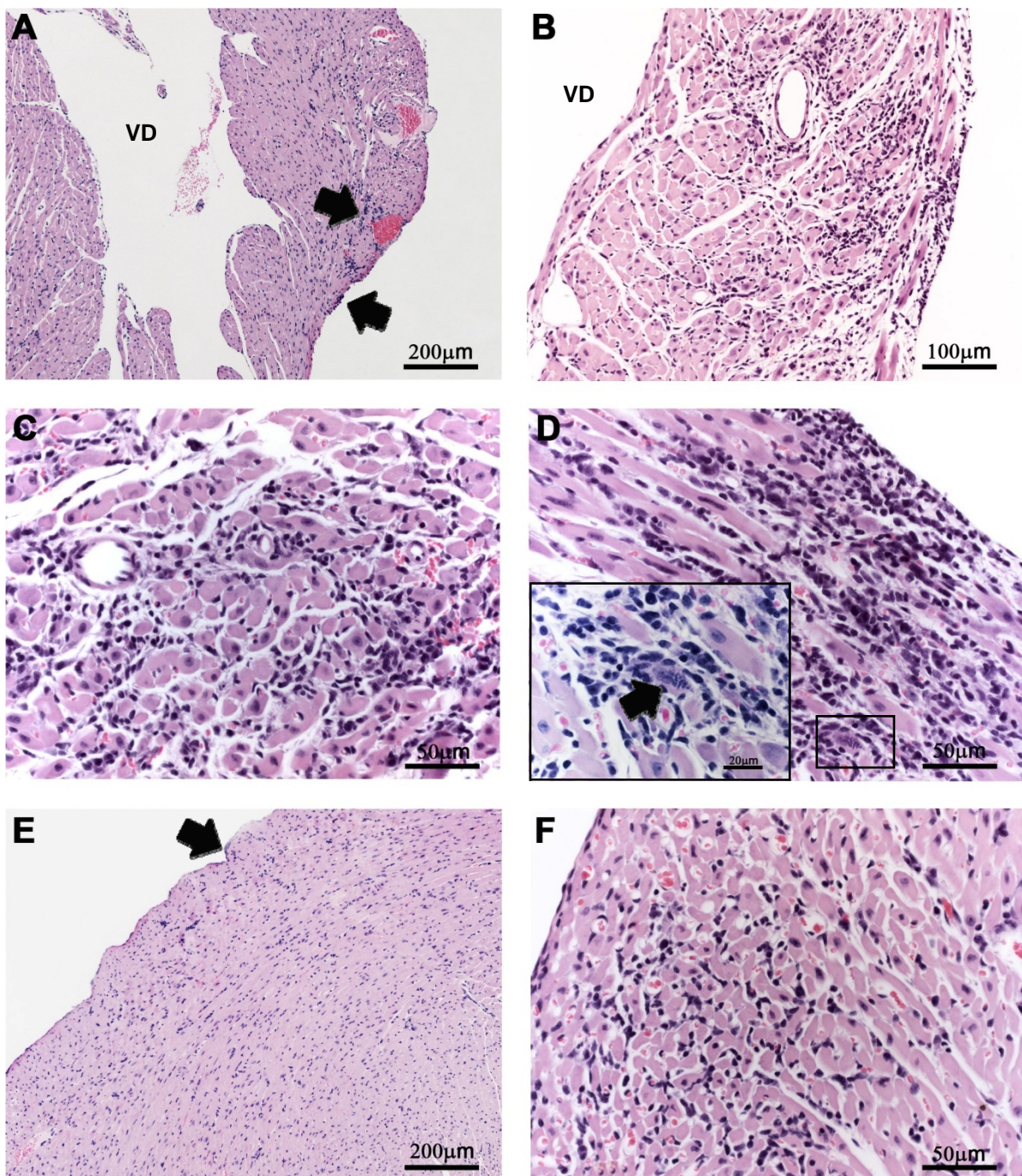


Figura 5.13 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente 1 hora antes da infecção. (A) Ventriculo direito (VD) com foco de infiltrado inflamatório perivascular e subpericárdico (setas). **(B, C)** Infiltrados inflamatórios intersticiais difusos em ventriculo direito (VD). **(D)** Infiltrado inflamatório subpericárdico no ventriculo direito. Seta indicando ninho de amastigota. **(E)** Pequeno foco de infiltrado inflamatório subpericárdico no ventriculo esquerdo. **(F)** Infiltrado inflamatório intersticial difuso no ventriculo esquerdo. Coloração: HE.

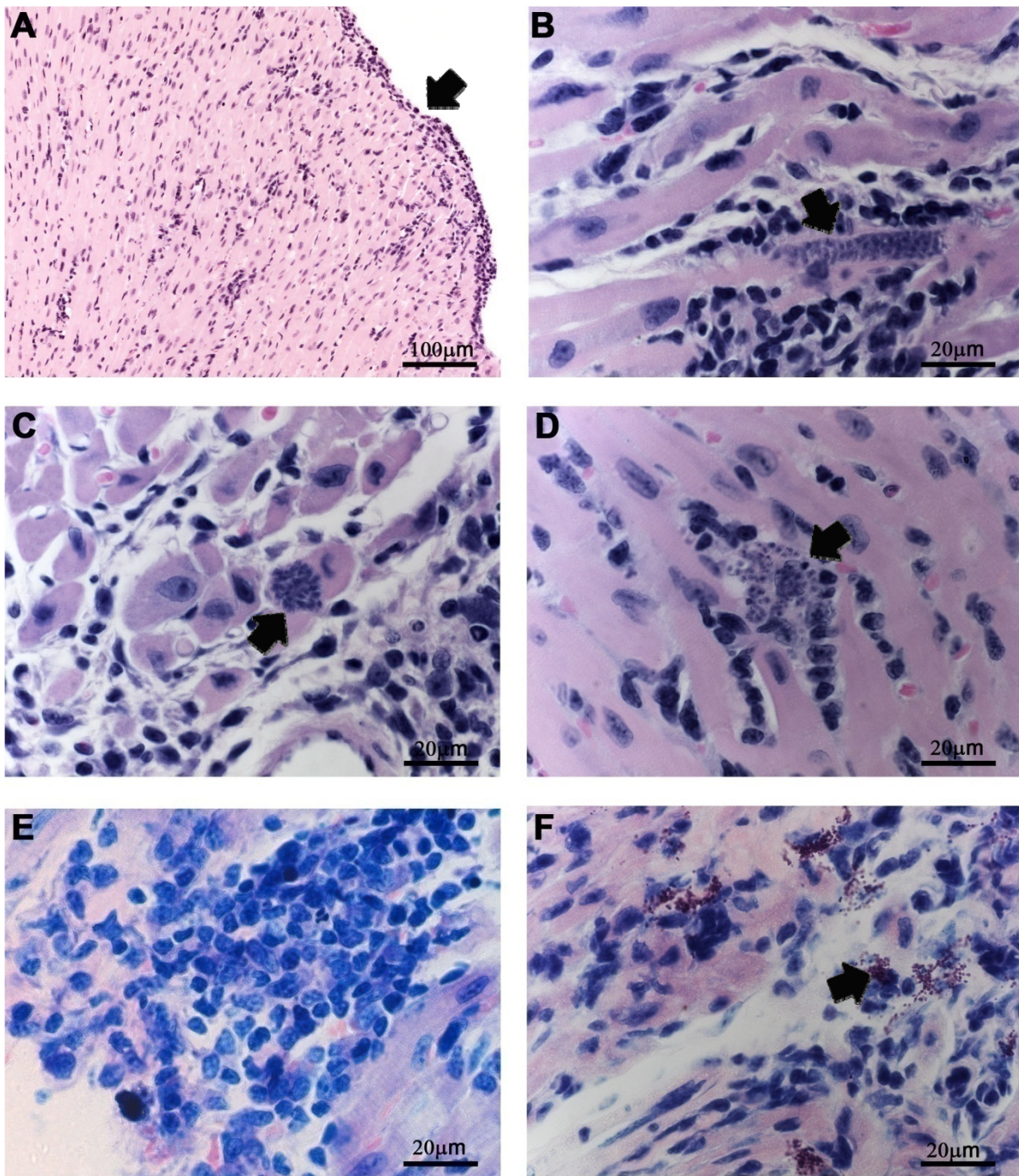


Figura 5.14 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente 1 hora antes da infecção. **(A)** Ventrículo esquerdo com foco de infiltrado inflamatório subpericárdico. **(B-D)** Ninhos de formas amastigotas em ventrículo direito. **(E)** Infiltrado inflamatório intersticial na transição átrio-ventricular. **(F)** Infiltrado inflamatório intersticial difuso junto às válvulas na região atrial, com presença de mastócitos degranulados (seta). Colorações: HE (A-D); Giemsa de Lennert (E e F).

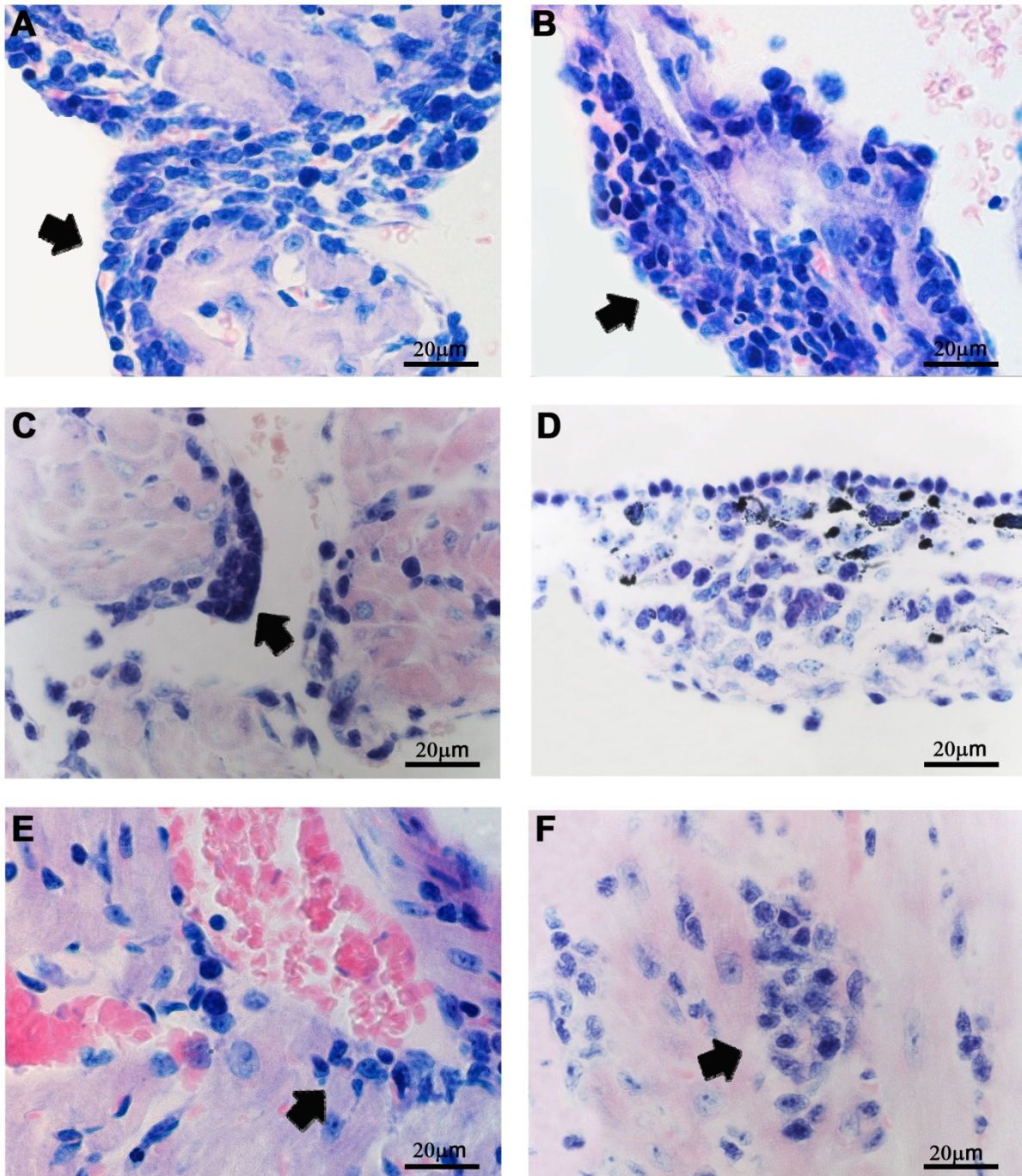


Figura 5.15 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente 1 hora antes da infecção. (A-C) Átrio com infiltrado inflamatório subendocárdico (seta). (D) Comprometimento de válvula cardíaca. (E) Infiltrado inflamatório perivascular no ventrículo direito. (F) Infiltrado inflamatório intersticial focal no ventrículo esquerdo. Coloração: Giemsa de Lennert.

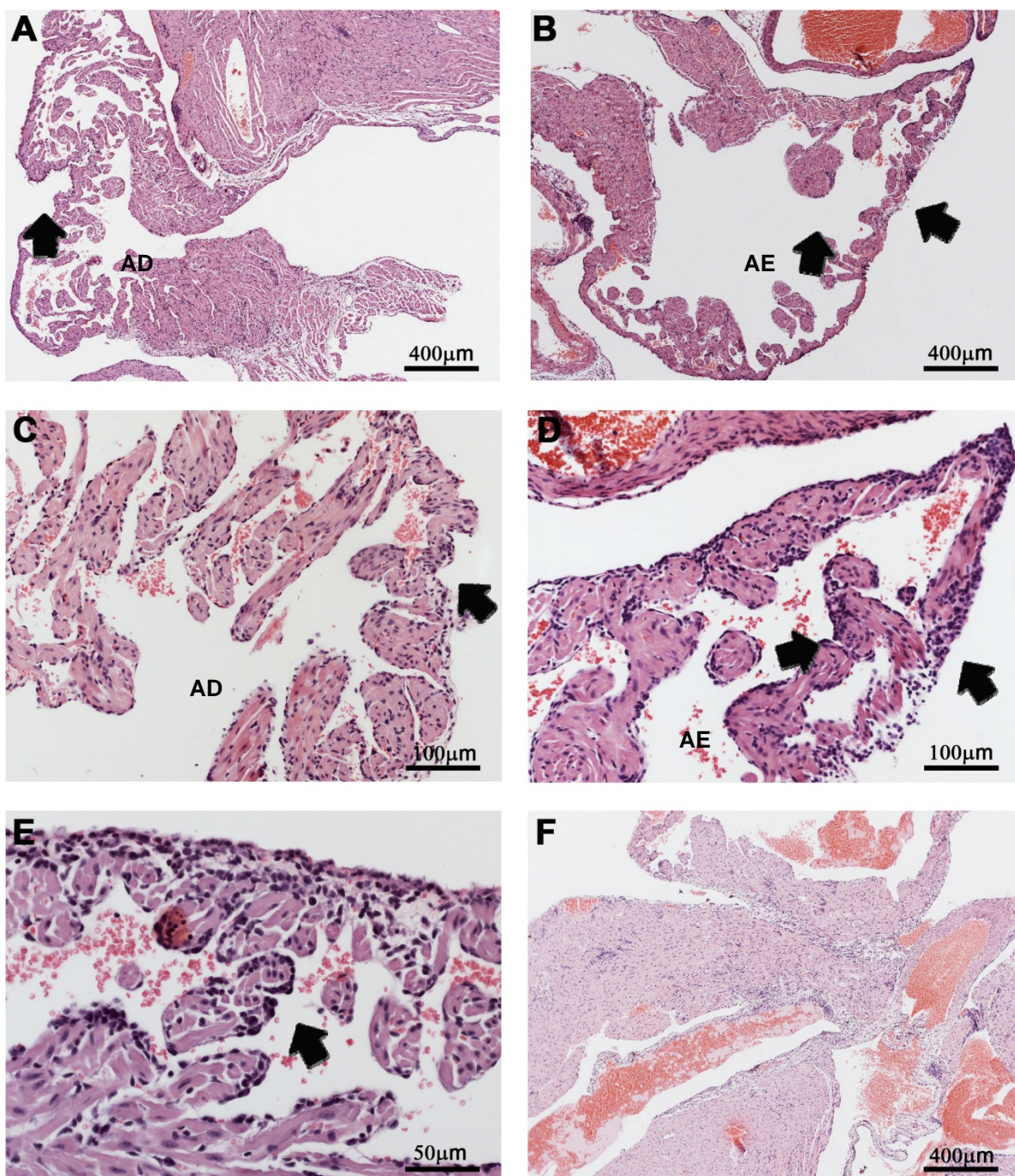


Figura 5.16 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente e, 100µg/Kg de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A) Visão panorâmica do átrio direito (AD) com infiltrado inflamatório focal subpericárdico. (B) Visão panorâmica do átrio esquerdo (AE) com focos de infiltrado inflamatório subpericárdico e subendocárdico (setas). (C) Átrio direito (AD) com infiltrado inflamatório subpericárdico. (D) Átrio esquerdo (AE) com infiltrados inflamatórios subpericárdico e subendocárdico (setas). (E) Infiltrado inflamatório focal subendocárdico. (F) Visão panorâmica da região de transição átrio-ventrículo com infiltrado inflamatório difuso. Coloração: HE.

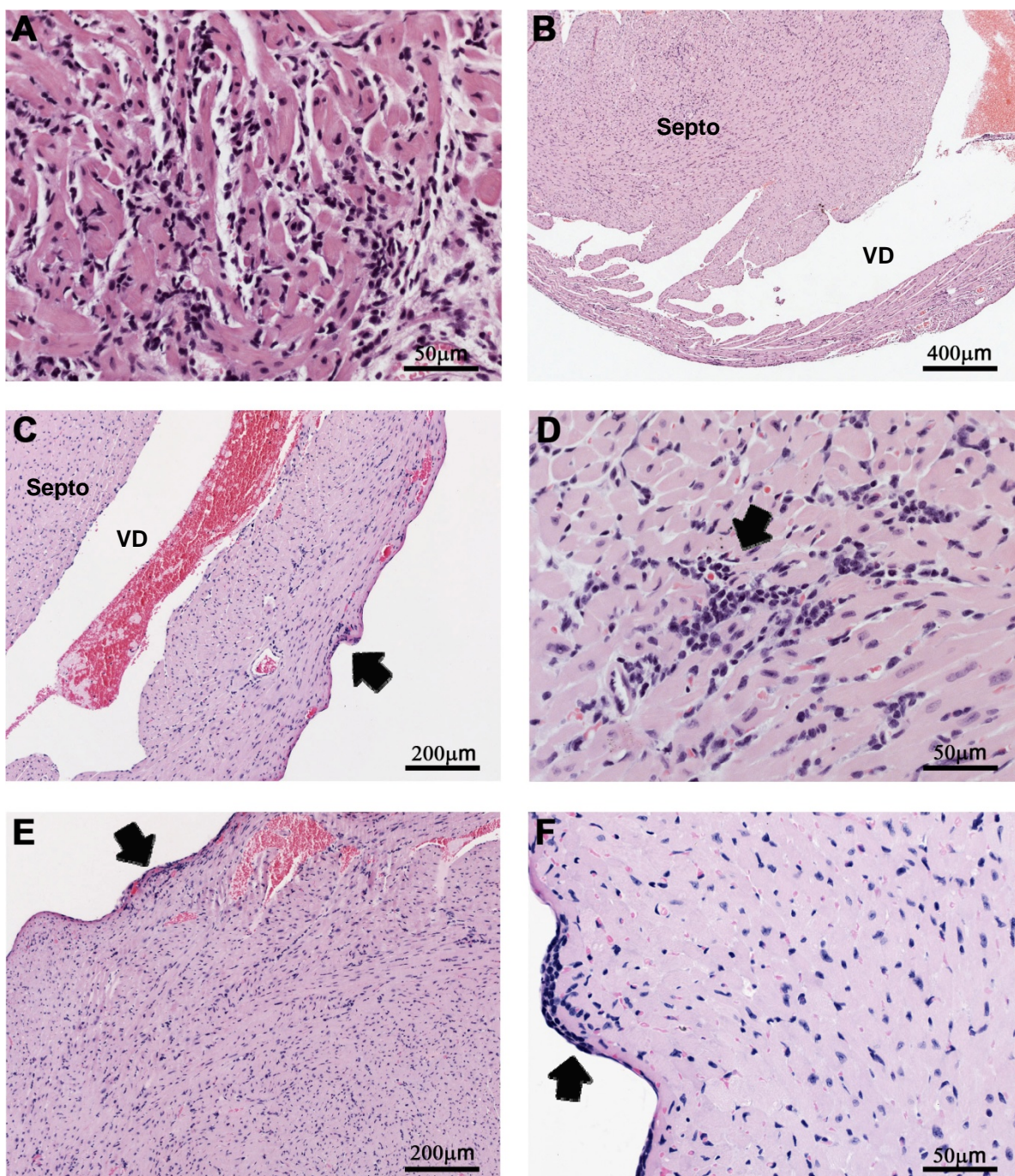


Figura 5.17 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente e, 100µg/Kg de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A) Transição átrio-ventricular com infiltrado inflamatório intersticial difuso. (B) Visão panorâmica do ventrículo direito (VD) e septo. (C) Ventrículo direito (VD) em maior aumento. Seta indicando infiltrado inflamatório subpericárdico. (D) Ventrículo direito com infiltrado inflamatório intersticial. (E) Ventrículo esquerdo com infiltrado inflamatório focal subpericárdico. (F) Infiltrado focal subpericárdico no ventrículo esquerdo. Coloração: HE.

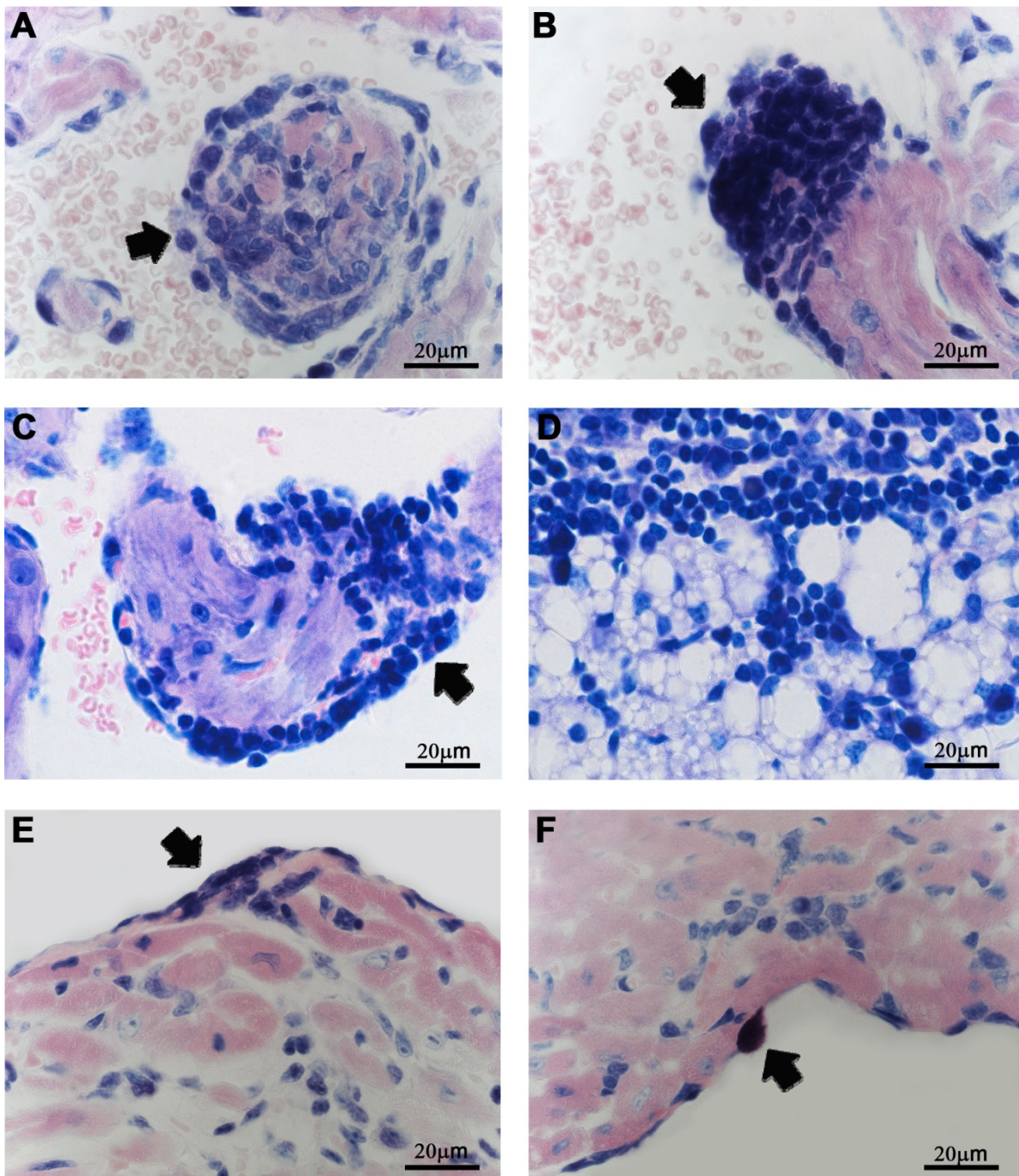


Figura 5.18 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente e, 100µg/Kg de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A-C) Átrio com infiltrado inflamatório subendocárdico. (D) Adensamento linfóide no tecido adiposo macro e micro goticular próximo ao átrio. (E) Ventrículo direito com infiltrado inflamatório focal subpericárdico. (F) Mastócito degranulado no ventrículo esquerdo. Coloração: Giemsa de Lennert.

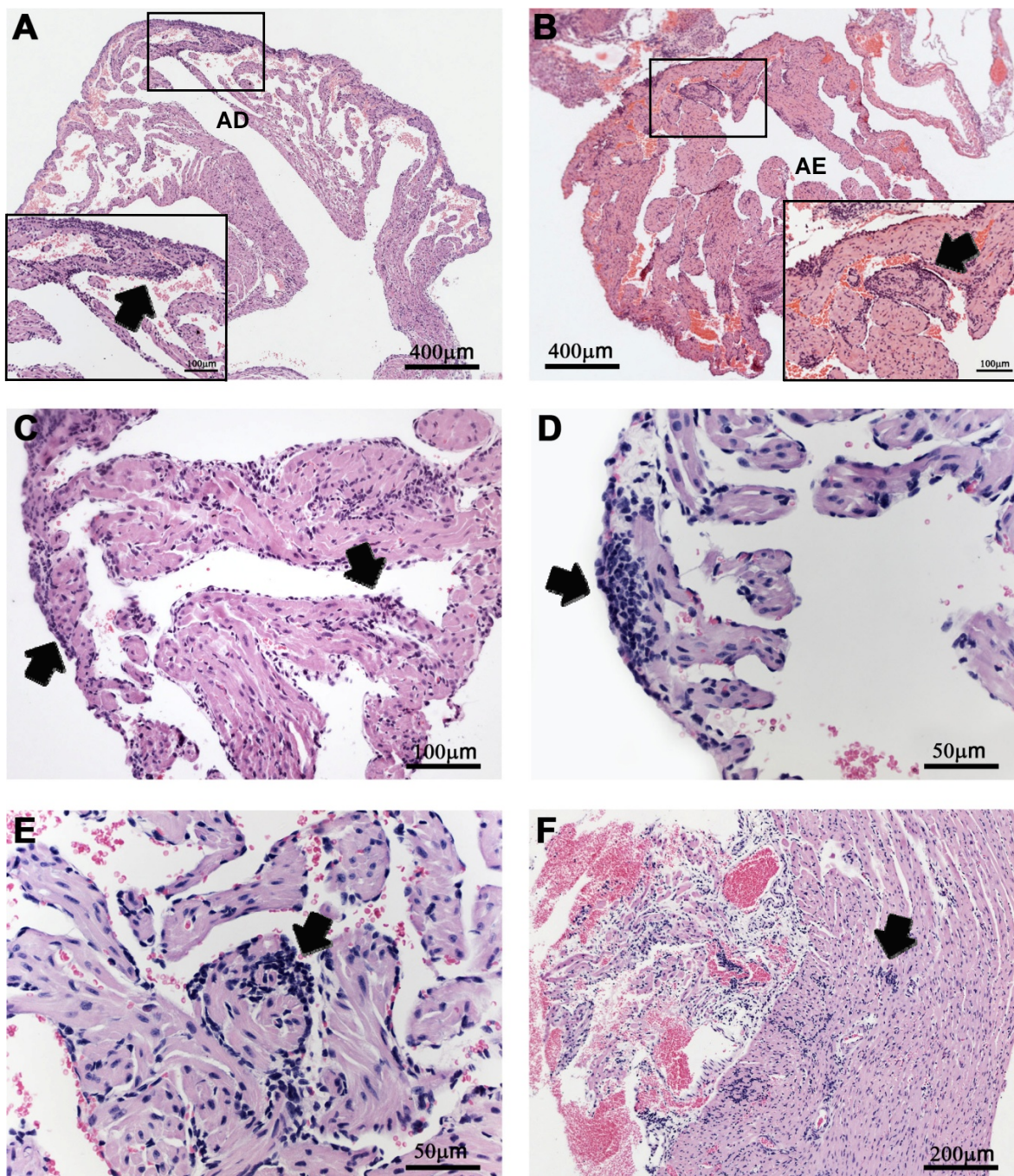


Figura 5.19 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com $100\mu\text{g}/\text{Kg}$ de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A) Visão panorâmica do átrio direito (AD) com maior aumento de região com infiltrado inflamatório subendocárdico. (B) Visão panorâmica do atrio esquerdo (AE) com maior aumento de região com infiltrado inflamatório subendocárdico. (C) Átrio esquerdo com infiltrado inflamatório subendocárdico e subpericárdico (setas). (D) Átrio direito com foco inflamatório subpericárdico. (E) Átrio esquerdo com infiltrado inflamatório subendocárdico. (F) Região de transição átrio-ventricular com infiltrado inflamatório difuso com adensamentos focais (seta). Coloração: HE.

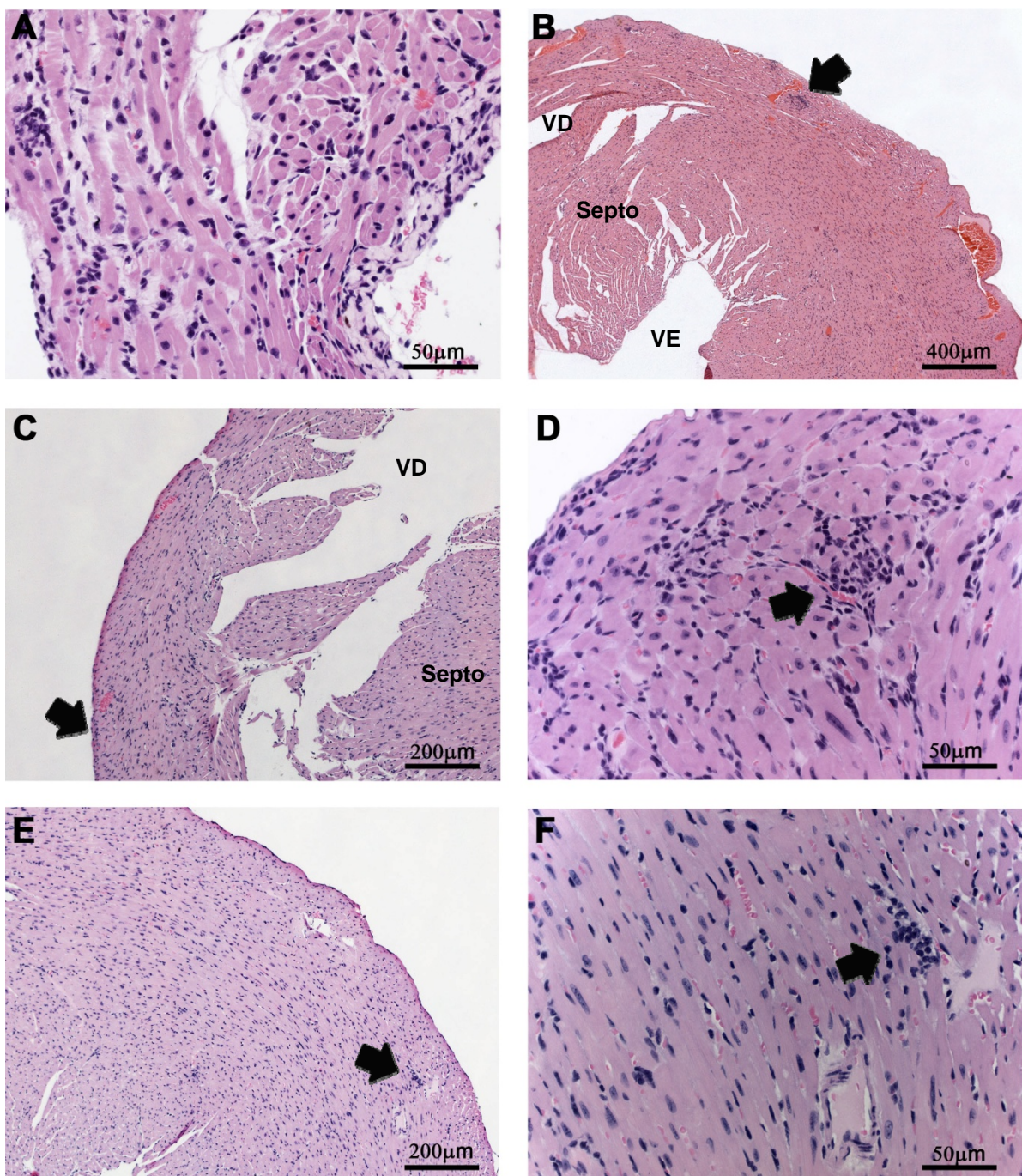


Figura 5.20 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com $100\mu\text{g/Kg}$ de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A) Região de transição átrio-ventricular com infiltrado inflamatório difuso. (B) Visão panorâmica do ventrículo direito (VD), septo e ventrículo esquerdo (VE). Seta indicando infiltrado inflamatório focal intersticial. (C) Ventrículo direito com infiltrado inflamatório subpericárdico. (D) Ventrículo direito com infiltrado inflamatório focal perivascular. (E, F) Ventrículo esquerdo com pequenos focos de infiltrado inflamatório intersticiais. Coloração: HE.

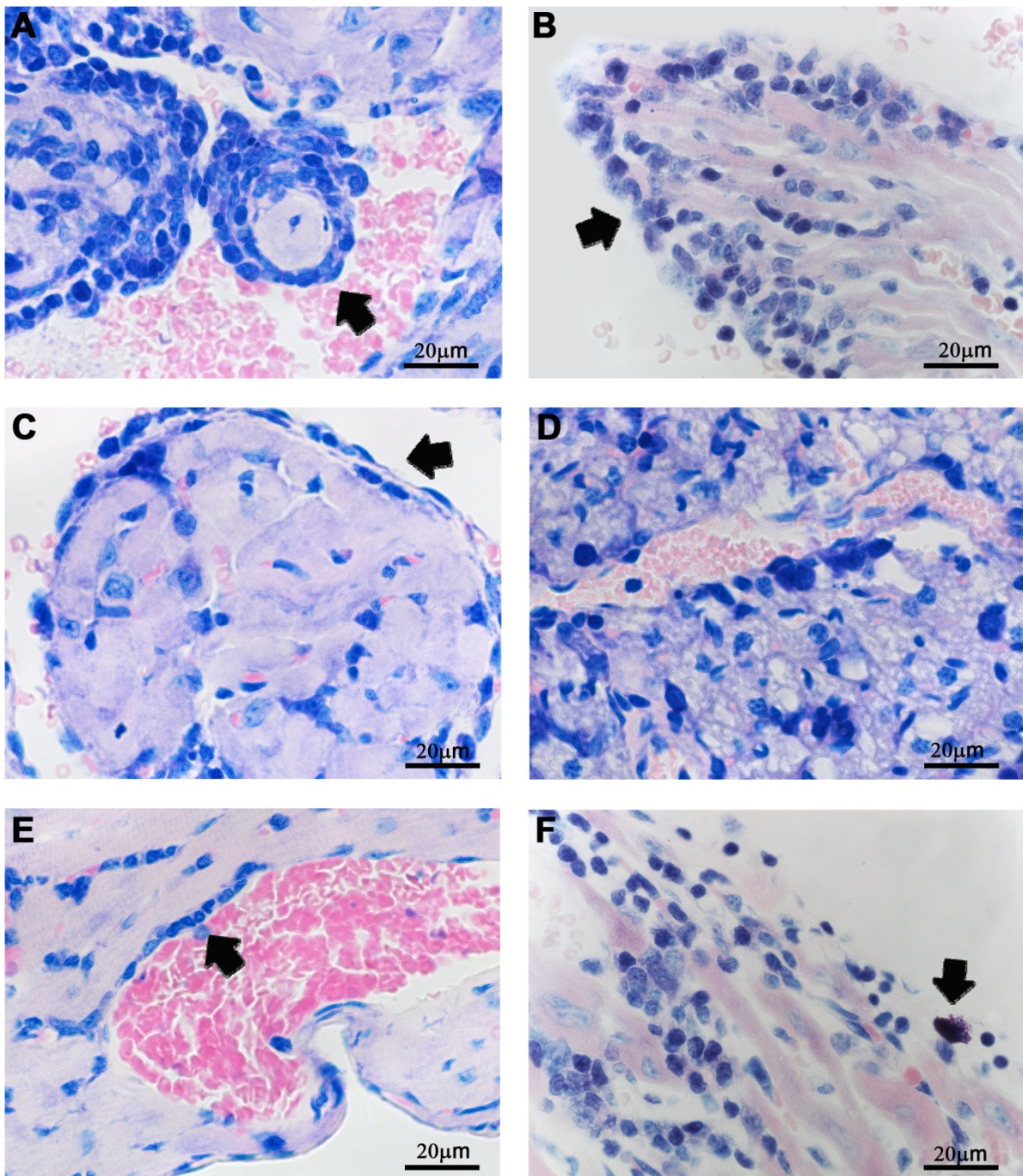


Figura 5.21 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com $100\mu\text{g}/\text{Kg}$ de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A-C) Região atrial com infiltrado inflamatório subendocárdico. (D) Infiltrado inflamatório junto ao tecido adiposo micro e macro gótico. (E) Ventriculo direito com infiltrado inflamatório perivascular. (F) Ventriculo esquerdo com infiltrado inflamatório subpericárdico. Seta indicando mastócito degranulado. Coloração: Giemsa de Lennert.

5.3.2 Composição e intensidade da Fibrose.

Nas análises das colorações de Picosírius convencional e para microscopia confocal (PMA-PRS), Reticulina de Gomori, Tricromática de Masson e Resorcina-Fucsina (com e sem pré-oxidação) descrevemos os principais componentes da fibrose cardíaca, durante a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Além disso, avaliamos a intensidade da fibrose cardíaca nos animais infectados, tratados ou não.

5.3.2.1 Picosírius modificado para microscopia confocal (PMA-PRS).

Pela coloração de PMA-PRS foi observado nos corações obtidos de animais controles, ausência de fibrose em todas as câmaras cardíacas, compatível com padrão esperado em órgãos normais (figuras 4.22 A-C). Em animais infectados, no entanto, foi verificado aumento na deposição de colágeno quando comparados aos corações obtidos de animais controles (figuras 4.22 D-F). A região atrial apresentou deposição subpericárdica e endocárdica de colágeno (figura 4.22 D), enquanto os ventrículos apresentaram padrão de deposição de colágeno ao longo das fibras cardíacas (figuras 4.22 E e F)

Corações de animais infectados e tratados com captopril, submetidos à mesma coloração, quando comparados aos corações obtidos de animais infectados, apresentaram diminuição na deposição de colágeno (figuras 4.23 A-C). A região atrial apresentou depósitos de colágeno, formando emaranhados delgados, nas regiões subpericárdica e subendocárdica (figura 4.23 A), enquanto que, no ventrículo direito, observamos espessamento nas fibras de colágeno (figura 4.23 B). Porém, o ventrículo direito dos corações obtidos de animais infectados não-tratados, apresentou maior espessamento das fibras de colágeno, quando comparados aos animais infectados e tratados com captopril (figura 4.22 E). No ventrículo esquerdo desses animais observamos poucas fibras de colágeno ao longo das fibras musculares (figura 4.23 F).

Nos corações dos animais infectados tratados com captopril + HOE-140, o PMA-PRS mostrou diminuição nos depósitos de colágeno quando comparados aos animais infectados e também aos infectados e tratados com captopril (figuras 4.23 D-F). A região atrial apresentava discretos depósitos de colágeno, formando fibras delgadas,

nas regiões subpericárdica e endocárdica (figura 4.23 D). Os ventrículos direito e esquerdo apresentavam poucos depósitos de colágeno, formando fibrilas, ao longo do tecido (figuras 4.23 E e F).

As análises por microscopia confocal dos preparados histológicos corados por PMA-PRS, revelaram ainda que os animais infectados e tratados com HOE-140 apresentaram diminuição de depósitos de colágeno, em todo o órgão, quando comparados aos animais infectados não-tratados (figuras 4.24 A-C; 4.22 D-F). A região atrial apresentava pouquíssimas fibras colágenas, localizadas nas áreas subpericárdica e endocárdica (figura 4.24 A). Os ventrículos direito e esquerdo apresentaram depósitos de colágeno, formando fibras delgadas, distribuídas ao longo das fibras cardíacas (figuras 4.24 B e C).

Os dados obtidos com a coloração Picosírius convencional não apresentaram diferenças em relação à coloração para microscopia confocal, PMA-PRS (dado não mostrado).

5.3.2.2 Reticulina de Gomori.

Os corações obtidos de animais controles, impregnados pela prata pela técnica de Reticulina de Gomori, mostrou distribuição uniforme das fibras reticulares e colagênicas, ao longo do órgão, compatíveis com padrões de normalidade esperado para esse órgão (figuras 4.25 A-D). Na região atrial foi observado distribuição subendocárdica e subpericárdica no átrio esquerdo e pequena distribuição supericárdica no átrio direito, mostrando um maior adensamento do átrio esquerdo quando comparado ao átrio direito (figuras 4.25 A e B). Os ventrículos direito e esquerdo apresentaram distribuição intersticial uniforme das fibras reticulares e colagênicas (figuras 4.25 C e D).

O padrão de distribuição das fibras reticulares e colagênicas aumentou com a infecção, quando comparados aos animais controles (Figura 4.26 A-D). Na região atrial foi observado espessamento das fibras reticulares e colagênicas, com distribuição subendocárdica e subpericárdica, em ambos os átrios direito e esquerdo. Porém, observamos que se mantém o padrão de maior espessamento do átrio esquerdo em relação à direita, como visto nos corações de animais controles (figuras 4.26 A e B). Os

ventrículos direito e esquerdo acompanham o padrão de aumento das fibras reticulares e colagênicas, após a infecção, observado nos átrios (figuras 4.26 C e D).

O tratamento com captopril não levou a aumento das fibras reticulares e colagênicas quando comparados aos animais infectados não-tratados (figuras 4.27 A-D). Porém, o átrio esquerdo apresentou leve aumento das fibras reticulares e colagênicas quando comparado ao átrio esquerdo do coração de animais infectados não-tratados (figura 4.27 B). Assim, embora haja aumento nas fibras reticulares e colagênicas quando comparado aos animais controles, mantém-se o padrão observado nos animais infectados não-tratados.

Os animais infectados e tratados com captopril + HOE-140 apresentaram distribuição e, expressão de fibras reticulares e colagênicas, no coração, similar ao encontrado nos animais infectados não-tratados (figuras 4.28 A-D). As regiões auriculares e ventriculares apresentaram aumento na expressão de fibras reticulares e colagênicas, quando comparado aos animais controles (figuras 4.28 A-D).

Os animais infectados e tratados com HOE-140 apresentaram aumento nas fibras reticulares e colagênicas do coração, quando comparados aos animais controles (figuras 4.29 A-D). A região atrial não apresentou modulações na expressão de fibras reticulares e colagênicas, quando comparado aos animais infectados não-tratados (figuras 4.29 A e B). Porém, o ventrículo direito apresentou diminuição nas fibras reticulares e colagênicas, quando comparado ao ventrículo direito do coração de animais infectados não-tratados. Entretanto, não foram observadas diferenças significativas na expressão de fibras reticulares e colagênicas, no ventrículo esquerdo desses animais, quando comparados aos animais infectados não-tratados (fig 4.29 C-D).

Nossas análises indicam que o sistema de cininas não influencia a deposição de fibras reticulares e colagênicas do coração, após a infecção experimental pelo *T. cruzi*.

5.3.2.3 Tricromática de Masson.

A coloração por Tricromática de Masson exibiu padrão semelhante ao observado pela coloração de PMA-PRS em cada grupo experimental, sugerindo que o principal

componente do processo de fibrose cardíaca nesses animais é o colágeno (dado não mostrado).

5.3.2.4 Resorcina-Fucsina não-oxidada.

Os corações obtidos de animais controles apresentaram presença de fibras elásticas na região supericárdica atrial e ventricular e, ao redor dos vasos sanguíneos (figuras 4.30 A-F). No átrio esquerdo foi observada na região subendocárdica a presença de fibras elásticas (figuras 4.30 A-C).

Os animais infectados não-tratados apresentaram padrões diferentes nas regiões atrial e ventricular. A região atrial apresentou aumento nas fibras elásticas desses animais, quando comparados aos animais controles (figuras 4.31 A-D). Por outro lado, os ventrículos direito e esquerdo não apresentaram diferenças significativas em relação à expressão de fibras elásticas, nesses animais, quando comparado aos animais controles (figuras 4.31 E e F).

Os animais infectados e tratados com captopril apresentaram aumento significativo na expressão de fibras elásticas, quando comparado aos animais infectados não-tratados, somente na região atrial esquerda (figura 4.32 A e B). Já, a região atrial direita apresenta aumento na expressão de fibras elásticas quando comparado aos animais controles, sem alterações significativas em relação aos animais infectados não-tratados (4.32 C). Não foram observadas diferenças significativas nas regiões ventriculares desses animais, quando comparados aos animais controles (dado não mostrado).

Os animais infectados e tratados com captopril + HOE-140 apresentaram padrão de expressão de fibras elásticas, similar aos animais infectados e tratados com captopril (figuras 4.32 D-F).

Os animais infectados e tratados com HOE-140 apresentaram leve diminuição na expressão de fibras elásticas, quando comparado aos animais infectados não-tratados. Porém, ainda apresentam aumento na expressão das fibras elásticas quando comparado aos animais controles (figuras 4.33 A-C).

Nossos dados sugerem que após a infecção experimental pelo *T. cruzi* ocorre aumento na expressão de fibras elásticas, na região auricular. Porém, o tratamento com

captopril e captopril + HOE-140 levou ainda ao maior aumento dessas fibras elásticas, nessa região. Esse efeito foi revertido com o tratamento apenas com HOE-140.

A coloração por resorcina-fucsina oxidada não apresentou diferenças aos resultados obtidos com resorcina-fucsina não-oxidada (dado não mostrado).

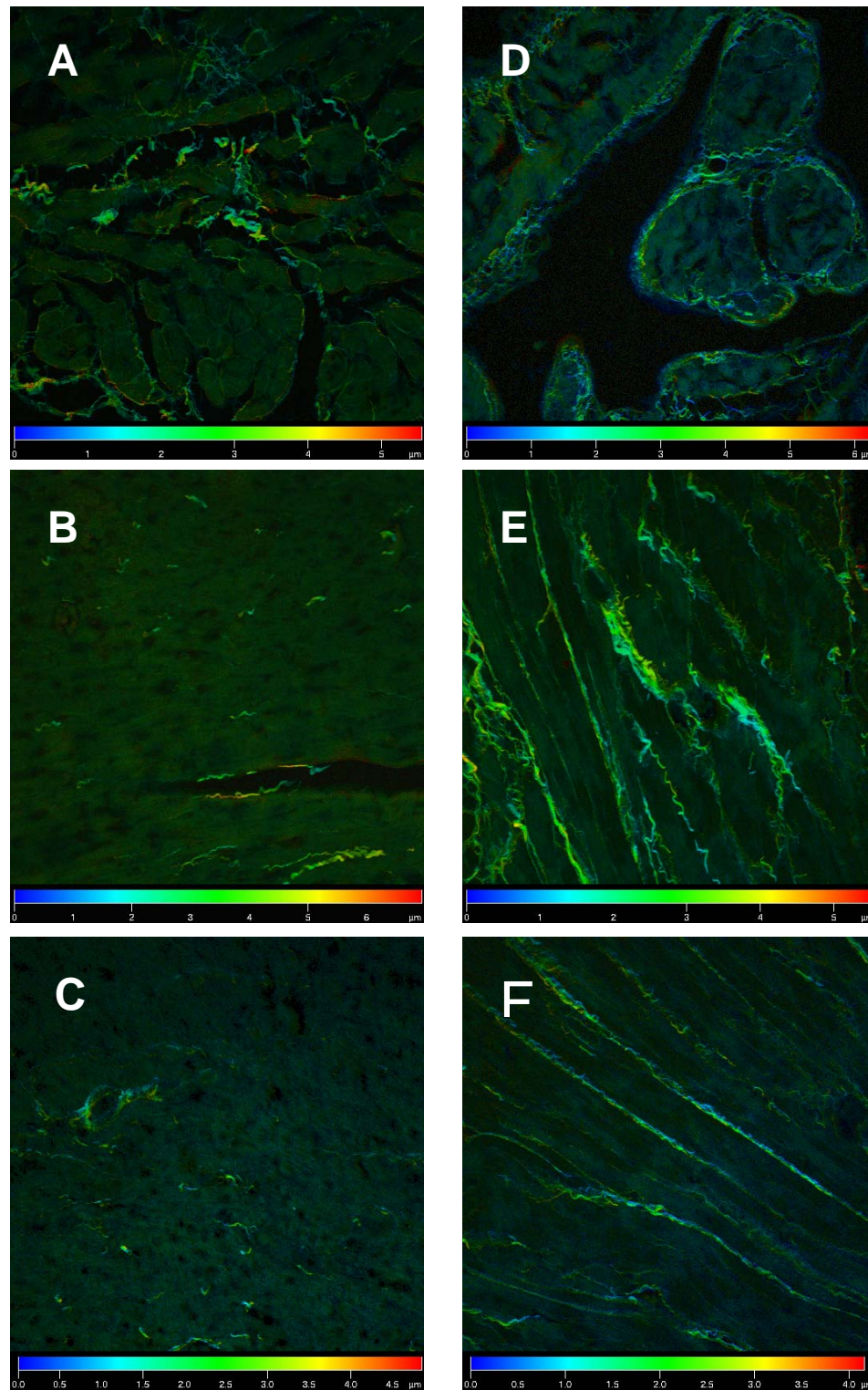


Figura 5.22 – Corações de animais controles e infectados s/c, com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. Os animais foram previamente tratados com diferentes drogas, 1 hora antes da infecção. (A-C) camundongos controles. (D-F) camundongos infectados. (A e D) Região auricular. (B e E) ventrículo direito. (C e F), ventrículo esquerdo. Coloração: PMA-PRS.

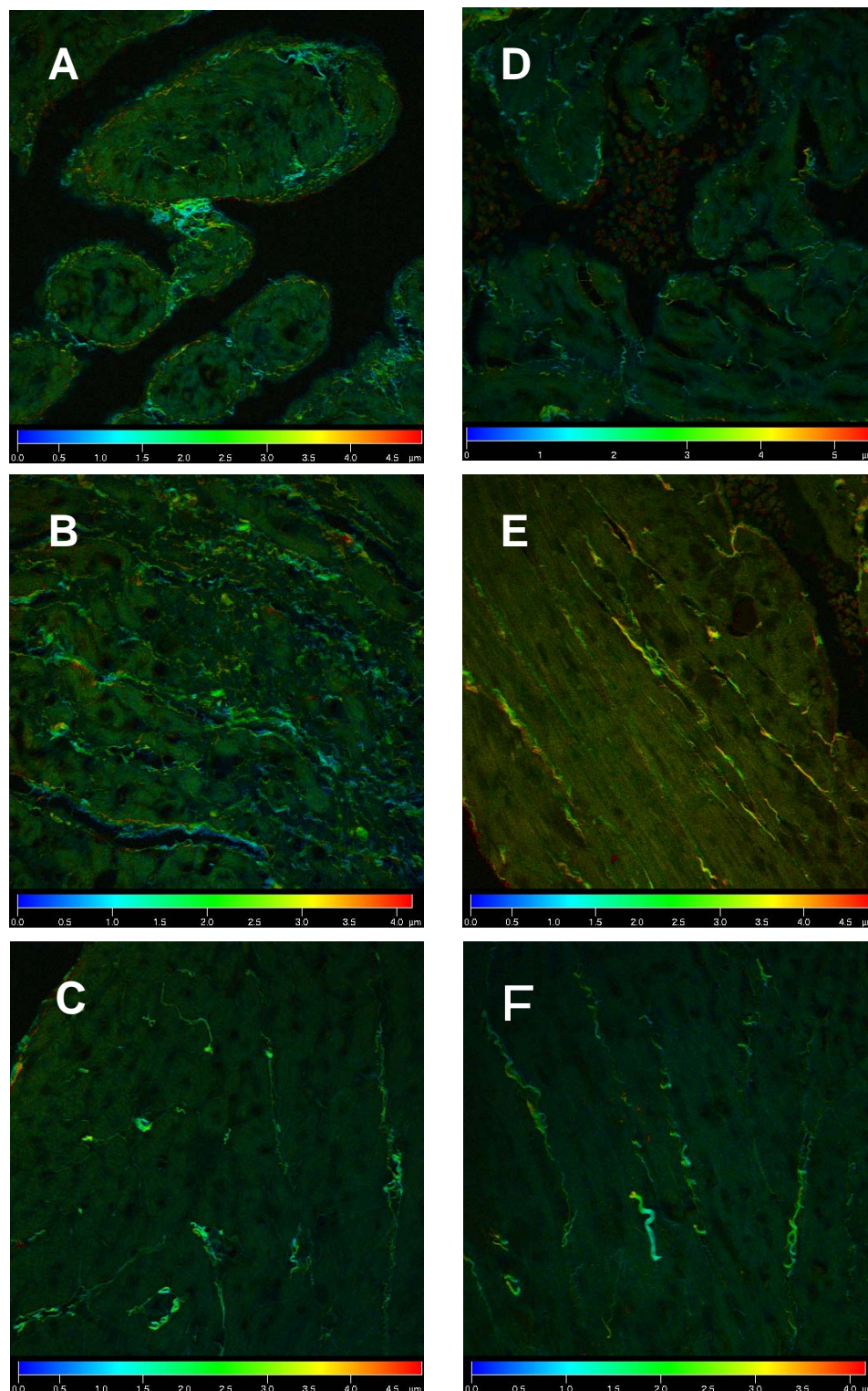


Figura 5.23 – Corações de animais infectados s/c, com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. Os animais foram previamente tratados com diferentes drogas, 1 hora antes da infecção. (A-C) camundongos tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente. (D-F) camundongos tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente e, 100µg/Kg de HOE-140, subcutaneamente. (A e D) região auricular. (B e E) ventrículo direito. (C e F) ventrículo esquerdo. Coloração: PMA-PRS.

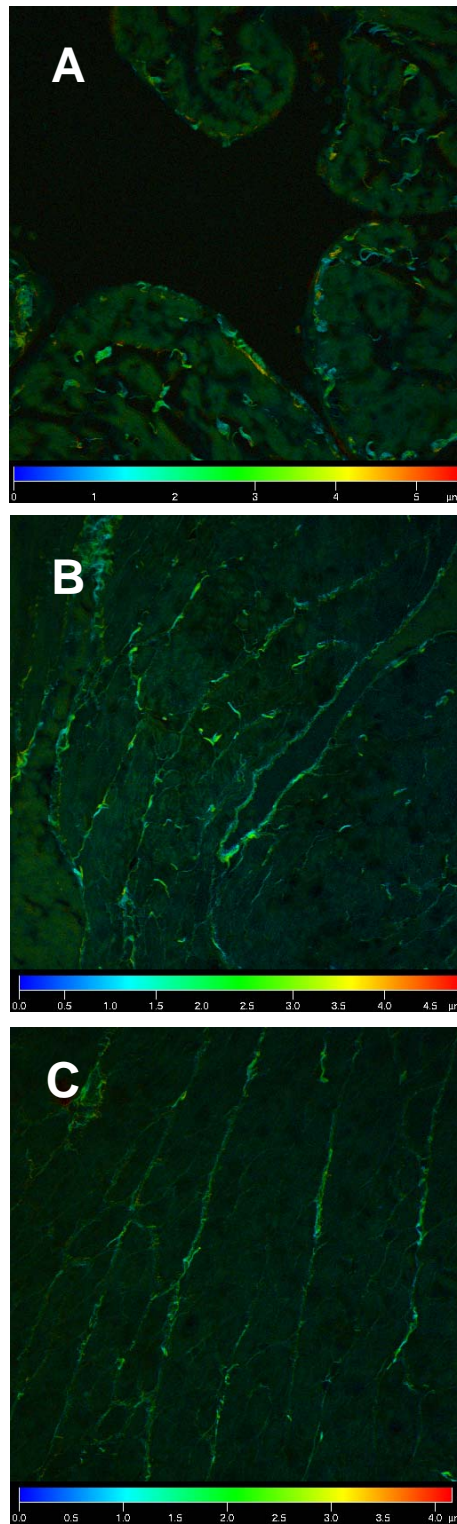


Figura 5.23 – Corações de animais infectados s/c, com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. Os animais foram previamente tratados com diferentes drogas, 1 hora antes da infecção. (A-C) camundongos tratados com 100µg/Kg de HOE-140, subcutaneamente. (A) região auricular. (B) ventrículo direito. (C) ventrículo esquerdo. Coloração: PMA-PRS.

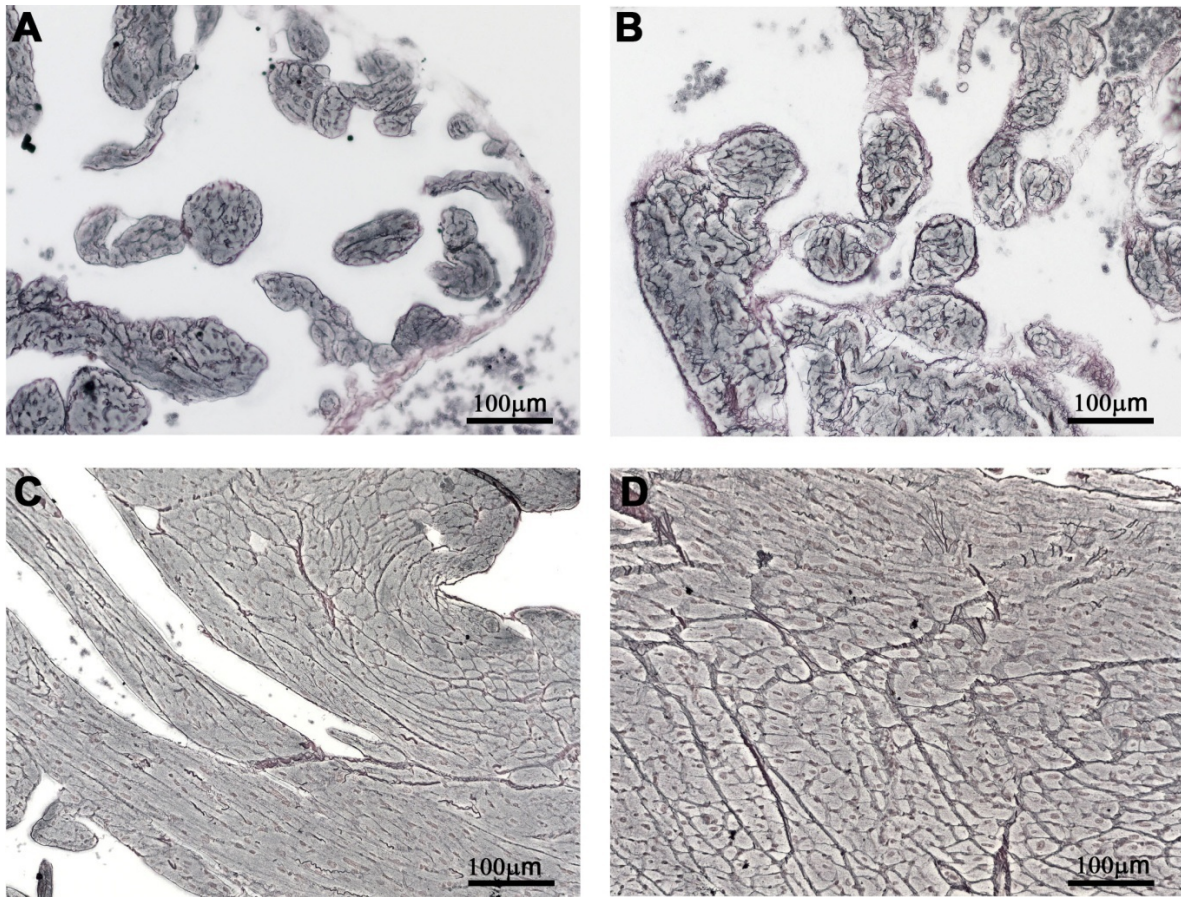


Figura 5.25 – Corações de camundongos C57BL-6 do grupo controle com 9-10 semanas de vida. Padrão normal de: (A) Átrio direito. (B) Átrio esquerdo. (C) Ventrículo direito. (D) Ventrículo esquerdo. Impregnação pela prata.

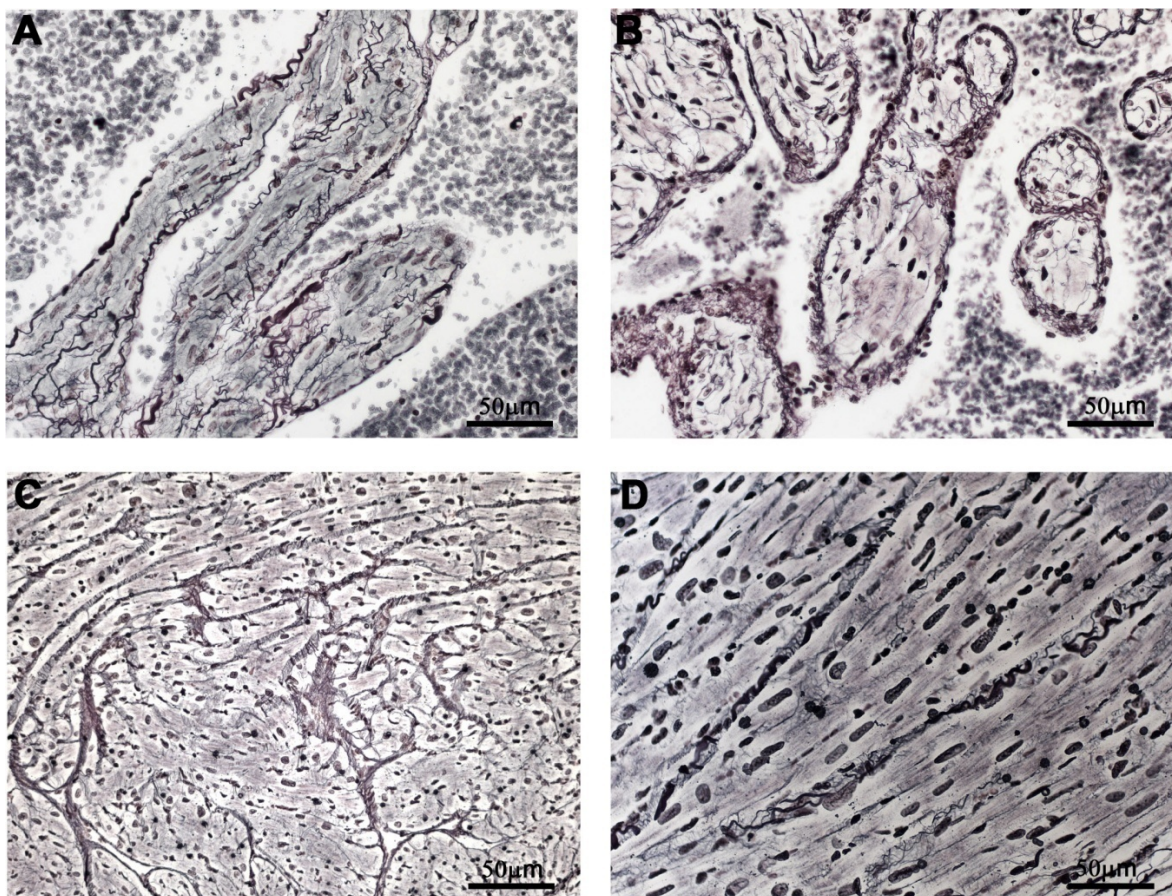


Figura 5.26 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c). (A) Átrio direito com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (B) Átrio esquerdo com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (C) Ventrículo direito com fibras reticulares intersticiais. (D) Ventrículo esquerdo com fibras reticulares intersticiais. Impregnação pela prata.

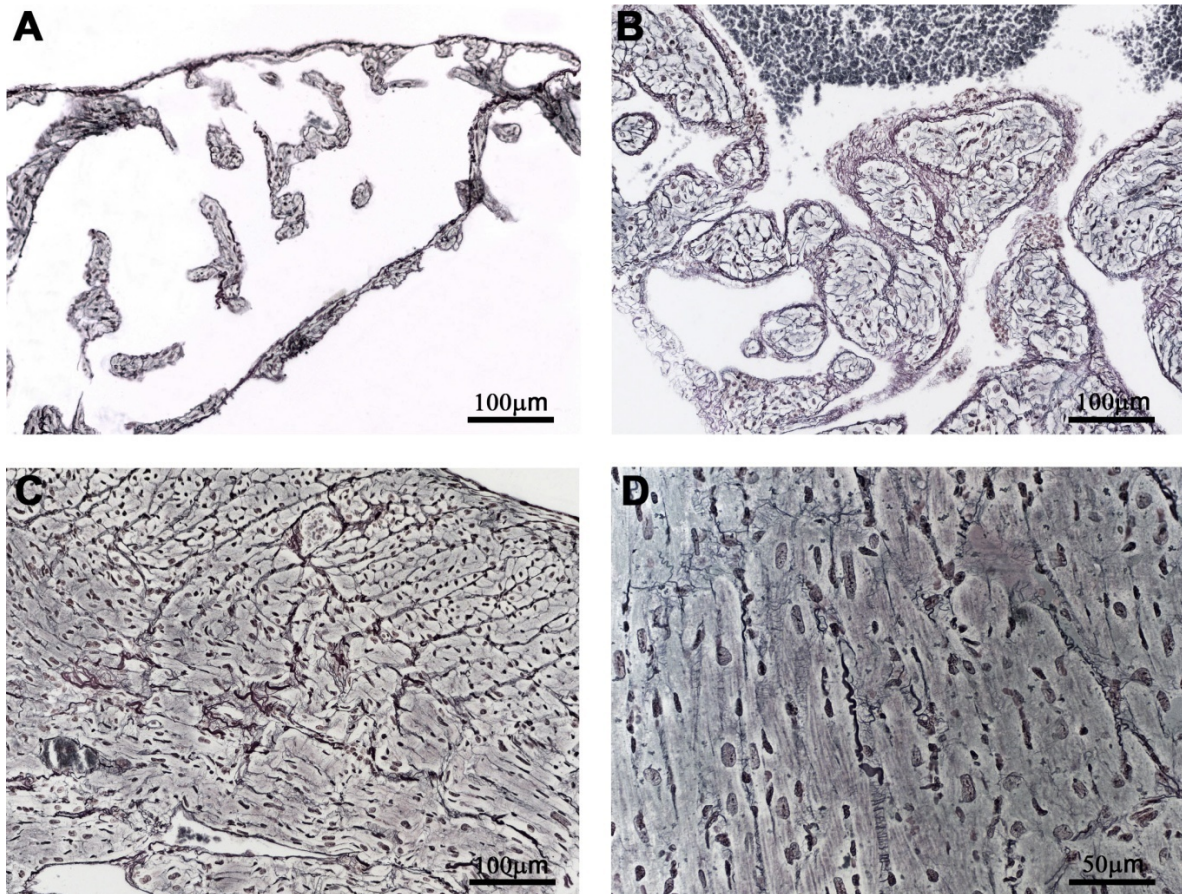


Figura 5.27 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente 1 hora antes da infecção. (A) Átrio direito com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (B) Átrio esquerdo com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (C) Ventrículo direito com fibras reticulares intersticiais. (D) Ventrículo esquerdo com fibras reticulares intersticiais. Impregnação pela prata.

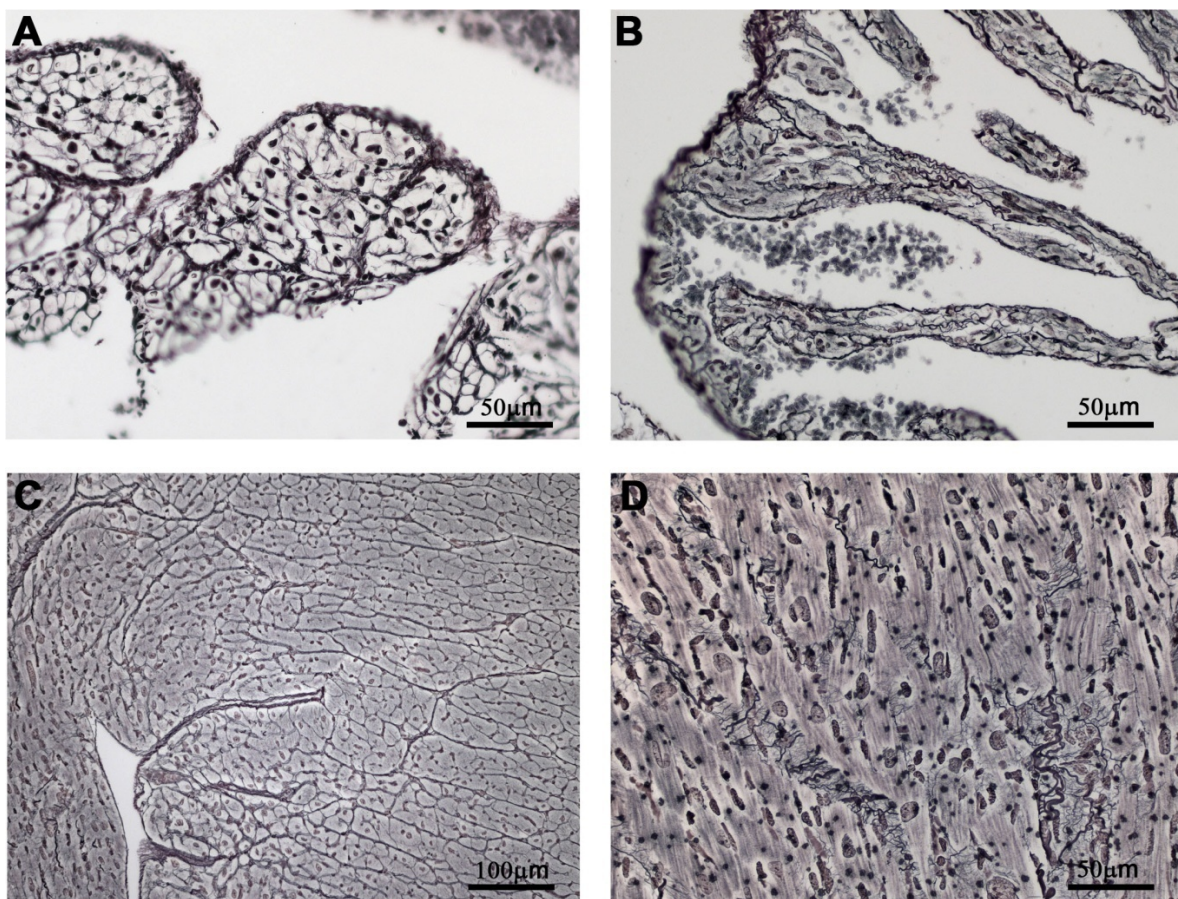


Figura 5.28 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com 10mg/Kg de Captopril, intra-peritonealmente e, $100\mu\text{g/Kg}$ de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A) Átrio direito com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (B) Átrio esquerdo com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (C) Ventrículo direito com fibras reticulares intersticiais delgadas. (D) Ventrículo esquerdo com fibras reticulares intersticiais. Impregnação pela prata.

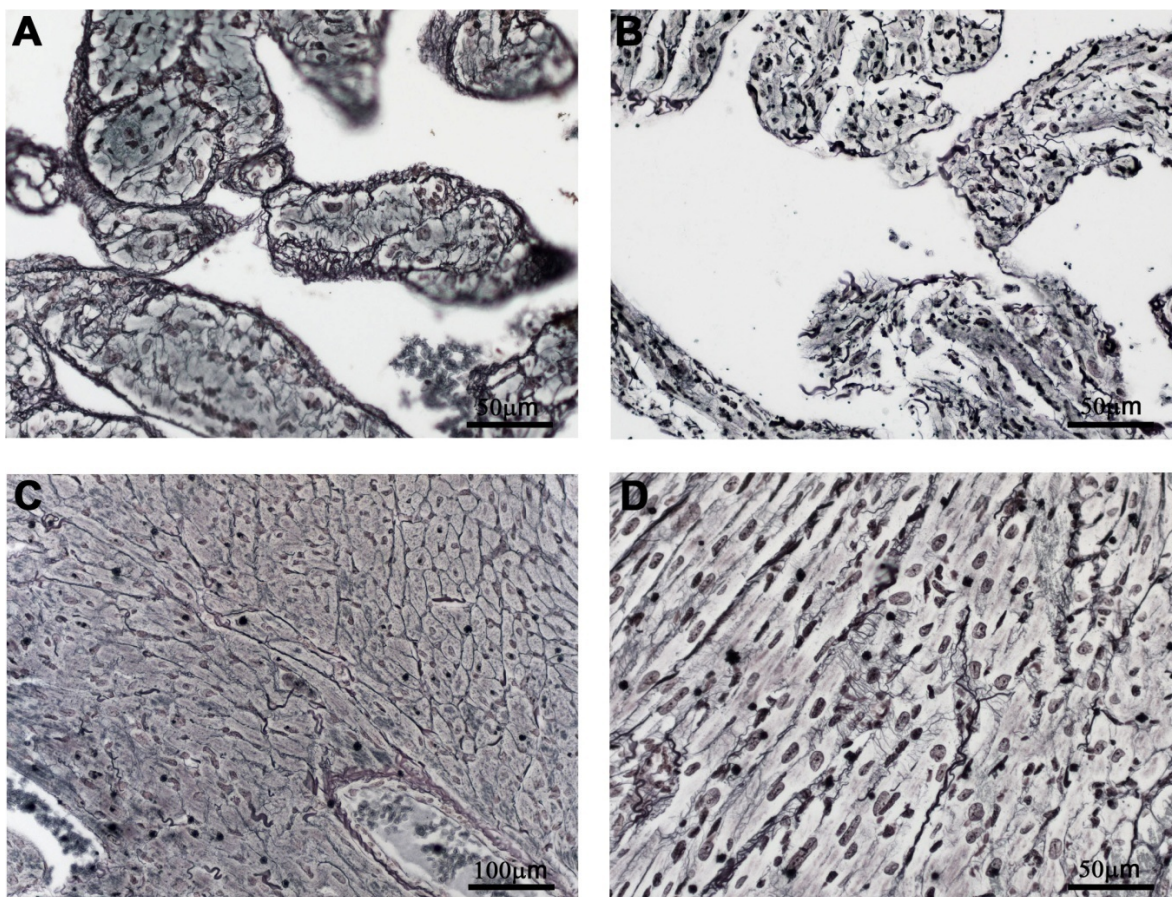


Figura 5.29 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com $100\mu\text{g}/\text{Kg}$ de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A) Átrio direito com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (B) Átrio esquerdo com deposição subendocárdica das fibras reticulares. (C) Ventrículo direito com fibras reticulares intersticiais delgadas. (D) Ventrículo esquerdo com fibras reticulares intersticiais. Impregnação pela prata.

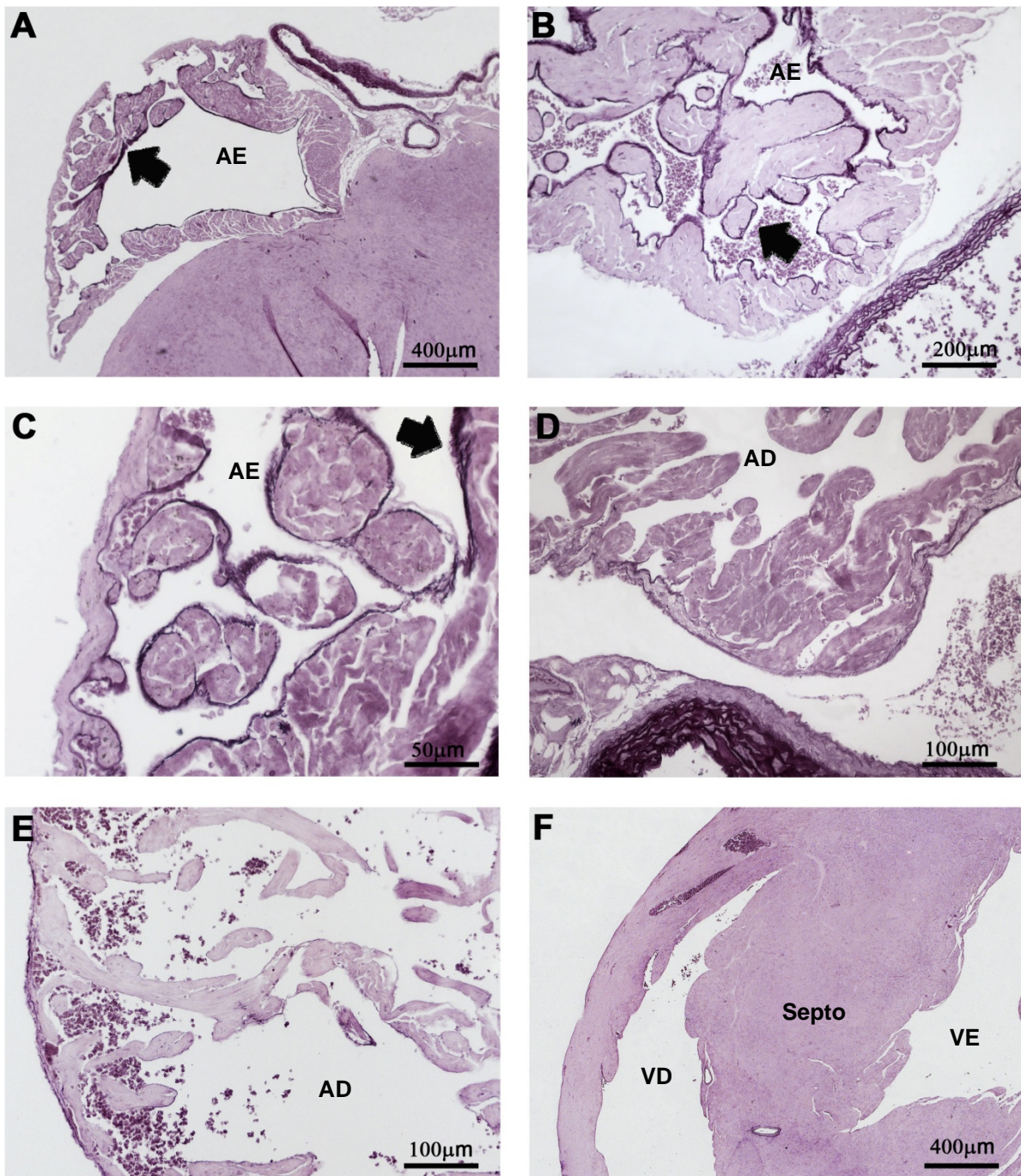


Figura 5.30 – Corações de camundongos C57BL-6 do grupo controle com 9-10 semanas de vida. Padrão normal de: (A-C) Átrio esquerdo (AE) com elástica na região subendocárdica (seta). (D, E) Átrio direito (AD) sem elástica. (F) Visão panorâmica do ventrículo direito (VD), septo e ventrículo esquerdo (VE). Coloração: Resorcina-Fucsina.

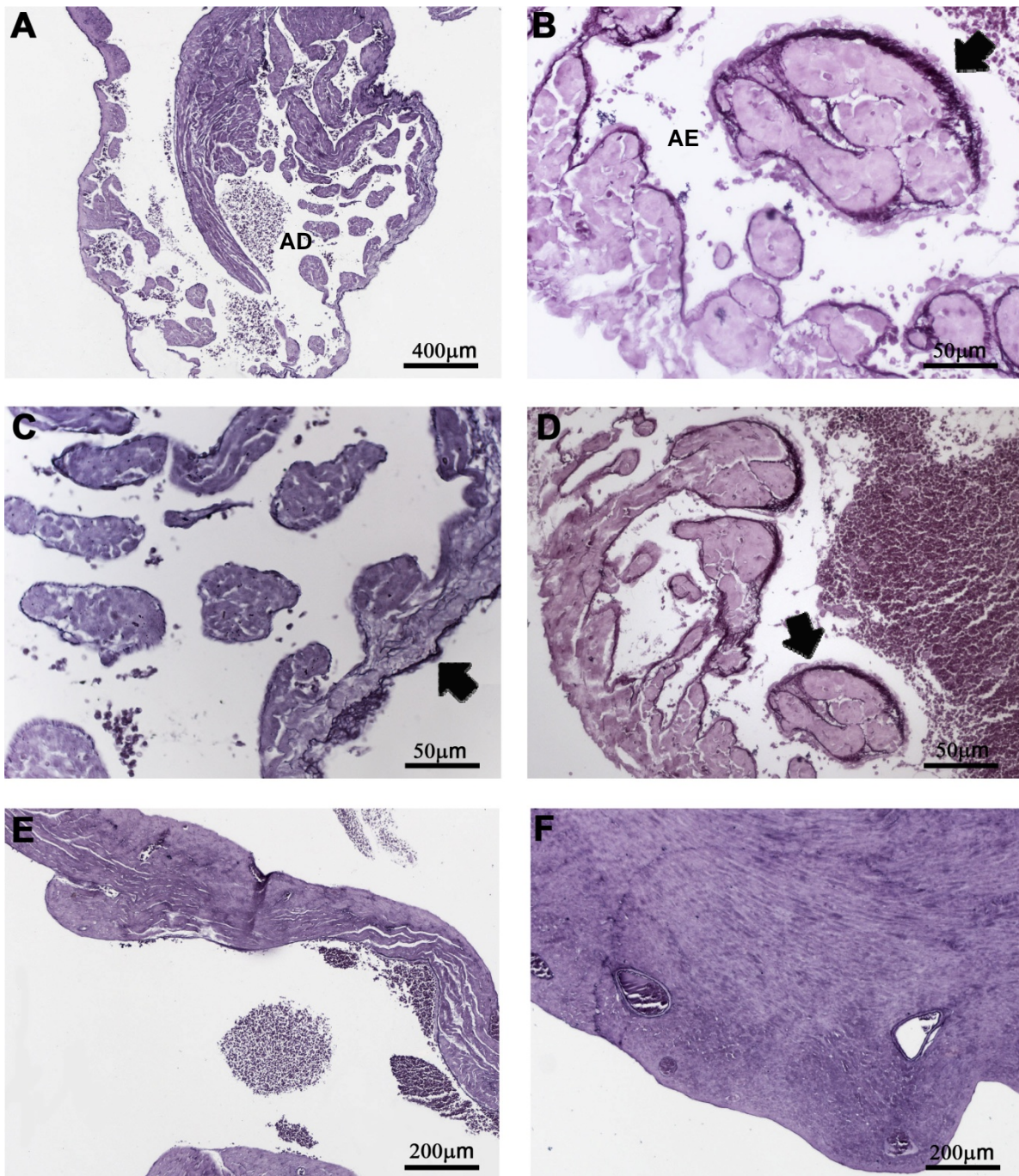


Figura 5.31 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c). (A) Visão panorâmica do atrio direito (AD) sem elástica. (B) Átrio esquerdo (AE) com elástica na região subendocárdica (seta). (C) Átrio direito com fibras elásticas subpericárdicas. (D) Átrio esquerdo com fibras elásticas na região subendocárdica (seta). (E) Ventrículo direito. (F) Ventrículo esquerdo. Coloração: Resorcina-Fucsina.

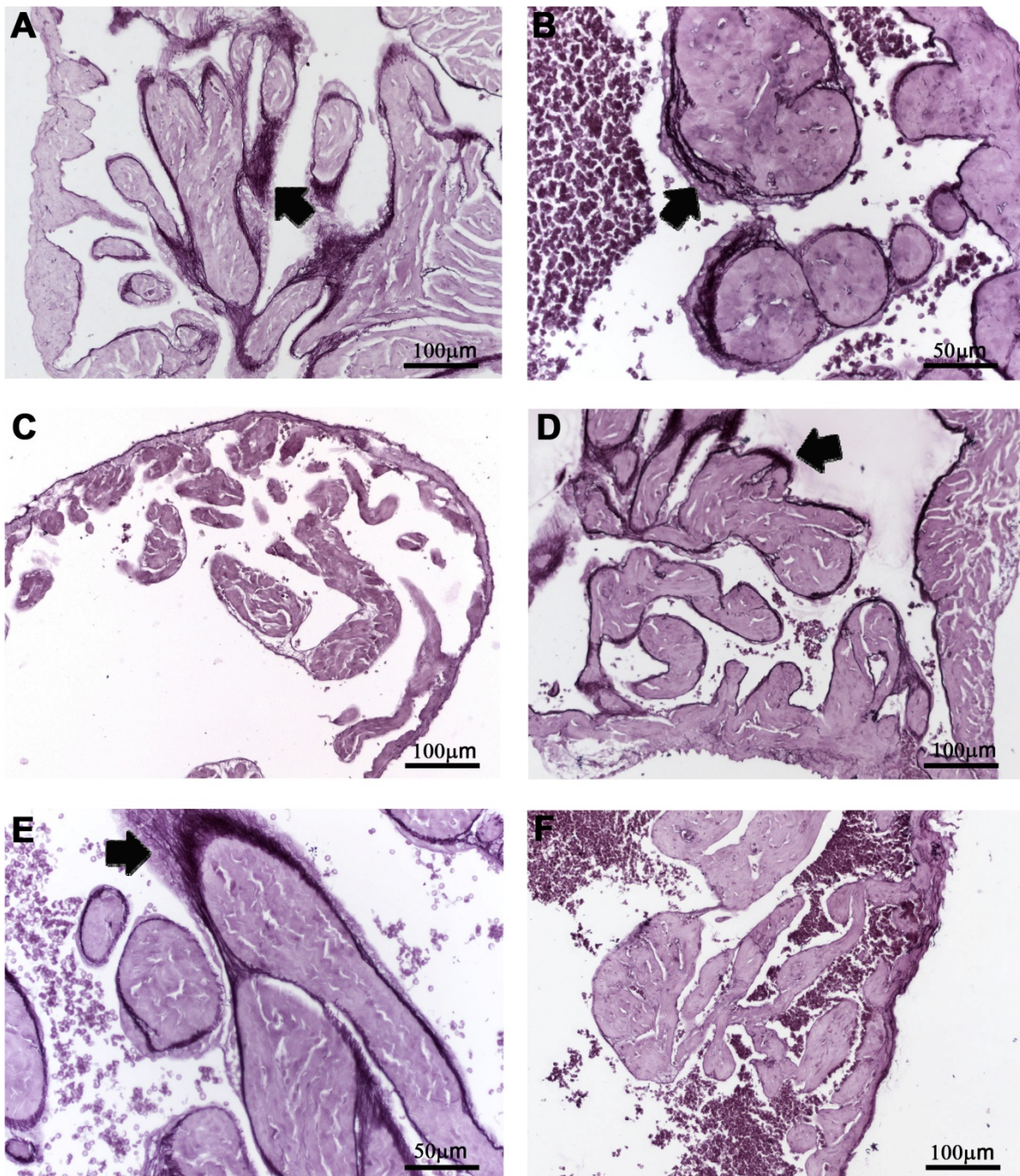


Figura 5.32 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), tratados com 10mg/Kg de Captopril (A-C), intra-peritonealmente, ou 100µg/Kg de HOE-140 (D-F), subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A) Átrio esquerdo com fibras elásticas subendocárdicas. (B) Átrio esquerdo com desdobramento da elástica. (C) Átrio direito sem fibras elásticas. (D, E) Átrio esquerdo com fibras elásticas subendocárdicas. (F) Átrio direito sem elástica. Coloração: Resorcina-Fucsina.

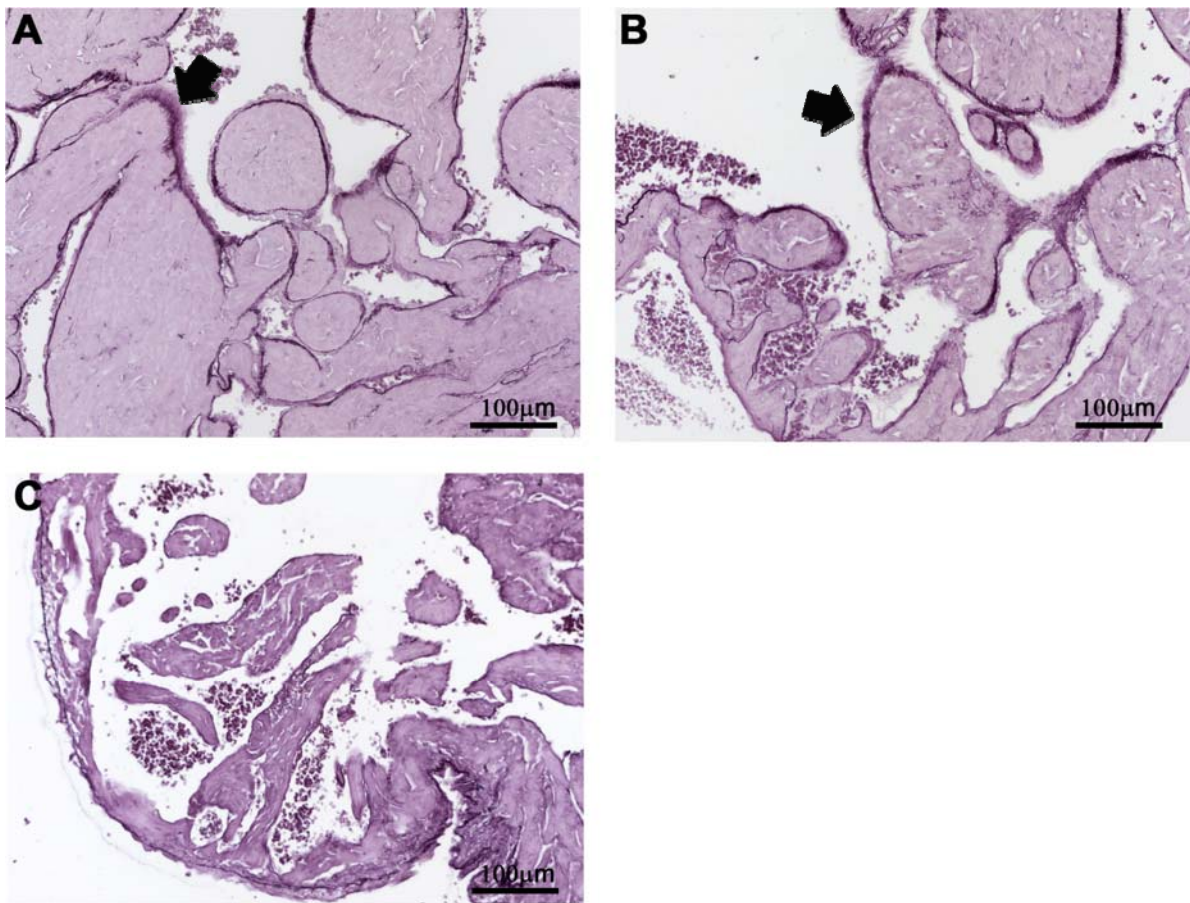


Figura 5.33 – Corações de camundongos C57BL-6 com 30 dias de infecção, infectados com 10^6 TCTs/animal (cepa Dm28c), e tratados com $100\mu\text{g}/\text{Kg}$ de HOE-140, subcutaneamente, 1 hora antes da infecção. (A, B) Átrio esquerdo com fibras elásticas subendocárdicas. (C) Átrio direito sem fibras elásticas. Coloração: Resorcina-Fucsina.

5.4 Expressão de galectina-3 e MEC no coração.

Galectina-3 é uma proteína animal que liga açúcares β -galactosídeos e possui especificidade a lactosaminas. Devido a sua habilidade em reconhecer açúcares presentes em proteínas, liga-se com alta especificidade a moléculas de MEC como LN e FN e receptores β -integrinas. Recentemente foi demonstrado que o *T. cruzi* utiliza gal-3 como ponte de interação com LN, para infectar novas células (Moody *et al*, 2000). Além disso, gal-3 é um dos fatores que modulam a infecção de cardiomiócitos pelo *T. cruzi* (Kleshchenko *et al*, 2004). Nossos dados demonstram que gal-3 está presente nas regiões ventriculares e atriais do coração (figura 4.34 A). A distribuição de gal-3 no coração é similar à observada em moléculas de MEC (figura 4.34 A). Corações obtidos de animais infectados tratados ou não apresentam aumento na presença de gal-3 quando comparados aos corações obtidos de animais controles (figura 4.34). Nossos dados demonstram que a infecção experimental pelo *T. cruzi* é capaz de modular positivamente a presença de gal-3 nos corações. Porém, os diversos tratamentos não foram capazes de modular positiva ou negativamente a presença de gal-3 pós-infecção nos corações analisados.

Fibronectina (FN) é uma glicoproteína de MEC, secretada por diferentes tipos celulares entre eles macrófagos e monócitos (Alitalo *et al*, 1980; Johansson *et al*, 1979). Além disso, a secreção de FN pode ser modulada durante processos inflamatórios (Owens & Cirmino, 1982; Pick-Kober *et al*, 1986). FN está relacionada à imigração de células inflamatórias, em respostas a processos infecciosos. Camundongos Swiss Webster infectados intraperitonealmente com *T. cruzi*, cepa Y, demonstraram aumento na expressão de FN em tecidos cardíacos, pós-infecção (Calvet *et al*, 2004). Porém, a utilização da cepa DM28c, não demonstrou qualquer alteração na expressão de FN, em corações obtidos de animais Swiss Webster infectados, durante a fase aguda (Calvet *et al*, 2004). Assim, decidimos investigar em nosso modelo experimental a expressão de fibronectina, em tecidos cardíacos de animais infectados, durante a fase aguda da infecção experimental. Na figura 4.35 A, é mostrado que a expressão de FN no coração de camundongos controles, apresenta-se distribuída, homogeneamente, em todo o órgão. Após a infecção, os corações analisados apresentaram aumento na expressão de FN quando comparados aos corações obtidos de animais controles (figura 4.35 B, C

e E). Entretanto, os animais infectados e tratados com captopril + HOE-140, não apresentaram aumento na expressão de fibronectina quando comparados com animais controles (figura 4.35 D).

A fibrose cardíaca pode ser caracterizada pela modulação na expressão de moléculas de colágeno (Andrade *et al*, 1989; Marino *et al*, 2003). Em nosso trabalho, decidimos investigar possíveis alterações na expressão de moléculas de colágeno em animais infectados tratados ou não. Nossos dados demonstram a presença de colágeno III nas regiões ventriculares e atriais, formando fibras delgadas ao longo de todo o coração (figura 4.36 A). Os corações obtidos de animais infectados apresentaram aumento na expressão de colágeno III, quando comparados aos animais controles (figura 4.36 B-E). Além disso, os animais infectados apresentaram adensamento das fibras de colágeno III e desorganização tecidual (figura 4.36 B). Os tratamentos com captopril e captopril + HOE-140, apresentam aumento na expressão de colágeno III quando comparados aos animais controles, porém esse aumento na expressão de colágeno III é menor quando comparado ao dos animais infectados não-tratados (figura 4.36 C e D). Já o tratamento com HOE-140 aumenta a expressão de colágeno III, com adensamento das fibras, sendo esse efeito semelhante ao observado em animais infectados não-tratados. Entretanto, nesses animais não foi observada uma desorganização tecidual como a que observamos em animais infectados não-tratados (figura 4.36 E).

Laminina (LN) é uma glicoproteína de alto peso molecular formando uma rica rede de MEC, por onde as células migram e aderem. No coração foi demonstrada a importante participação de LN no recrutamento de linfócitos T para o tecido cardíaco de animais infectados com *T. cruzi*, e sua participação na formação do infiltrado inflamatório (Silva-Barbosa *et al*, 1997; Silva-Barbosa & Savino, 2000). Em nossas análises da expressão de LN, observamos que após a infecção, não houve modulação na expressão de LN nos corações obtidos de animais infectados tratados ou não (figura 4.37 A-E).

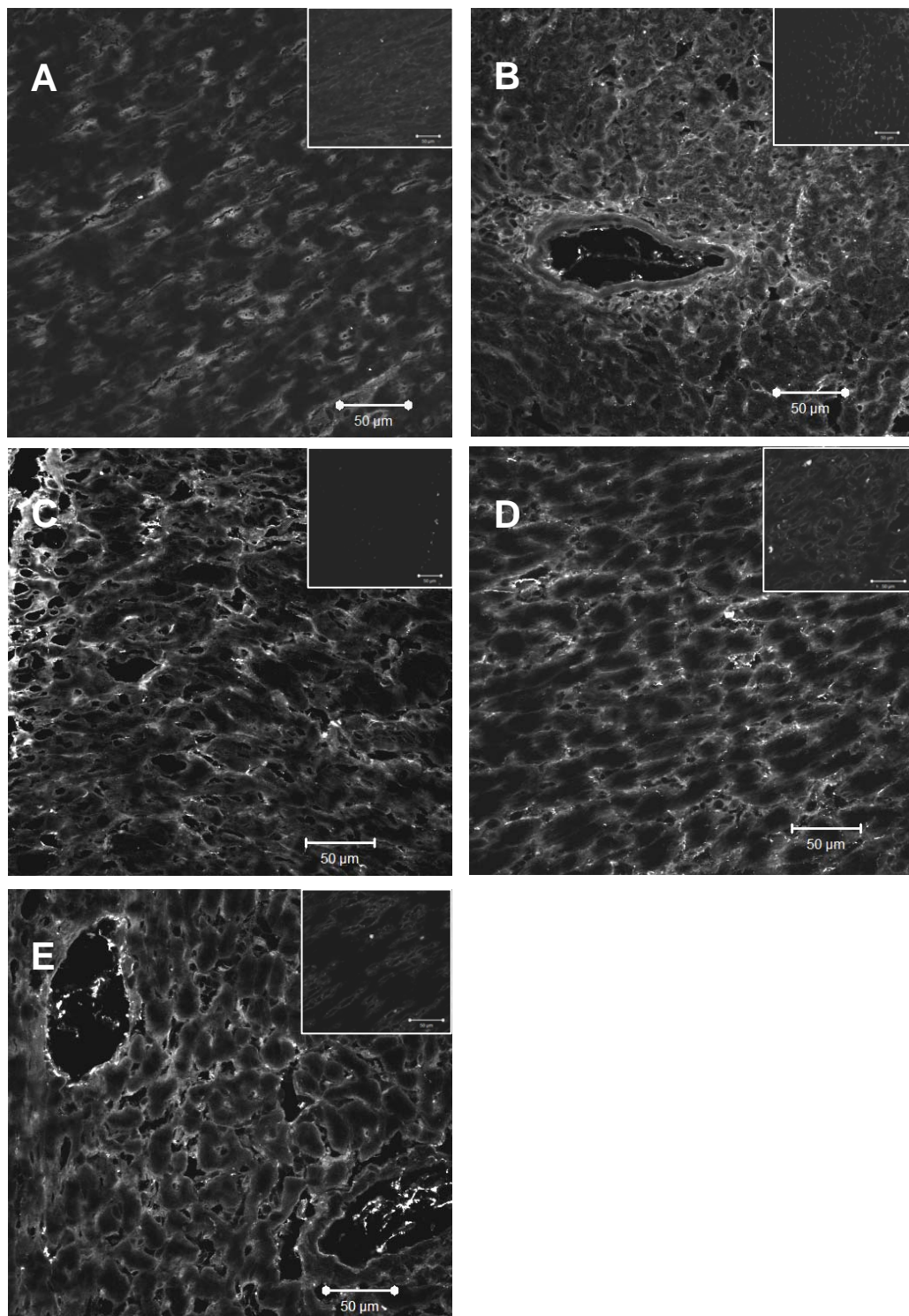


Figura 5.34 – Análise, por microscopia confocal da presença de galectina-3. Corações de camundongos C57BL-6 controle e infectado, s/c com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. (A) controle; (B) Infectado; (C) captopril; (D) captopril + HOE-140; (E) HOE-140.

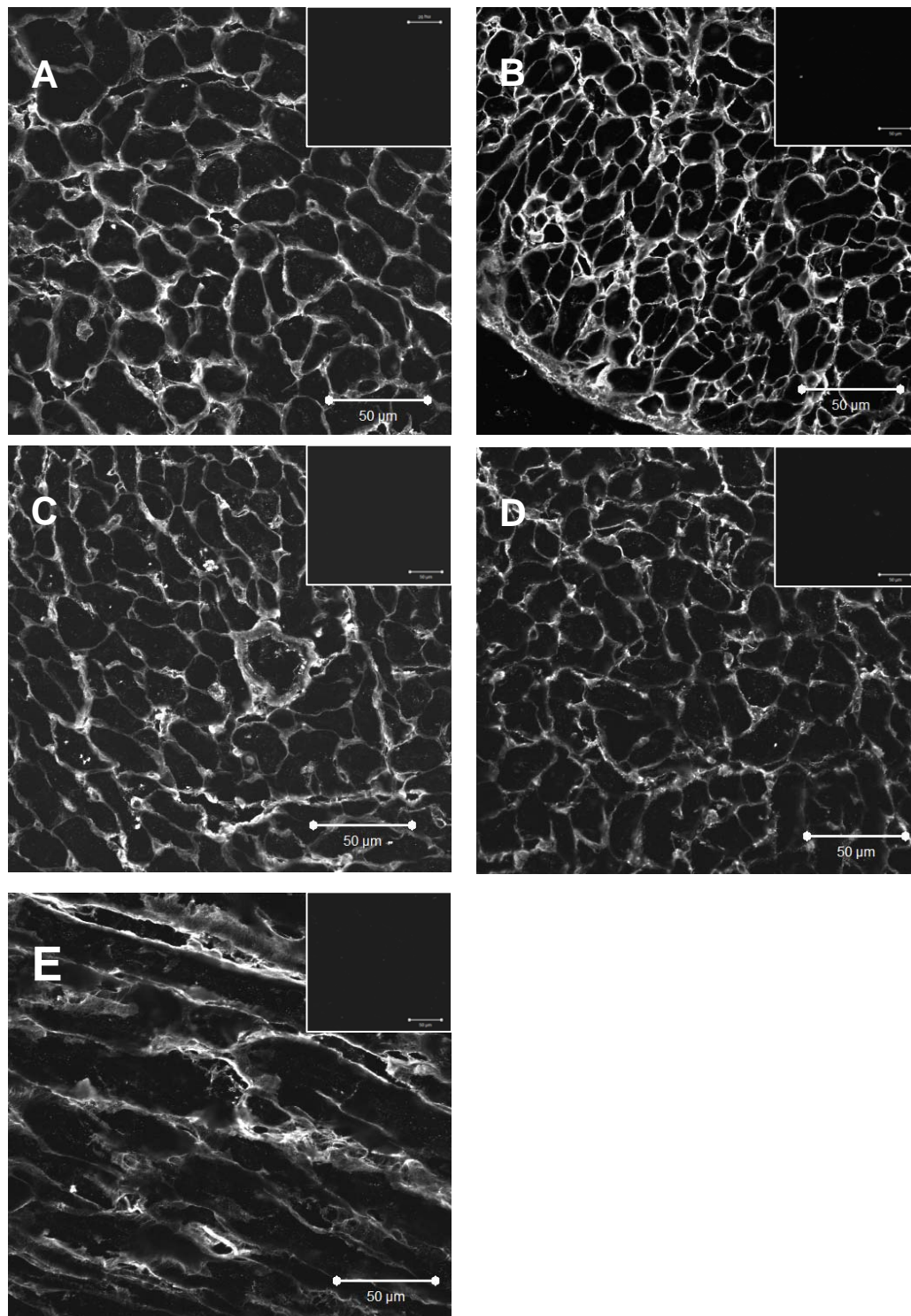


Figura 5.35 – Análise, por microscopia confocal da expressão de fibronectina. Corações de camundongos C57BL-6 controle e infectado, s/c com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. (A) controle; (B) Infectado; (C) captopril; (D) captopril + HOE-140; (E) HOE-140.

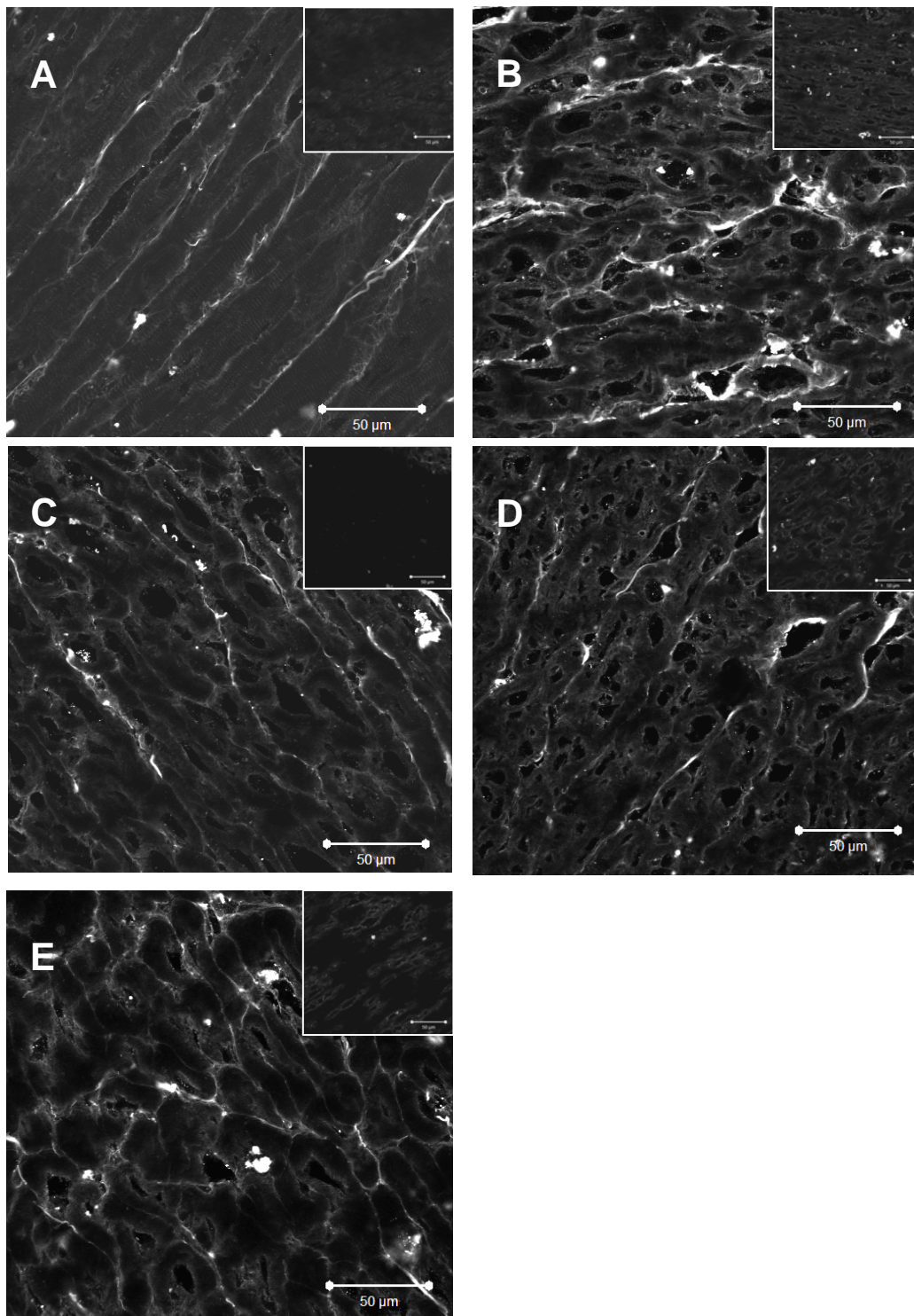


Figura 5.36 – Análise, por microscopia confocal da expressão de coágênio III. Corações de camundongos C57BL-6 controle e infectado, s/c com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. (A) controle; (B) Infectado; (C) captopril; (D) captopril + HOE-140; (E) HOE-140.

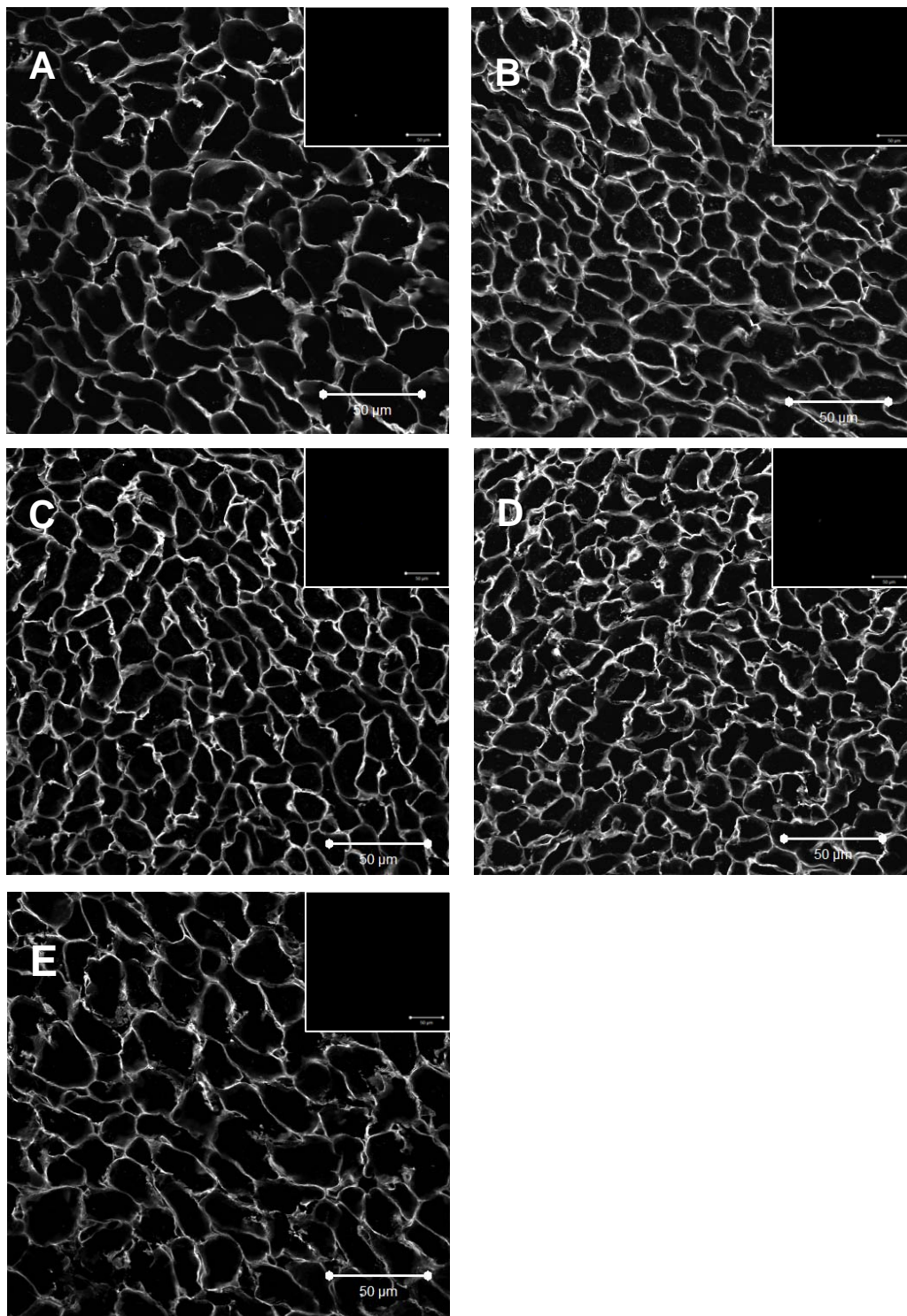


Figura 5.37 – Análise, por microscopia confocal da expressão de laminina. Corações de camundongos C57BL-6 controle e infectado, s/c com 10^6 TCTs/animal (Dm28c), após 30 dias de infecção. (A) controle; (B) Infectado; (C) captopril; (D) captopril + HOE-140; (E) HOE-140.

6. DISCUSSÃO:

No presente estudo, foi avaliado o papel do sistema de cininas nos distúrbios observados no coração, durante a fase aguda da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. Para isso foram utilizados camundongos C57BL/6 machos, com 5-6 semanas de idade, inoculados subcutaneamente com 10^6 parasitos/ animal. Os animais foram previamente tratados com captopril e/ou HOE-140, uma hora antes da infecção. Após 30 dias, os animais foram sacrificados para obtenção de células e tecidos. Buscou-se a validação do modelo experimental quanto à parasitemia e modulação dos órgãos linfóides primários e secundários, timo e linfonodos e análises histopatológicas da miocardite induzida pela infecção experimental por *T. cruzi*.

Após a descoberta da doença de Chagas, diversos modelos experimentais têm sido utilizados no estudo da interação parasito-hospedeiro. A identificação de diferentes cepas parasitárias demonstrou que o modelo experimental pode se apresentar com respostas diferenciadas em níveis patológicos e imunológicos, tanto na fase aguda quanto na fase crônica. A caracterização do modelo experimental subsidia os dados encontrados nas alterações patológicas da infecção experimental. Assim, foi feita a caracterização do modelo de infecção subcutânea experimental, utilizando a cepa DM28c, em camundongos machos, adultos jovens, da linhagem C57BL-6.

Nosso modelo de estudo foi proposto por Scharfstein, que utiliza o modelo de infecção subcutâneo, com a cepa DM28c, onde os camundongos foram tratados uma hora antes da infecção, inibindo ou estimulando a via de cininas. Este modelo é único em relação à literatura, pois os modelos experimentais descritos, apresentam o estímulo contínuo, isto é, tratamentos diários, estimulando ou inibindo a via de cininas, durante a fase aguda ou crônica da infecção experimental. É interessante ressaltar, que esse tratamento em dose única é capaz de modular a resposta imunitária inata e adaptativa, gerando inclusive alterações na cardite observada em animais infectados pelo *T. cruzi*, na fase crônica da infecção.

As alterações observadas durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi*, não se restringem apenas ao coração e ao cérebro. Pelo contrário, diversos autores descrevem a modulação de órgãos linfóides durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*. Essas alterações compõem aumento na celularidade de linfonodos subcutâneos

e baço (Minoprio *et al*, 1986), diminuição na celularidade dos linfonodos mesentéricos (deMeis *et al*, 2006) e atrofia tímica acompanhada de diminuição da celularidade (Savino *et al*, 1989). No modelo experimental utilizado no trabalho foi demonstrado que durante a fase aguda da infecção experimental, os animais infectados apresentam. Os resultados obtidos estão em concordância com os dados obtidos por Savino e colaboradores, que demonstraram que na infecção intraperitoneal, com diversas cepas de *T. cruzi* e diversas linhagens de camundongos, ocorre a atrofia tímica durante a fase aguda (Savino *et al*, 1989). Esses resultados demonstram que o timo, órgão linfóide primário, responsável pela diferenciação de linfócitos T, é modulado negativamente durante a infecção experimental por *T. cruzi*, independentemente da via de inóculo e da cepa parasitária. Por outro lado, foi também demonstrado que a via endógena de cininas não está diretamente envolvida com o processo de atrofia tímica, uma vez que todos os animais submetidos à infecção experimental, independente do tratamento, apresentaram atrofia tímica.

Entretanto, o timo não foi o único órgão linfóide avaliado, mas também os órgãos linfóides secundários, como linfonodos subcutâneos. As análises realizadas demonstraram resultados semelhantes aos dados descritos na literatura, onde há aumento na celularidade dos linfonodos subcutâneos. No entanto, o bloqueio da via endógena de cininas pelo tratamento com o antagonista seletivo do receptor B₂ (HOE-140), bloqueou esse efeito sobre a celularidade dos linfonodos. O aumento na celularidade dos linfonodos subcutâneos está diretamente relacionado à expansão clonal, específica e inespecífica, de linfócitos T e B (Minoprio *et al*, 1986). Esses dados sugerem que o bloqueio do receptor B₂ da via de cininas pode participar dos eventos relacionados à ativação e expansão clonal de linfócitos dentro dos linfonodos subcutâneos.

Diversos estudos demonstram que durante a infecção por *T. cruzi*, a principal cisteína protease de *T. cruzi*, a cruzipaina, é capaz de ativar o sistema de cininas pela clivagem do cininogênio e liberação de BK (Del Nery *et al*, 1997). Além disso, foi demonstrado que o tratamento com captopril aumenta a susceptibilidade de células endoteliais à infecção por *T. cruzi* (Scharfstein *et al*, 2000).

Apesar da comprovada susceptibilidade à invasão, induzida pelo tratamento com captopril *in vitro*, nas condições experimentais adotadas, foi observado que *in vivo* o

sistema endógeno de cininas não afeta a parasitemia, uma vez que nem a indução dessa via, ou o seu bloqueio pelo receptor B₂, foi capaz de modular a parasitemia. Leon e colaboradores em 2003, discutiram que a eficácia da resposta imunitária do hospedeiro ou a baixa concentração de captopril, *in vivo*, podem ser suficientes para gerar respostas diferentes às aquelas observadas *in vitro* (Leon *et al*, 2003).

A miocardite é a principal complicação clínica observada na doença de Chagas. Análises histopatológicas demonstram que essa lesão é composta, principalmente, por células mononucleares (Elizari *et al*, 1999; Higuchi *et al*, 1999). A miocardite chagásica está presente nas fases aguda e crônica da doença de Chagas, porém, a miocardite da fase crônica é mais severa acometendo cerca de 30% dos pacientes. O trabalho em questão, estudou a miocardite murina durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, dentro do contexto da família das cininas.

O tratamento com captopril, uma hora antes da infecção, aumentou o infiltrado inflamatório no coração de camundongos infectados por *T. cruzi* quando comparados aos animais infectados não-tratados. Esses resultados não são consistentes com a observação de Leon e colaboradores, que observaram que a administração de captopril em uma dose de 5 mg/L não modula a inflamação cardíaca, mas que em doses mais altas, leva a diminuição significativa no infiltrado inflamatório cardíaco (Leon *et al*, 2003). Ao mesmo tempo, os poucos estudos que utilizam captopril em pacientes chagásicos, também descrevem a diminuição da inflamação cardíaca, após a terapia com captopril (Batlouni *et al*, 1992; Bestetti *et al*, 1994).

Embora, os dados obtidos sejam conflitantes com a literatura algumas considerações importantes precisam ser ressaltadas, tais como diferenças no modelo experimental, desde a linhagem de camundongo utilizada, cepa parasitária e via de inóculo, assim como a via de administração da droga e a posologia. O captopril prolonga a meia-vida das cininas e, nas primeiras horas de uma resposta inflamatória a um agente infeccioso, pode agir como molécula pró-inflamatória. Os animais utilizados no trabalho receberam apenas uma única dose de captopril, uma hora antes da infecção, podendo assim ter iniciado uma indução da resposta inflamatória, antes mesmo da entrada do parasito. Em contrapartida, o grupo de Leon tratou os animais do 1º dia de infecção ao dia de sacrifício dos animais, por via oral. Dessa forma, o efeito observado por captopril não é apenas como molécula ativadora da resposta

imunológica, podendo esse protocolo de tratamento gerar novas cascatas de sinalização que atuem como moléculas antiinflamatórias.

Como o modelo experimental utilizado no trabalho é distinto do de Leon e, mais ainda, dos estudos em humanos, respostas distintas podem ser esperadas e observadas, partindo do pressuposto de que os determinantes da miocardite experimental resultam da quantidade de parasitos na infecção inicial, das formas infectantes no inóculo inicial (número de tripomastigotas), da linhagem de *T. cruzi* inoculada, possíveis re-infecções, da qualidade das linhagens e clones (biodema), dos receptores clonais-histotrópicos específicos do hospedeiro e da resposta imunitário inicial e tardia do hospedeiro (Macedo & Pena, 1998; Teixeira *et al*, 2006).

A administração de HOE-140, o antagonista seletivo do receptor 2 de BK, levou a diminuição do infiltrado inflamatório cardíaco, independente da co-administração de captopril.

Modelos animais sugerem que B₂R participa da fase aguda das respostas inflamatórias e da dor, enquanto B₁R participa na fase crônica da resposta (Dray & Perkins, 1993) o que vai de acordo com o modelo utilizado. No entanto, Phagoo e colaboradores observaram que os receptores B₁ e B₂ podem ser regulados por seus agonistas em modelos *in vitro* e *in vivo* (Phagoo *et al*, 1999), onde a ativação de B₂R induz a produção de citocinas (IL-1 β e IL-6) e quimiocinas (IL-8) promovendo a regulação positiva de B₁R. Por outro, lado B₂R é sensível à rápida dessensibilização e internalização, tornando a resposta dependente da degradação de BK e calidina em desArg⁹-BK e desArg⁹-calidina. Essas cininas agem no B₁R, otimizando a sua regulação positiva e mudando a relação do B₂R e B₁R em mais de 300 vezes (Phagoo *et al*, 1999). No entanto, no presente trabalho o bloqueio do receptor B₂R leva a inibição do efeito observado pela maior disponibilização de bradicinina ao sistema, nos animais tratados com captopril, indicando que o receptor B₁ não participa da indução da inflamação cardíaca induzida pela infecção pelo *T. cruzi*.

Os principais componentes celulares observados nos infiltrados cardíacos mantiveram-se inalterados em todos os grupos experimentais, independente do tratamento utilizado, tendo como principal constituinte linfócitos e monócitos, com alguns neutrófilos e mastócitos degranulados espaçados pelo tecido. Essa observação está de acordo com a descrita para modelos experimentais de infecção pelo *T. cruzi*,

onde os principais constituintes inflamatórios descritos são as células mononucleares (Chandrasekar *et al*, 1996).

Na caracterização da cardite, foi observado que animais infectados apresentaram aumento na fibrose cardíaca, quando comparados aos corações obtidos de animais controles. Alguns trabalhos na literatura mostraram o aumento na deposição de colágenos no coração, após a infecção experimental, como observado no trabalho em questão (Elizari, 1999; Higuchi, 1999).

Os animais infectados e tratados com captopril apresentaram aumento na expressão intersticial de colágenos, quando comparados aos animais infectados e não tratados. Os dados obtidos com captopril são contraditórios aos dados apresentados na literatura, que demonstram que o tratamento com captopril leva à diminuição na expressão de colágenos em tecidos cardíacos, obtidos de animais infectados e tratados, quando comparados aos animais infectados não-tratados (Leon *et al*, 2003). Silva e colaboradores observaram que ratos transgênicos que superexpressam calicreína tecidual, molécula responsável pela clivagem do cininogênio em cininas, desenvolvem hipertrofia cardíaca e fibrose, porém, bem menor quando comparados aos ratos selvagens (Tarleton, 1988). O efeito observado com a superexpressão de calicreína pode ser similar ao tratamento com captopril, uma vez que ambos resultam no acúmulo de bradicinina. Além disso, pacientes tratados com captopril apresentam melhora na função cardíaca, quando comparados a pacientes não-tratados (Batlouni *et al*, 1992; Bestetti *et al*, 1994).

Entretanto, o tratamento com captopril + HOE-140 ou apenas HOE-140, levou à reversão do efeito observado nos animais tratados somente com captopril. Esses dados sugerem que o receptor B₂R pode ser o receptor utilizado pela via de cininas, sendo a sua disponibilização importante para os efeitos observados com o tratamento utilizando apenas captopril.

As análises das fibras reticulares e elásticas apresentaram dados interessantes tanto no contexto do padrão normal, animais controles, quanto no contexto da infecção. Os dados obtidos demonstraram que a infecção experimental induz aumento na produção de fibras reticulares e elásticas e, o tratamento com captopril, leva a um aumento ainda maior na expressão dessas fibras no coração, similar aos dados encontrados com as fibras colagênicas e intensidade do infiltrado inflamatório. Além

disso, novamente, se observou que o bloqueio do receptor B₂R leva a reversão dos efeitos observados nos animais tratados apenas com captopril.

A distribuição das fibras reticulares, colagênicas e elásticas apresentaram distribuição diferencial entre átrio e ventrículos, porém foi observado que o átrio esquerdo mostrou um padrão peculiar em relação às outras câmaras cardíacas. As fibras elásticas se apresentam apenas na região atrial, principalmente, no átrio esquerdo. As fibras reticulares e colagênicas, embora estejam presentes nas quatro câmaras cardíacas, se apresentam em maior concentração no átrio esquerdo. Interessantemente, também foi observado que o processo infeccioso leva à presença de células inflamatórias, preferencialmente, na região atrial, sendo o átrio esquerdo o mais acometido. As células inflamatórias presentes nessa área, não estão diretamente ligadas à presença de parasitos, pois foram apenas identificados parasitos nas regiões ventriculares, sugerindo dessa forma, uma possível modulação na relação célula – MEC.

Moléculas de MEC são relacionadas com a migração e o direcionamento das células inflamatórias para o sítio infeccioso (Mathis *et al*, 1996). Além disso, moléculas de MEC são secretadas durante cicatrização tecidual. Assim, em estudos que analisam a inflamação num órgão, consideram-se as células inflamatórias e os constituintes moleculares da MEC. As análises por imunistoquímica demonstraram que há aumento na expressão de colágeno III nos corações de animais infectados e tratados, quando comparados aos animais infectados não-tratados. Esses achados reproduzem dados anteriores da literatura que demonstram que animais infectados, apresentam aumento na expressão de colágenos III e IV após a infecção experimental pelo *T. cruzi* (Andrade *et al*, 1989). Animais tratados com captopril ou captopril + HOE-140, apresentaram diminuição na expressão de colágeno III nos tecidos cardíacos analisados, quando comparados aos animais infectados. Porém, os animais tratados apenas com HOE-140, embora apresentassem menor expressão de colágeno III, quando comparados aos animais infectados não-tratados, exibiam uma maior expressão quando comparados com os animais infectados e tratados com captopril ou captopril + HOE-140. Os dados obtidos sugerem que a sinalização antes da infecção é capaz de modular a secreção de colágeno durante o processo de inflamação e cicatrização tecidual.

Animais infectados apresentam aumento na expressão de FN, quando comparados aos tecidos de animais controles. Calvet e colaboradores também observaram aumento na expressão de FN em tecidos cardíacos, na fase aguda da infecção por *T. cruzi*, quando esses foram infectados com a cepa Y. Porém, quando os animais eram infectados com a cepa Dm28c, não foi observado o mesmo efeito com a expressão de FN (Calvet *et al*, 2004). A cepa utilizada no estudo em questão é DM28c, porém foram utilizadas linhagem dos animais e via de inóculo diferentes das utilizadas por Calvet e colaboradores, tornando por esses detalhes, os resultados obtidos, diferentes. Interessantemente, apenas os animais infectados e tratados com captopril + HOE-140 não apresentaram modulação na expressão de FN quando comparados com os animais infectados não-tratados. As análises da expressão de FN, nesses animais, mostraram que o aumento induzido na expressão dessa proteína durante a infecção experimental por *T. cruzi* pode estar sendo modulado pela sinalização de cininas via B₁R e B₂R, tendo em vista que o bloqueio de B₂R e, o aumento de disponibilidade de BK, restaura a expressão de FN ao padrão de animais controles. Porém, esse mesmo resultado não foi obtido quando os animais foram tratados apenas com HOE-140.

Por outro lado, LN, outra molécula de MEC que possui importante papel na migração e adesão celular não é modulada durante a infecção experimental por *T. cruzi* no modelo experimental utilizado, tanto em animais infectados não-tratados, quanto animais infectados e tratados (todos os grupos).

Curiosamente, gal-3, uma proteína animal ligante de polilactosaminas, dita como contra-receptor para LN (Moody *et al*, 2000), apresenta modulação positiva de sua presença no tecido cardíaco, após a infecção experimental pelo *T. cruzi*. Porém, nenhum tratamento foi capaz de alterar a sua expressão e/ ou distribuição no coração de animais infectados e tratados.

Os dados demonstram que a administração de captopril na primeira hora que antecede a infecção experimental, assim como o bloqueio do seu receptor constitutivo B₂, pode modular diferentemente a cardite gerada na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*, sugerindo que diferentes mecanismos celulares e moleculares podem estar sendo sinalizados, como citocinas e células inflamatórias, gerando cursos diferenciais ao processo infeccioso e ao dano tecidual.

O circuito regulado pelo tipo de citocinas nas primeiras horas de infecção pode estar relacionado ao curso da infecção. Em doença de Chagas, diversos autores, discutem que esse perfil tipo 1 ou tipo 2 de citocinas, produzidas durante a fase aguda da infecção, pode estar relacionado aos fatores determinantes, que tornam um paciente inderteminado para sempre ou levam a evolução do paciente para a forma crônica (Andrade, 1999). No presente trabalho, a modulação da via de cininas, na primeira hora antes da infecção gerou alterações no aspecto celular e molecular da cardite aguda. A via de cininas, quando ativada, pode utilizar dois receptores diferentemente, os receptores B₁ e B₂. Os receptores B₂ são expressos constitutivamente, enquanto os receptores B₁ têm sua expressão relacionada após a lesão tecidual e presença de IL-1 β (Silva *et al*, 2000; Ratner, 1992; Zang & Tarleton, 1996). No modelo experimental utilizado, foi observado que a utilização de captopril que aumenta a sobrevivência de bradicinina, gera sinais que induzem aumento de células inflamatórias para os tecidos cardíacos. O bloqueio do receptor B₂, diminui a presença de células inflamatórias no tecido cardíaco, sugerindo que B₂R, module positivamente a migração de células inflamatórias para o tecido cardíaco. Esses dados podem estar relacionados com o perfil de citocinas geradas, que podem estar recrutando células com perfil imunitário diferente, tipo 1 e 2 e, que morfologicamente são impossíveis de serem indentificadas. Os animais apresentam maior infiltrado celular e maior deposição de moléculas de MEC, sugerindo a presença de células inflamatórias tipo 1, relacionadas a altas concentrações de IFN- γ e TNF- α . Dados da literatura discutem que macrófagos podem apresentar perfil tipo 1, sendo ótimas células fagocíticas, produtoras de substâncias tóxicas ao patógeno e citocinas inflamatórias. Essas células são as primeiras a estarem presentes no tecido infectado, porém, após a redimissão parcial ou completa do agente infeccioso, um segundo tipo de macrófago, tipo 2, chega ao tecido para promover a cicatrização e regeneração tecidual, onde secreta moléculas de MEC e citocinas anti-inflamatórias como TGF- β e IL-10 (Coura, 2007). Um desbalanço nesse contexto pode levar a uma maior lesão tecidual, grande área fibrótica, com perda de importantes áreas, que no caso do coração estaria relacionado ao tecido muscular estriado cardíaco, gerando falhas na fisiologia cardíaca normal. Assim, a via de cininas pode modular o recrutamento diferencial de células para o tecido cardíaco, podendo de forma indireta modular o processo cicatricial da cardite aguda.

Em resumo, os dados demonstram a presença de infiltrado inflamatório após a infecção experimental por *T. cruzi* em diversas áreas do coração, porém mostrando um tropismo pela região atrial. O tratamento com captopril modifica esse padrão de sítio inflamatório no coração, levando a uma área intensa de células inflamatórias na região ventricular com presença de ninhos de amastigotas. É interessante ressaltar que o processo inflamatório na região atrial, observado nos diferentes grupos, exceto nos animais tratados com captopril, não estava diretamente relacionado à presença de parasitos, tendo em vista não terem sido localizados, em nenhuma das diversas análises histopatológicas, a presença de ninhos de amastigotas na região atrial. As análises das colorações específicas e de matriz extracelular e matriproteínas mostraram aumento na produção de fibras colagênicas, reticulares, elásticas, moléculas de MEC e galectina-3 após a infecção. Além disso, as análises histopatológicas revelaram uma distribuição diferente das fibras estudadas nas câmaras cardíacas. Nesse sentido, o átrio esquerdo apresenta um maior adensamento das fibras reticulares, colagênicas e elásticas em relação às demais câmaras. Provavelmente isso se deve ao fato da pressão intratrial esquerda ser bem maior que a direita. Em humanos, a pressão atrial esquerda é da ordem de 12mmHg, enquanto que a mesma, no átrio direito, não ultrapassa os 5mmHg (Gordon & Taylor, 2005).

7. CONCLUSÃO:

Em nosso modelo experimental, observamos que o pico da parasitemia ocorre no 7º dia de infecção, e os tratamentos utilizados não foram capazes de modificar a curva da parasitemia nem modulá-la, indicando que este parâmetro não sofre interferência da via endógena de cininas.

A utilização de HOE-140 inibiu o aumento da celularidade em linfonodos subcutâneos, sugerindo que o bloqueio do receptor B₂, pode estar modulando o recrutamento celular e a modulação da expansão clonal nestes linfonodos. Contudo, este tratamento não acarretou alteração na celularidade tímica. Os demais tratamentos não modularam a celularidade, nem em timo, nem em linfonodos subcutâneos.

Nossos resultados demonstraram também que o sistema endógeno de cininas, quando super-estimulado pela inativação da enzima responsável pela inibição da BK, pode levar ao aumento do infiltrado inflamatório cardíaco, assim como da expressão das fibras elásticas. Por outro lado, o tratamento com captopril levou à diminuição de expressão de colágeno total e colágeno III no coração. O tratamento com captopril, não só aumentou a presença de infiltrado inflamatório cardíaco, como modificou o padrão de distribuição desse, o qual passou de predominantemente atrial para ventricular. Além disso, somente nos animais tratados com captopril foi possível observar ninhos de amastigotas, sempre de localização ventricular. Contudo, cabe ressaltar que mesmo nos animais deste grupo, o encontro de parasitos instalados no coração foi esporádico, de maneira que todas as alterações histopatológicas encontradas não apresentaram correlação com o encontro de formas parasitárias.

A indução e inibição da via constitutiva, pela utilização de captopril + HOE-140 diminuiu o processo fibrótico (colágeno total e colágeno III) e inflamatório no coração, quando comparamos com os animais tratados com captopril, voltando ao padrão observado nos animais infectados não tratados. Porém, observamos aumento na expressão de fibras elásticas no coração, quando comparamos com os animais infectados não-tratados, sendo a expressão das fibras elásticas, semelhante a observada em animais infectados e tratados com captopril. O tratamento com captopril + HOE-140 diminuiu a expressão de FN no coração, permanecendo essa, semelhante ao observado no animal controle.

A inibição da via endógena de cininas, pelo bloqueio de receptor constitutivo B₂ (HOE-140), diminuiu o infiltrado cardíaco e a expressão das fibras elásticas e colagênicas totais, quando comparado com os animais infectados não-tratados. Por outro lado, o tratamento com HOE-140 aumentou a expressão de FN e colágeno III, quando comparamos com os animais controles, sendo semelhante à observada nos animais infectados não-tratados.

Foi observada marcante diferença quanto à quantidade e distribuição das fibras elásticas presente nos átrios. Nesse sentido, mesmo nos animais não infectados, o átrio direito não apresenta fibras elásticas subendocárdicas e exibe pequena quantidade destas em localização subpericárdica. O átrio esquerdo, por sua vez, apresenta maior quantidade de fibras, que se localizam em ambas as regiões, mas com predomínio subendocárdico. Foi observado aumento quantitativo dessas fibras no átrio esquerdo dos animais tratados com captopril, com ou sem HOE-140, enquanto que foi notada redução nos animais tratados somente com HOE-140.

Em todos os grupos analisados, o infiltrado inflamatório, quando presente, era sempre predominantemente linfo-monocítico. O aumento do infiltrado celular mostrou-se inversamente proporcional ao processo de formação da fibrose cardíaca.

Em conclusão nossos dados sugerem que a via de cininas modula a formação da fibrose e do infiltrado inflamatório cardíaco, induzido pela infecção aguda pelo *T. cruzi*.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Acosta-Rodríguez EV, Montes CL, Motrán CC, Zuniga EI, Liu FT, Rabinovich GA, Gruppi A. Galectin-3 mediates IL-4-induced survival and differentiation of B cells: functional cross-talk and implications during *Trypanosoma cruzi* infection. *J Immunol.* 2004;172(1):493-502.

Ahluwalia A, Perretti M. Involvement of bradykinin B1 receptors in the polymorphonuclear leukocyte accumulation induced by IL-1 beta in vivo in the mouse. *J Immunol.* 1996;156(1):269-74.

Aliberti J, Viola JP, Vieira-de-Abreu A, Bozza PT, Sher A, Scharfstein J. Cutting edge: bradykinin induces IL-12 production by dendritic cells: a danger signal that drives Th1 polarization. *J Immunol.* 2003;170(11):5349-53.

Aliberti JC, Souto JT, Marino AP, Lannes-Vieira J, Teixeira MM, Farber J, Gazzinelli RT, Silva JS. Modulation of chemokine production and inflammatory responses in interferon-gamma- and tumor necrosis factor-R1-deficient mice during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol.* 2001;158(4):1433-40

Alitalo K, Hovi T, Vaheri A. Fibronectin is produced by human macrophages. *J Exp Med.* 1980;151(3):602-13.

Almeida IC, Camargo MM, Procópio DO, Silva LS, Mehlert A, Travassos LR, Gazzinelli RT, Ferguson MA. Highly purified glycosylphosphatidylinositols from *Trypanosoma cruzi* are potent proinflammatory agents. *EMBO J.* 2000;19(7):1476-85.

Andrade LO, Andrews NW. Lysosomal fusion is essential for the retention of *Trypanosoma cruzi* inside host cells. *J Exp Med.* 2004;200(9):1135-43.

Andrade SG, Campos RF, Sobral KS, Magalhães JB, Guedes RS, Guerreiro ML. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(1):1-8.

Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM, Andrade ZA. Recovery and characterization of trypanosomas inoculated into immune animals: re-inoculation with different strains of *T. cruzi*. Rev Inst Med Trop Sao Paulo. 1970;12(6):395-402.

Andrade SG, Grimaud JA, Stocker-Guerret S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. Am J Trop Med Hyg. 1989;40(3):252-60.

Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:185-7.

Andrade V, Barral-Netto M, Andrade SG. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. Braz J Med Biol Res. 1985;18(4):499-506.

Andrade ZA. Immunopathology of Chagas disease. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1999;94 Suppl 1:71-80.

Andrade ZA. Pathogenesis of Chagas' disease. Res Immunol. 1991;142(2):126-9.

Andrews NW, Abrams CK, Slatin SL, Griffiths G. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at low pH. Cell. 1990;61(7):1277-87.

Andrews NW, Whitlow MB. Secretion by *Trypanosoma cruzi* of a hemolysin active at low pH. Mol Biochem Parasitol. 1989;33(3):249-56.

Anonymous. Recommendations from a satellite meeting. Mem Inst Oswaldo Cruz 1999;94(Suppl. II):429-432.

Arnholdt AC, Piuvezam MR, Russo DM, Lima AP, Pedrosa RC, Reed SG, Scharfstein J. Analysis and partial epitope mapping of human T cell responses to *Trypanosoma cruzi* cysteinyl proteinase. J Immunol. 1993;151(6):3171-9.

Aslund L, Henriksson J, Campetella O, Frasch AC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The C-terminal extension of the major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. Mol Biochem Parasitol. 1991;45(2):345-7.

Austin CE, Faussner A, Robinson HE, Chakravarty S, Kyle DJ, Bathon JM, Proud D. Stable expression of the human kinin B1 receptor in Chinese hamster ovary cells. Characterization of ligand binding and effector pathways. J Biol Chem. 1997;272(17):11420-5.

Barnes PJ. Bradykinin and asthma. Thorax. 1992;47(11):979-83.

Barondes SH, Cooper DN, Gitt MA, Leffler H. Galectins. Structure and function of a large family of animal lectins. J Biol Chem. 1994;269(33):20807-10.

Barreto JC. Chagas' disease. Br J Anaesth. 1979;51(12):1189.

Barrett AJ, Fritz H, Grubb A, Isemura S, Järvinen M, Katunuma N, Machleidt W, Müller-Esterl W, Sasaki M, Turk V. Nomenclature and classification of the proteins homologous with the cysteine-proteinase inhibitor chicken cystatin. Biochem J. 1986;236(1):312.

Batlouni M, Barretto AC, Armaganijan D, Vichi FL, Spritzer N, Simões R, Hatab SA, Nascimento LO. Treatment of mild and moderate cardiac failure with captopril. A multicenter study. Arq Bras Cardiol. 1992;58(5):417-21.

Bestetti RB, Dalbo CM, Freitas OC, Teno LA, Castilho OT, Oliveira JS. Noninvasive predictors of mortality for patients with Chagas' heart disease: a multivariate stepwise logistic regression study. Cardiology. 1994;84(4-5):261-7.

Bhoola KD, Figueroa CD, Worthy K. Bioregulation of kinins: kallikreins, kininogens, and kininases. Pharmacol Rev. 1992;44(1):1-80.

Bishop JE, Greenbaum R, Gibson DG, Yacoub M, Laurent GJ. Enhanced deposition of predominantly type I collagen in myocardial disease. *J Mol Cell Cardiol.* 1990;22(10):1157-65.

Blaukat A, Barac A, Cross MJ, Offermanns S, Dikic I. G protein-coupled receptor-mediated mitogen-activated protein kinase activation through cooperation of Galpha(q) and Galpha(i) signals. *Mol Cell Biol.* 2000;20(18):6837-48.

Bonaldo MC, Scharfstein J, Murta AC, Goldenberg S. Further characterization of *Trypanosoma cruzi* GP57/51 as the major antigen expressed by differentiating epimastigotes. *Parasitol Res.* 1991;77(7):567-71.

Borda E, Pascual J, Cossio P, De La Vega M, Arana R, Sterin-Borda L. A circulating IgG in Chagas' disease which binds to beta-adrenoceptors of myocardium and modulates their activity. *Clin Exp Immunol.* 1984;57(3):679-86.

Bornstein P, Sage EH. Matricellular proteins: extracellular modulators of cell function. *Curr Opin Cell Biol.* 2002;14(5):608-16.

Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol.* 1997;114(2):103-10.

Brener Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annu Rev Microbiol.* 1973; 27:347-82.

Brewer CF. Binding and cross-linking properties of galectins. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):255-62.

Burch RM, Axelrod J. Dissociation of bradykinin-induced prostaglandin formation from phosphatidylinositol turnover in Swiss 3T3 fibroblasts: evidence for G protein regulation of phospholipase A2. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1987;84(18):6374-8.

Calvet CM, Meuser M, Almeida D, Meirelles MN, Pereira MC. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocyte interaction: role of fibronectin in the recognition process and extracellular matrix expression in vitro and in vivo. *Exp Parasitol.* 2004;107(1-2):20-30.

Camargo MM, Andrade AC, Almeida IC, Travassos LR, Gazzinelli RT. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. J Immunol. 1997;159(12):6131-9.

Campetella O, Henriksson J, Aslund L, Frasch AC, Pettersson U, Cazzulo JJ. The major cysteine proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi* is encoded by multiple polymorphic tandemly organized genes located on different chromosomes. Mol Biochem Parasitol. 1992;50(2):225-34.

Campetella O, Martínez J, Cazzulo JJ. A major cysteine proteinase is developmentally regulated in *Trypanosoma cruzi*. FEMS Microbiol Lett. 1990;55(1-2):145-9.

Carson FL, Martin JH, Lynn JA. Formalin fixation for electron microscopy: a re-evaluation. Am J Clin Pathol. 1973;59(3):365-73.

Chagas JR, Portaro FC, Hirata IY, Almeida PC, Juliano MA, Juliano L, Prado ES. Determinants of the unusual cleavage specificity of lysyl-bradykinin-releasing kallikreins. Biochem J. 1995;306 (Pt 1):63-9.

Chandrasekar B, Melby PC, Troyer DA, Freeman GL. Induction of proinflammatory cytokine expression in experimental acute Chagasic cardiomyopathy. Biochem Biophys Res Commun. 1996;223(2):365-71.

Chapman D, Weber KT, Eghbali M. Regulation of fibrillar collagen types I and III and basement membrane type IV collagen gene expression in pressure overloaded rat myocardium. Circ Res. 1990;67(4):787-94.

Ciavaglia Mdo C, de Carvalho TU, de Souza W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with cells with altered glycosylation patterns. Biochem Biophys Res Commun. 1993;193(2):718-21.

Clemens MJ. PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997;29(7):945-9.

Clemens MJ. Regulation of eukaryotic protein synthesis by protein kinases that phosphorylate initiation factor eIF-2. *Mol Biol Rep.* 1994;19(3):201-10.

Colman RW, Schmaier AH. Contact system: a vascular biology modulator with anticoagulant, profibrinolytic, antiadhesive, and proinflammatory attributes. *Blood.* 1997;90(10):3819-43.

Cooper DN. Galectinomics: finding themes in complexity. *Biochim Biophys Acta.* 2002;1572(2-3):209-31.

Cossio PM, Laguens RP, Diez C, Szarfman A, Segal A, Arana RM. Chagasic cardiopathy. Antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation.* 1974;50(6):1252-9.

Coura JR, de Abreu LL, Willcox HP, Petana W. Comparative controlled study on the use of benznidazole, nifurtimox and placebo, in the chronic form of Chagas' disease, in a field area with interrupted transmission. I. Preliminary evaluation. *Rev Soc Bras Med Trop.* 1997;30(2):139-44.

Coura JR, Junqueira AC, Giordano CM, Funatsu RK. Chagas' disease in the Brazilian Amazon. I--A short review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo.* 1994;36(4):363-8.

Coura JR. Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2007; 102 Suppl 1:113-22.

Coura JR. Epidemiologic determinants of Chagas' disease in Brazil: the infection, the disease and its morbidity/mortality *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988;83 Suppl 1:392-402.

Cuna WR, Cuna CR. Characterization of T cell clones from chagasic patients: predominance of CD8 surface phenotype in clones from patients with pathology. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1995;90(4):503-6.

Cunha-Neto E, Coelho V, Guilherme L, Fiorelli A, Stolf N, Kalil J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. J Clin Invest. 1996;98(8):1709-12.

Cunha-Neto E, Duranti M, Gruber A, Zingales B, De Messias I, Stolf N, Bellotti G, Patarroyo ME, Pilleggi F, Kalil J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. Proc Natl Acad Sci U S A. 1995;92(8):3541-5.

de Araujo-Jorge TC, Barbosa HS, Meirelles MN. *Trypanosoma cruzi* recognition by macrophages and muscle cells: perspectives after a 15-year study. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1992;87 Suppl 5:43-56.

de Araújo-Jorge TC. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. Mem Inst Oswaldo Cruz. 1989;84(4):441-62.

de Meis J, Mendes-da-Cruz DA, Farias-de-Oliveira DA, Corrêa-de-Santana E, Pinto-Mariz F, Cotta-de-Almeida V, Bonomo A, Savino W. Atrophy of mesenteric lymph nodes in experimental Chagas' disease: differential role of Fas/Fas-L and TNFRI/TNF pathways. Microbes Infect. 2006;8(1):221-31.

de Souza W. Microscopy and cytochemistry of the biogenesis of the parasitophorous vacuole. Histochem Cell Biol. 2005;123(1):1-18.

de Souza W. O Parasito e Sua Interação com os Hospedeiros. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 119-120.

Del Nery E, Chagas JR, Juliano MA, Prado ES, Juliano L. Evaluation of the extent of the binding site in human tissue kallikrein by synthetic substrates with sequences of human kininogen fragments. *Biochem J.* 1995;312 (Pt 1):233-8.

Del Nery E, Juliano MA, Lima AP, Scharfstein J, Juliano L. Kininogenase activity by the major cysteinyl proteinase (cruzipain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 1997;272(41):25713-8.

Derouich-Guergour D, Brenier-Pinchart MP, Ambroise-Thomas P, Pelloux H. Tumour necrosis factor alpha receptors: role in the physiopathology of protozoan parasite infections. *Int J Parasitol.* 2001;31(8):763-9.

Devera R, Fernandes O, Coura JR. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2003;98(1):1-12.

Dias JC, Macedo VO. Doença de Chagas. In: Coura JR editor. *Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A. 2005. p. 557-593.

Dias JC. Globalization, inequity and Chagas disease. *Cad Saude Publica.* 2007;23 Suppl 1:S13-22.

Dias JC. Notes about of *Trypanosoma cruzi* and yours bio-ecology characteristics with agents of the transmission by meals. *Rev Soc Bras Med Trop.* 2006;39(4):370-5.

Dohmann HF, Silva SA, Souza AL, Braga AM, Branco RV, Haddad AF, Oliveira MA, Moreira RC, Tuche FA, Peixoto CM, Tura BR, Borojevic R, Ribeiro JP, Nicolau JC, Nobrega AC, Carvalho AC. Multicenter Double Blind Trial of Autologous Bone Marrow Mononuclear Cell Transplantation through Intracoronary Injection post Acute Myocardium Infarction a MiHeart/AMI Study. *Trials.* 2008;9(1):41.

Dolber PC & Spach MS. Conventional and confocal fluorescence microscopy of collagen fibers in the heart. *J Histochem Cytochem.* 1993;41(3): 465-9.

DosReis GA, Freire-de-Lima CG, Nunes MP, Lopes MF. The importance of aberrant T-cell responses in Chagas disease. *Trends Parasitol.* 2005;21(5):237-43.

Dray A, Perkins M. Bradykinin and inflammatory pain. *Trends Neurosci.* 1993;16(3):99-104.

Dumic J, Dabelic S, Flögel M. Galectin-3: an open-ended story. *Biochim Biophys Acta.* 2006;1760(4):616-35.

Dutra WO, Martins-Filho OA, Cançado JR, Pinto-Dias JC, Brener Z, Freeman Júnior GL, Colley DG, Gazzinelli G, Parra JC. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas' disease. *Int Immunol.* 1994;6(4):499-506.

Eakin AE, Mills AA, Harth G, McKerrow JH, Craik CS. The sequence, organization, and expression of the major cysteine protease (cruzain) from *Trypanosoma cruzi*. *J Biol Chem.* 1992;267(11):7411-20.

Ehrig K, Leivo I, Argraves WS, Ruoslahti E, Engvall E. Merosin, a tissue-specific basement membrane protein, is a laminin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990;87(9):3264-8.

Elizari MV. Chagasic myocardopathy: historical perspective. *Medicina (B Aires).* 1999;59 Suppl 2:25-40.

Elola MT, Wolfenstein-Todel C, Troncoso MF, Vasta GR, Rabinovich GA. Galectins: matricellular glycan-binding proteins linking cell adhesion, migration, and survival. *Cell Mol Life Sci.* 2007;64(13):1679-700.

Erdős EG. Some old and some new ideas on kinin metabolism. *J Cardiovasc Pharmacol.* 1990;15 Suppl 6:S20-4.

Ferguson SS, Zhang J, Barak LS, Caron MG. G-protein-coupled receptor kinases and arrestins: regulators of G-protein-coupled receptor sequestration. *Biochem Soc Trans.* 1996;24(4):953-9.

Fernandes O, Souto RP, Castro JA, Pereira JB, Fernandes NC, Junqueira AC, Naiff RD, Barrett TV, Degraive W, Zingales B, Campbell DA, Coura JR. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *Am J Trop Med Hyg.* 1998;58(6):807-11.

Fernandez A, Hontebeyrie M, Said G. Autonomic neuropathy and immunological abnormalities in Chagas' disease. *Clin Auton Res.* 1992;2(6):409-12.

Fiedler F. Enzymology of glandular kallikreins. In: E. G. Erdös ed. *Bradykinin, Kallidin and Kallikrein.* New York: Springer-Verlag; 1979. p. 103-161

Fong D, Smith DI, Hsieh WT. The human kininogen gene (KNG) mapped to chromosome 3q26-qter by analysis of somatic cell hybrids using the polymerase chain reaction. *Hum Genet.* 1991;87(2):189-92.

Fonseca SG, Moins-Teisserenc H, Clave E, Ianni B, Nunes VL, Mady C, Iwai LK, Sette A, Sidney J, Marin ML, Goldberg AC, Guilherme L, Charron D, Toubert A, Kalil J, Cunha-Neto E. Identification of multiple HLA-A*0201-restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi*-infected patients. *Microbes Infect.* 2005;7(4):688-97.

Forattini OP. Biogeography, origin and distribution of Triatominae domicile dispersal in Brazil. *Rev Saude Publica.* 1980;14(3):265-99.

Frosch S, Kraus S, Fleischer B. *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. *Med Microbiol Immunol.* 1996;185(3):189-93.

Gabius HJ, André S, Kaltner H, Siebert HC. The sugar code: functional lectinomics. *Biochim Biophys Acta*. 2002;1572(2-3):165-77.

Garg N, Popov VL, Papaconstantinou J. Profiling gene transcription reveals a deficiency of mitochondrial oxidative phosphorylation in *Trypanosoma cruzi*-infected murine hearts: implications in chagasic myocarditis development. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1638(2):106-20.

Gaudreau P, Barabé J, St-Pierre S, Regoli D. Pharmacological studies of kinins in venous smooth muscles. *Can J Physiol Pharmacol*. 1981;59(4):371-9.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1992;22(10):2501-6.

Gazzinelli RT, Oswald IP, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *Eur J Immunol*. 1992;22(10):2501-6.

Geppetti P. Sensory neuropeptide release by bradykinin: mechanisms and pathophysiological implications. *Regul Pept*. 1993;47(1):1-23.

Giordano R, Fouts DL, Tewari D, Colli W, Manning JE, Alves MJ. Cloning of a surface membrane glycoprotein specific for the infective form of *Trypanosoma cruzi* having adhesive properties to laminin. *J Biol Chem*. 1999;274(6):3461-8.

Gobeil F, Filteau C, Pheng LH, Jukic D, Nguyen-Le XK, Regoli D. In vitro and in vivo characterization of bradykinin B₂ receptors in the rabbit and the guinea pig. *Can J Physiol Pharmacol*. 1996;74(2):137-44.

Godsel LM, Leon JS, Engman DM. Angiotensin converting enzyme inhibitors and angiotensin II receptor antagonists in experimental myocarditis. *Curr Pharm Des.* 2003;9(9):723-35.

Gordon S, Taylor PR. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 2005; 5(12):953-64.

Gustafson EJ, Schmaier AH, Wachtfogel YT, Kaufman N, Kucich U, Colman RW. Human neutrophils contain and bind high molecular weight kininogen. *J Clin Invest.* 1989;84(1):28-35.

Hatcher FM, Kuhn RE, Cerrone MC, Burton RC. Increased natural killer cell activity in experimental American trypanosomiasis. *J Immunol.* 1981;127(3):1126-30.

Hausdorff WP, Bouvier M, O'Dowd BF, Irons GP, Caron MG, Lefkowitz RJ. Phosphorylation sites on two domains of the beta 2-adrenergic receptor are involved in distinct pathways of receptor desensitization. *J Biol Chem.* 1989;264(21):12657-65.

Higashida H, Streaty RA, Klee W, Nirenberg M. Bradykinin-activated transmembrane signals are coupled via No or Ni to production of inositol 1,4,5-trisphosphate, a second messenger in NG108-15 neuroblastoma-glioma hybrid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1986;83(4):942-6.

Higuchi MD, Ries MM, Aiello VD, Benvenuti LA, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of *Trypanosoma cruzi* antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. *Am J Trop Med Hyg.* 1997;56(5):485-9.

Higuchi Mde L, Gutierrez PS, Aiello VD, Palomino S, Bocchi E, Kalil J, Bellotti G, Pileggi F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.* 1993;423(3):157-60.

Higuchi ML, De Moraes CF, Pereira Barreto AC, Lopes EA, Stolf N, Bellotti G, Pileggi F. The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas' disease: a study based on endomyocardial biopsies. *Clin Cardiol.* 1987;10(11):665-70.

Higuchi ML. Human chronic chagasic cardiopathy: participation of parasite antigens, subsets of lymphocytes, cytokines and microvascular abnormalities. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:263-7.

Hock FJ, Wirth K, Albus U, Linz W, Gerhards HJ, Wiemer G, Henke S, Breipohl G, König W, Knolle J, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vitro studies. *Br J Pharmacol.* 1991;102(3):769-73.

Hoft DF, Lynch RG, Kirchhoff LV. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 1993;151(12):7038-47.

Hölscher C, Köhler G, Müller U, Mossmann H, Schaub GA, Brombacher F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infect Immun.* 1998;66(3):1208-15.

Hölscher C, Mohrs M, Dai WJ, Köhler G, Ryffel B, Schaub GA, Mossmann H, Brombacher F. Tumor necrosis factor alpha-mediated toxic shock in *Trypanosoma cruzi*-infected interleukin 10-deficient mice. *Infect Immun.* 2000;68(7):4075-83.

Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marchal G, Eisen H. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur J Immunol.* 1987;17(7):1027-33.

Hsu DK, Zuberi RI, Liu FT. Biochemical and biophysical characterization of human recombinant IgE-binding protein, an S-type animal lectin. *J Biol Chem.* 1992;267(20):14167-74.

http://www.anvisa.gov.br/divulga/noticias/2005/240305_nota.pdf. Secretaria de vigilância em saúde, Ministério da saúde. Doença de Chagas aguda relacionada à ingestão de caldo de cana em Santa Catarina. (accessed on 17/Oct/2006).

<http://www.fiocruz.br/chagas/cgi/cgilua.exe/sys/start.htm?tpl=home>. Fundação Oswaldo Cruz, Fiocruz. Doença de Chagas. (accessed on 20/Aug/2008).

<http://www.who.int/tdr/diseases/chagas/direction.htm>. World Health Organization, TDR, for research on disease of poverty. Doença de Chagas. (accessed on 13/Jun/2007).

Hughes RC. Secretion of the galectin family of mammalian carbohydrate-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*. 1999;1473(1):172-85.

Hughes RC. The galectin family of mammalian carbohydrate-binding molecules. *Biochem Soc Trans*. 1997;25(4):1194-8.

Hynes RO, Yamada KM. Fibronectins: multifunctional modular glycoproteins. *J Cell Biol*. 1982;95(2 Pt 1):369-77.

Iurisci I, Tinari N, Natoli C, Angelucci D, Cianchetti E, Iacobelli S. Concentrations of galectin-3 in the sera of normal controls and cancer patients. *Clin Cancer Res*. 2000;6(4):1389-93.

Jeng KC, Frigeri LG, Liu FT. An endogenous lectin, galectin-3 (epsilon BP/Mac-2), potentiates IL-1 production by human monocytes. *Immunol Lett*. 1994;42(3):113-6.

Johansson S, Rubin K, Höök M, Ahlgren T, Seljelid R. In vitro biosynthesis of cold insoluble globulin (fibronectin) by mouse peritoneal macrophages. *FEBS Lett*. 1979;105(2):313-6.

Kemeny DM, Noble A, Holmes BJ, Diaz-Sanchez D. Immune regulation: a new role for the CD8⁺ T cell. *Immunol Today*. 1994;15(3):107-10.

Kleshchenko YY, Moody TN, Furtak VA, Ochieng J, Lima MF, Villalta F. Human galectin-3 promotes *Trypanosoma cruzi* adhesion to human coronary artery smooth muscle cells. *Infect Immun*. 2004;72(11):6717-21.

Kotner J, Tarleton R. Captopril ameliorates myocarditis in acute experimental Chagas disease. *Circulation*. 2003;107(17):2264-9.

Krettli AU, Brener Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*. 1976;116(3):755-60.

Kuwabara I, Liu FT. Galectin-3 promotes adhesion of human neutrophils to laminin. *J Immunol*. 1996;156(10):3939-44.

Leffler H. Galectins structure and function--a synopsis. *Results Probl Cell Differ*. 2001;33:57-83.

Lembeck F, Griesbacher T, Eckhardt M, Henke S, Breipohl G, Knolle J. New, long-acting, potent bradykinin antagonists. *Br J Pharmacol*. 1991;102(2):297-304.

Leon JS, Godsel LM, Wang K, Engman DM. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. *Infect Immun*. 2001;69(9):5643-9.

Leon JS, Wang K, Engman DM. Captopril ameliorates myocarditis in acute experimental Chagas disease. *Circulation*. 2003;107(17):2264-9.

Levesque L, Harvey N, Rioux F, Drapeau G, Marceau F. Development of a binding assay for the B₁ receptors for kinins. *Immunopharmacology*. 1995;29(2):141-7.

Levin MJ, Mesri E, Benarous R, Levitus G, Schijman A, Levy-Yeyati P, Chiale PA, Ruiz AM, Kahn A, Rosenbaum MB, et al. Identification of major *Trypanosoma cruzi* antigenic determinants in chronic Chagas' heart disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1989;41(5):530-8.

Ley V, Robbins ES, Nussenzweig V, Andrews NW. The exit of *Trypanosoma cruzi* from the phagosome is inhibited by raising the pH of acidic compartments. J Exp Med. 1990;171(2):401-13.

Lima AP, Almeida PC, Tersariol IL, Schmitz V, Schmaier AH, Juliano L, Hirata IY, Müller-Esterl W, Chagas JR, Scharfstein J. Heparan sulfate modulates kinin release by *Trypanosoma cruzi* through the activity of cruzipain. J Biol Chem. 2002;277(8):5875-81.

Lima-Martins MV, Sanchez GA, Krettli AU, Brener Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. Parasite Immunol. 1985;7(4):367-76.

Liu FT, Patterson RJ, Wang JL. Intracellular functions of galectins. Biochim Biophys Acta. 2002;1572(2-3):263-73.

Liu FT, Rabinovich GA. Galectins as modulators of tumour progression. Nat Rev Cancer. 2005;5(1):29-41.

Liu FT. Galectins: a new family of regulators of inflammation. Clin Immunol. 2000;97(2):79-88.

Lohse MJ. Molecular mechanisms of membrane receptor desensitization. Biochim Biophys Acta. 1993;1179(2):171-88.

Lopes P, Couture R. Cardiovascular responses elicited by intrathecal kinins in the conscious rat. Eur J Pharmacol. 1992;210(2):137-47.

Low HP, Tarleton RL. Molecular cloning of the gene encoding the 83 kDa amastigote surface protein and its identification as a member of the *Trypanosoma cruzi* sialidase superfamily. Mol Biochem Parasitol. 1997;88(1-2):137-49.

Lukyanov P, Furtak V, Ochieng J. Galectin-3 interacts with membrane lipids and penetrates the lipid bilayer. Biochem Biophys Res Commun. 2005;338(2):1031-6.

Macedo AM, Pena SD. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. *Parasitol Today*. 1998;14(3):119-24.

Marceau F, Hess JF, Bachvarov DR. The B1 receptors for kinins. *Pharmacol Rev*. 1998;50(3):357-86.

Marceau F. Kinin B1 receptors: a review. *Immunopharmacology*. 1995;30(1):1-26.

Marin-Neto JA, Simões MV, Sarabanda AVL. Forma Crônica Cardíaca. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 266-267.

Marino AP, Silva AA, Pinho RT, Lannes-Vieira J. *Trypanosoma cruzi* infection: a continuous invader-host cell cross talk with participation of extracellular matrix and adhesion and chemoattractant molecules. *Braz J Med Biol Res*. 2003;36(8):1121-33.

Massa SM, Cooper DN, Leffler H, Barondes SH. L-29, an endogenous lectin, binds to glycoconjugate ligands with positive cooperativity. *Biochemistry*. 1993;32(1):260-7.

Mathis SA, Criscimagna NL, Leeb-Lundberg LM. B1 and B2 kinin receptors mediate distinct patterns of intracellular Ca²⁺ signaling in single cultured vascular smooth muscle cells. *Mol Pharmacol*. 1996;50(1):128-39.

Mazza S, Freire RS. Manifestaciones cutáneas de inoculación, metastáticas y hematógenas en enfermedad de Chagas. *Chagomas de Inoculación, chagomas metastáticos y chagomas hematógenos*. *Public MEPRA* 1940;46:3-38.

Menon RP, Hughes RC. Determinants in the N-terminal domains of galectin-3 for secretion by a novel pathway circumventing the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *Eur J Biochem*. 1999;264(2):569-76.

Milei J, Sánchez J, Storino R, Yu ZX, Denduchis B, Ferrans VJ. Antibodies to laminin and immunohistochemical localization of laminin in chronic chagasic cardiomyopathy: a review. *Mol Cell Biochem.* 1993;129(2):161-70.

Millar AE, Kahn SJ. The SA85-1.1 protein of the *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase superfamily is a dominant T-cell antigen. *Infect Immun.* 2000;68(6):3574-80.

Miller MJ, Wrightsman RA, Manning JE. *Trypanosoma cruzi*: protective immunity in mice immunized with paraflagellar rod proteins is associated with a T-helper type 1 response. *Exp Parasitol.* 1996;84(2):156-67.

Minoprio P, Eisen H, Joskowicz M, Pereira P, Coutinho A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *J Immunol.* 1987;139(2):545-50.

Minoprio PM, Eisen H, Forni L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scand J Immunol.* 1986;24(6):661-8.

Mombouli JV, Vanhoutte PM. Kinins and endothelial control of vascular smooth muscle. *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* 1995;35:679-705.

Monteiro AC, Schmitz V, Svensjo E, Gazzinelli RT, Almeida IC, Todorov A, de Arruda LB, Torrecilhas AC, Pesquero JB, Morrot A, Bouskela E, Bonomo A, Lima AP, Müller-Esterl W, Scharfstein J. Cooperative activation of TLR2 and bradykinin B2 receptor is required for induction of type 1 immunity in a mouse model of subcutaneous infection by *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol.* 2006;177(9):6325-35.

Moody TN, Ochieng J, Villalta F. Novel mechanism that *Trypanosoma cruzi* uses to adhere to the extracellular matrix mediated by human galectin-3. *FEBS Lett.* 2000;470(3):305-8.

Movat HZ. The plasma kallikrein-kinin system and its interrelationship with other components of blood. In: E. G. Erdös ed. Bradykinin, Kallidin and Kallikrein. New York: Springer-Verlag; 1979. p. 1-89.

Muller-Esterl W, Iwanaga S, Nakanishi S. Kininogens revisited. Trends Biochem Sci 1986;11:336-339.

Müller-Esterl W. Kininogens, kinins and kinships. Thromb Haemost. 1989;61(1):2-6.

Murphy-Ullrich JE. The de-adhesive activity of matricellular proteins: is intermediate cell adhesion an adaptive state? J Clin Invest. 2001;107(7):785-90.

Murta AC, Persechini PM, Padron Tde S, de Souza W, Guimarães JA, Scharfstein J. Structural and functional identification of GP57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. Mol Biochem Parasitol. 1990;43(1):27-38.

Nickel W. Unconventional secretory routes: direct protein export across the plasma membrane of mammalian cells. Traffic. 2005;6(8):607-14.

Nickell SP, Stryker GA, Arevalo C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. J Immunol. 1993;150(4):1446-57.

Nieminen J, Kuno A, Hirabayashi J, Sato S. Visualization of galectin-3 oligomerization on the surface of neutrophils and endothelial cells using fluorescence resonance energy transfer. J Biol Chem. 2007;282(2):1374-83.

Noisin EL, Villalta F. Fibronectin increases *Trypanosoma cruzi* amastigote binding to and uptake by murine macrophages and human monocytes. Infect Immun. 1989;57(4):1030-4.

Ochieng J, Leite-Browning ML, Warfield P. Regulation of cellular adhesion to extracellular matrix proteins by galectin-3. *Biochem Biophys Res Commun.* 1998;246(3):788-91.

Ortiz-Ortiz L, Ortega T, Capín R, Martínez T. Enhanced mononuclear phagocytic activity during *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1976;50(2):232-42.

Ouaissi MA, Cornette J, Afchain D, Capron A, Gras-Masse H, Tartar A. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science.* 1986;234(4776):603-7.

Owens MR, Cimino CD. Synthesis of fibronectin by the isolated perfused rat liver. *Blood.* 1982;59(6):1305-9.

Paegelow I, Werner H, Reissmann S. Effects of bradykinin and bradykinin analogues on spleen cells of mice. *Eur J Pharmacol.* 1995;279(2-3):211-6.

Pasquale CP, Martins MA, Bozza PT, Silva PM, Faria Neto HC, Pires AL, Cordeiro RS. Bradykinin induces eosinophil accumulation in the rat pleural cavity. *Int Arch Allergy Appl Immunol.* 1991;95(2-3):244-7.

Perillo NL, Marcus ME, Baum LG. Galectins: versatile modulators of cell adhesion, cell proliferation, and cell death. *J Mol Med.* 1998;76(6):402-12.

Phagoo SB, Poole S, Leeb-Lundberg LM. Autoregulation of bradykinin receptors: agonists in the presence of interleukin-1beta shift the repertoire of receptor subtypes from B2 to B1 in human lung fibroblasts. *Mol Pharmacol.* 1999;56(2):325-33.

Pick-Kober KH, Münker D, Gressner AM. Fibronectin is synthesized as an acute phase reactant in rat hepatocytes. *J Clin Chem Clin Biochem.* 1986;24(8):521-8.

Polosa R. Role of the kinin-kallikrein pathway in allergic diseases. *Allergy.* 1993;48(4):217-25.

Rabinovich GA, Baum LG, Tinari N, Paganelli R, Natoli C, Liu FT, Iacobelli S. Galectins and their ligands: amplifiers, silencers or tuners of the inflammatory response? *Trends Immunol.* 2002;23(6):313-20.

Rassi A Jr, Rassi A, Little WC, Xavier SS, Rassi SG, Rassi AG, Rassi GG, Hasslocher-Moreno A, Sousa AS, Scanavacca MI. Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas' heart disease. *N Engl J Med.* 2006;355(8):799-808.

Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. Fase Aguda In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 231.

Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. Fase Aguda In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 233.

Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. Fase Aguda In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 238.

Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. Fase Aguda In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 239.

Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. Fase Aguda In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 241.

Rassi A, Rassi Junior A, Rassi GG. Fase Aguda In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 242-243.

Ratner S. Lymphocyte migration through extracellular matrix. *Invasion Metastasis.* 1992;12(2):82-100.

Raz A, Zhu DG, Hogan V, Shah N, Raz T, Karkash R, Pazerini G, Carmi P. Evidence for the role of 34-kDa galactoside-binding lectin in transformation and metastasis. *Int J Cancer*. 1990;46(5):871-7.

Reed SG, Inverso JA, Roters SB. Heterologous antibody responses in mice with chronic *T. cruzi* infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin 2. *J Immunol*. 1984;133(3):1558-63.

Regoli D, Barabé J. Pharmacology of bradykinin and related kinins. *Pharmacol Rev*. 1980;32(1):1-46.

Regoli D, Nsa Allogho S, Rizzi A, Gobeil FJ. Bradykinin receptors and their antagonists. *Eur J Pharmacol*. 1998;348(1):1-10.

Reis DD, Jones EM, Tostes S Jr, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;48(5):637-44.

Reis DD, Jones EM, Tostes S, Lopes ER, Chapadeiro E, Gazzinelli G, Colley DG, McCurley TL. Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*. 1993;49(2):192-200.

Reis MM, Higuchi Mde L, Benvenuti LA, Aiello VD, Gutierrez PS, Bellotti G, Pileggi F. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial *Trypanosoma cruzi* antigens. *Clin Immunol Immunopathol*. 1997;83(2):165-72.

Ribeiro ALP, Rocha MOC. Forma Indeterminada da Doença de Chagas. In: Brener Z, Andrade ZA, Barral-Neto M, editors. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas. 2nd ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A.; 2000. p. 246-247.

Ribeiro-Dos-Santos R, Mengel JO, Postol E, Soares RA, Ferreira-Fernandez E, Soares MB, Pontes-De-Carvalho LC. A heart-specific CD4⁺ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. Parasite Immunol. 2001;23(2):93-101.

Ribeiro-dos-Santos R, Rossi MA, Laus JL, Silva JS, Savino W, Mengel J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. J Exp Med. 1992;175(1):29-39.

Rizzo LV, Cunha-Neto E, Teixeira AR. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4⁺ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. Infect Immun. 1989;57(9):2640-4.

Roberti RR, Martinez EE, Andrade JL, Araujo VL, Brito FS, Portugal OP, Horowitz SF. Chagas cardiomyopathy and captopril. Eur Heart J. 1992;13(7):966-70.

Rodell TC. The kallikrein/kinin system and kinin antagonists in trauma. Immunopharmacology. 1996;33(1-3):279-83.

Rodrigues MM, Ribeirão M, Pereira-Chioccola V, Renia L, Costa F. Predominance of CD4 Th1 and CD8 Tc1 cells revealed by characterization of the cellular immune response generated by immunization with a DNA vaccine containing a *Trypanosoma cruzi* gene. Infect Immun. 1999;67(8):3855-63.

Romaña C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral: Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad. Public MEPR 1935; 22:16-28.

Romeiro SA, Takehara HA, Mota I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. Clin Exp Immunol. 1984;55(2):413-8.

Rossi MA. Connective tissue skeleton in the normal left ventricle and in hypertensive left ventricular hypertrophy and chronic chagasic myocarditis. *Med Sci Monit.* 2001;7(4):820-32.

Rossi MA. Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int J Cardiol.* 1998;66(2):183-94.

Russo M, Starobinas N, Ribeiro-Dos-Santos R, Minoprio P, Eisen H, Hontebeyrie-Joskowicz M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* 1989;11(4):385-95.

Sacchettini JC, Baum LG, Brewer CF. Multivalent protein-carbohydrate interactions. A new paradigm for supermolecular assembly and signal transduction. *Biochemistry.* 2001;40(10):3009-15.

Sadigursky M, Acosta AM, Santos-Buch CA. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. *Am J Trop Med Hyg.* 1982;31(5):934-41.

Sadigursky M, Von Kreuter BF, Santos-Buch CA. Development of chagasic autoimmune myocarditis associated with anti-idiotypic reaction. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1988;83 Suppl 1:363-6.

Sanchez JA, Milei J, Yu ZX, Storino R, Wenthold R Jr, Ferrans VJ. Immunohistochemical localization of laminin in the hearts of patients with chronic chagasic cardiomyopathy: relationship to thickening of basement membranes. *Am Heart J.* 1993;126(6):1392-401.

Sano H, Hsu DK, Yu L, Apgar JR, Kuwabara I, Yamanaka T, Hirashima M, Liu FT. Human galectin-3 is a novel chemoattractant for monocytes and macrophages. *J Immunol.* 2000;165(4):2156-64.

Santana JM, Grellier P, Schr vel J, Teixeira AR. A *Trypanosoma cruzi*-secreted 80 kDa proteinase with specificity for human collagen types I and IV. *Biochem J.* 1997;325 (Pt 1):129-37.

Santos-Buch CA, Teixeira AR. The immunology of experimental Chagas' disease. 3. Rejection of allogeneic heart cells in vitro. *J Exp Med.* 1974;140(1):38-53.

Sato S, Hughes RC. Binding specificity of a baby hamster kidney lectin for H type I and II chains, polylectosamine glycans, and appropriately glycosylated forms of laminin and fibronectin. *J Biol Chem.* 1992;267(10):6983-90.

Savino W, Leite-de-Moraes MC, Hontebeyrie-Joskowicz M, Dardenne M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol.* 1989;19(9):1727-33.

Scharfstein J, Abrahamson M, de Souza CB, Barral A, Silva IV. Antigenicity of cystatin-binding proteins from parasitic protozoan. Detection by a proteinase inhibitor based capture immunoassay (PINC-ELISA). *J Immunol Methods.* 1995;182(1):63-72.

Scharfstein J, Morrot A. A role for extracellular amastigotes in the immunopathology of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1999;94 Suppl 1:51-63.

Scharfstein J, Rodrigues MM, Alves CA, de Souza W, Previato JO, Mendonça-Previato L. *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies. *J Immunol.* 1983;131(2):972-6.

Scharfstein J, Schmitz V, Morandi V, Capella MM, Lima AP, Morrot A, Juliano L, M ller-Esterl W. Host cell invasion by *Trypanosoma cruzi* is potentiated by activation of bradykinin B(2) receptors. *J Exp Med.* 2000;192(9):1289-300.

Scharfstein J, Schmitz V, Svensj  E, Granato A, Monteiro AC. Kininogens coordinate adaptive immunity through the proteolytic release of bradykinin, an

endogenous danger signal driving dendritic cell maturation. *Scand J Immunol.* 2007;66(2-3):128-36.

Scharfstein J. Parasite cysteine proteinase interactions with alpha2-macroglobulin or kininogens: differential pathways modulating inflammation and innate immunity in infection by pathogenic trypanosomatids. *Immunobiology.* 2006;211(1-2):117-25.

Schini VB, Boulanger C, Regoli D, Vanhoutte PM. Bradykinin stimulates the production of cyclic GMP via activation of B₂ kinin receptors in cultured porcine aortic endothelial cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 1990;252(2):581-5.

Schmaier AH, Rojkaer R, Shariat-Madar Z. Activation of the plasma kallikrein/kinin system on cells: a revised hypothesis. *Thromb Haemost.* 1999;82(2):226-33.

Schmaier AH. The physiologic basis of assembly and activation of the plasma kallikrein/kinin system. *Thromb Haemost.* 2004;91(1):1-3.

Schnapp AR, Eickhoff CS, Sizemore D, Curtiss R 3rd, Hoft DF. Cruzipain induces both mucosal and systemic protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. *Infect Immun.* 2002;70(9):5065-74.

Secretaria de Vigilância em Saúde/MS. Doença de Chagas. 2005. CID 10: B57 282-296.

Shigematsu S, Ishida S, Gute DC, Korthuis RJ. Bradykinin-induced proinflammatory signaling mechanisms. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2002;283(6):H2676-86.

Shigematsu S, Ishida S, Gute DC, Korthuis RJ. Concentration-dependent effects of bradykinin on leukocyte recruitment and venular hemodynamics in rat mesentery. *Am J Physiol.* 1999;277(1 Pt 2):H152-60.

Shigematsu S, Ishida S, Gute DC, Korthuis RJ. Postischemic anti-inflammatory effects of bradykinin preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 2001;280(1):H441-54.

Silva JA Jr, Araujo RC, Baltatu O, Oliveira SM, Tschöpe C, Fink E, Hoffmann S, Plehm R, Chai KX, Chao L, Chao J, Ganten D, Pesquero JB, Bader M. Reduced cardiac hypertrophy and altered blood pressure control in transgenic rats with the human tissue kallikrein gene. *FASEB J*. 2000;14(13):1858-60.

Silva-Barbosa SD, Cotta-de-Almeida V, Riederer I, De Meis J, Dardenne M, Bonomo A, Savino W. Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *J Immunol*. 1997;159(2):997-1003.

Silva-Barbosa SD, Savino W. The involvement of laminin in anti-myocardial cell autoimmune response in murine Chagas disease. *Dev Immunol*. 2000;7(2-4):293-301.

Silva-Monteiro E, Reis Lorenzato L, Kenji Nihei O, Junqueira M, Rabinovich GA, Hsu DK, Liu FT, Savino W, Chammas R, Villa-Verde DM. Altered expression of galectin-3 induces cortical thymocyte depletion and premature exit of immature thymocytes during *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Pathol*. 2007;170(2):546-56.

Soares MB, Pontes-De-Carvalho L, Ribeiro-Dos-Santos R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. *An Acad Bras Cienc*. 2001;73(4):547-59.

Spinella S, Milon G, Hontebeyrie-Joskowicz M. A CD4⁺ TH2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response in vivo. *Eur J Immunol*. 1990;20(5):1045-51.

Steranka LR, Manning DC, DeHaas CJ, Ferkany JW, Borosky SA, Connor JR, Vavrek RJ, Stewart JM, Snyder SH. Bradykinin as a pain mediator: receptors are

localized to sensory neurons, and antagonists have analgesic actions. Proc Natl Acad Sci U S A. 1988;85(9):3245-9.

Sterin-Borda L, Gorelik G, Borda ES. Chagasic IgG binding with cardiac muscarinic cholinergic receptors modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals. Clin Immunol Immunopathol. 1991;61(3):387-97.

Stoka V, Nycander M, Lenarcic B, Labriola C, Cazzulo JJ, Björk I, Turk V. Inhibition of cruzipain, the major cysteine proteinase of the protozoan parasite, *Trypanosoma cruzi*, by proteinase inhibitors of the cystatin superfamily. FEBS Lett. 1995;370(1-2):101-4.

Swarte VV, Mebius RE, Joziassse DH, Van den Eijnden DH, Kraal G. Lymphocyte triggering via L-selectin leads to enhanced galectin-3-mediated binding to dendritic cells. Eur J Immunol. 1998;28(9):2864-71.

Sztejn MB, Cuna WR, Kierszenbaum F. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. J Immunol. 1990;144(9):3558-62.

Tardieux I, Webster P, Ravesloot J, Boron W, Lunn JA, Heuser JE, Andrews NW. Lysosome recruitment and fusion are early events required for trypanosome invasion of mammalian cells. Cell. 1992;71(7):1117-30.

Tarleton RL, Koller BH, Latour A, Postan M. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. Nature. 1992;356(6367):338-40.

Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. Infect Immun. 1994;62(5):1820-9.

Tarleton RL, Zhang L, Downs MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. Proc Natl Acad Sci U S A. 1997;94(8):3932-7.

Tarleton RL. Chagas disease: a role for autoimmunity? Trends Parasitol. 2003;19(10):447-51.

Tarleton RL. Immune system recognition of *Trypanosoma cruzi*. Curr Opin Immunol. 2007;19(4):430-4.

Tarleton RL. Tumour necrosis factor (cachectin) production during experimental Chagas' disease. Clin Exp Immunol. 1988;73(2):186-90.

Teixeira AR, Nascimento RJ, Sturm NR. Evolution and pathology in chagas disease--a review. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2006;101(5):463-91.

Teixeira AR, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. II. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigens. Immunology. 1975;28(3):401-10.

Teixeira AR, Teixeira ML, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. Am J Pathol. 1975;80(1):163-80.

Tiffany CW, Burch RM. Bradykinin stimulates tumor necrosis factor and interleukin-1 release from macrophages. FEBS Lett. 1989;247(2):189-92.

Toda N, Bian K, Akiba T, Okamura T. Heterogeneity in mechanisms of bradykinin action in canine isolated blood vessels. Eur J Pharmacol. 1987;135(3):321-9.

Toscano MA, Illarregui JM, Bianco GA, Campagna L, Croci DO, Salatino M, Rabinovich GA. Dissecting the pathophysiologic role of endogenous lectins: glycan-binding proteins with cytokine-like activity? Cytokine Growth Factor Rev. 2007;18(1-2):57-71.

Tostes Júnior S, Lopes ER, Pereira FE, Chapadeiro E. Human chronic chagasic myocarditis: quantitative study of CD4+ and CD8+ lymphocytes in inflammatory exudates. Rev Soc Bras Med Trop. 1994;27(3):127-34.

Tousignant C, Dion S, Drapeau G, Regoli D. Characterization of pre- and postjunctional receptors for neurokinins and kinins in the rat vas deferens. *Neuropeptides*. 1987;9(4):333-43.

Ulrich H, Alves MJ, Colli W. RNA and DNA aptamers as potential tools to prevent cell adhesion in disease. *Braz J Med Biol Res*. 2001;34(3):295-300.

Ulrich H, Magdesian MH, Alves MJ, Colli W. In vitro selection of RNA aptamers that bind to cell adhesion receptors of *Trypanosoma cruzi* and inhibit cell invasion. *J Biol Chem*. 2002;277(23):20756-62.

Urbina JA, Docampo R. Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances. *Trends Parasitol*. 2003;19(11):495-501.

Van Overtvelt L, Vanderheyde N, Verhasselt V, Ismaili J, De Vos L, Goldman M, Willems F, Vray B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. *Infect Immun*. 1999;67(8):4033-40.

Vasta GR, Ahmed H, Odom EW. Structural and functional diversity of lectin repertoires in invertebrates, protochordates and ectothermic vertebrates. *Curr Opin Struct Biol*. 2004;14(5):617-30.

Villa-Verde DM, Silva-Monteiro E, Jasiulionis MG, Farias-De-Oliveira DA, Brentani RR, Savino W, Chammas R. Galectin-3 modulates carbohydrate-dependent thymocyte interactions with the thymic microenvironment. *Eur J Immunol*. 2002;32(5):1434-44.

Vray B, Camby I, Vercruysse V, Mijatovic T, Bovin NV, Ricciardi-Castagnoli P, Kaltner H, Salmon I, Gabius HJ, Kiss R. Up-regulation of galectin-3 and its ligands by *Trypanosoma cruzi* infection with modulation of adhesion and migration of murine dendritic cells. *Glycobiology*. 2004;14(7):647-57.

Weber KT, Brilla CG, Janicki JS. Myocardial fibrosis: functional significance and regulatory factors. *Cardiovasc Res*. 1993;27(3):341-8.

Wirth JJ, Kierszenbaum F. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. J Immunol. 1984;133(1):460-4.

Wirth K, Hock FJ, Albus U, Linz W, Alpermann HG, Anagnostopoulos H, Henk S, Breipohl G, König W, Knolle J, et al. Hoe 140 a new potent and long acting bradykinin-antagonist: in vivo studies. Br J Pharmacol. 1991;102(3):774-7.

Woolsey AM, Sunwoo L, Petersen CA, Brachmann SM, Cantley LC, Burleigh BA. Novel PI 3-kinase-dependent mechanisms of trypanosome invasion and vacuole maturation. J Cell Sci. 2003;116:3611-22.

World Health Organization. Control of Chagas disease. Geneva: World Health Organization; 2002. (Technical Report Series, 905).

XI Reunión de INCOSUR/Chagas. Asunción, Paraguay; Março de 2002.

Yamada KM. Cell surface interactions with extracellular materials. Annu Rev Biochem. 1983;52:761-99.

Yamaoka A, Kuwabara I, Frigeri LG, Liu FT. A human lectin, galectin-3 (epsilon bp/Mac-2), stimulates superoxide production by neutrophils. J Immunol. 1995;154(7):3479-87.

Zacks MA, Wen JJ, Vyatkina G, Bhatia V, Garg N. An overview of chagasic cardiomyopathy: pathogenic importance of oxidative stress. An Acad Bras Cienc. 2005;77(4):695-715.

Zhang L, Tarleton RL. Persistent production of inflammatory and anti-inflammatory cytokines and associated MHC and adhesion molecule expression at the site of infection and disease in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. Exp Parasitol. 1996;84(2):203-13.

Zingales B, Andrews NW, Kuwajima VY, Colli W. Cell surface antigens of *Trypanosoma cruzi*: possible correlation with the interiorization process in mammalian cells. Mol Biochem Parasitol. 1982;6(2):111-24.

Zingales B, Souto RP, Mangia RH, Lisboa CV, Campbell DA, Coura JR, Jansen A, Fernandes O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. Int J Parasitol. 1998;28(1):105-12.