

# PATOLOGIA EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE CHAGAS

Sonia G. Andrade

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO
2. PATOLOGIA EXPERIMENTAL NO MODELO DO CAMUNDONGO
  - 2.1. Fase Aguda da Infecção pelo *T. cruzi*
  - 2.2. Fase Crônica da Infecção pelo *T. cruzi*
  - 2.3. Alterações do Sistema Nervoso Autônomo no Modelo do Camundongo
3. PATOLOGIA EXPERIMENTAL NO MODELO CANINO
  - 3.1. Alterações Histopatológicas na Fase Aguda da Infecção no Cão
  - 3.2. Alterações Histopatológicas na Fase Crônica Indeterminada do Cão
  - 3.3. A Cardiopatia Crônica no Modelo Experimental Canino
  - 3.4. Investigação dos Mecanismos Patogênicos no Modelo Canino
4. OUTROS MODELOS EXPERIMENTAIS
  - 4.1. Ratos
  - 4.2. Coelhos
  - 4.3. Primatas
  - 4.4. Cobaios
  - 4.5. O *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae)
5. CONCLUSÃO
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Além dos referidos, têm sido utilizados por diversos pesquisadores outros vertebrados, como coelhos, ratos, camundongos e alguns hospedeiros silvestres, a fim de investigar diferentes aspectos da infecção pelo *T. cruzi*, com resultados variáveis e características peculiares. Tendo em vista o estudo da patologia experimental, abordaremos com mais detalhes, no presente capítulo, os aspectos que têm sido estudados em dois modelos: o camundongo e o cão. Outros modelos de patologia experimental têm fornecido interessantes contribuições para o esclarecimento de pontos específicos, tendo um uso menos generalizado e, desse modo, serão abordados ao final deste capítulo.

O camundongo, pelo seu pequeno porte, facilidade de obtenção e de manutenção, tem sido o animal preferido em um grande número de experimentos. O cão, pela sua suscetibilidade à infecção pelo *T. cruzi*, pelas características eletrocardiográficas comparáveis às do homem, bem como pela definição e caracteres anatômicos do sistema excitocondutor do coração, constitui-se em um importante modelo da doença de Chagas.

Em geral, a escolha de um modelo experimental depende, diretamente, do problema a ser investigado e do conhecimento prévio das potencialidades da sua resposta. Muitas vezes, entretanto, procura-se estabelecer a evolução da infecção em diferentes espécies animais, com o objetivo de identificar peculiaridades da resposta ao parasito que permitam esclarecer aspectos obscuros, ainda não respondidos em outros modelos.

Tendo como objetivo estudar a patologia experimental da doença de Chagas, a escolha deverá recair em animais que apresentem suscetibilidade ao parasito, desenvolvam uma fase aguda e possam controlar a infecção através de seus mecanismos imunológicos, possibilitando assim a evolução natural da doença para uma fase crônica.

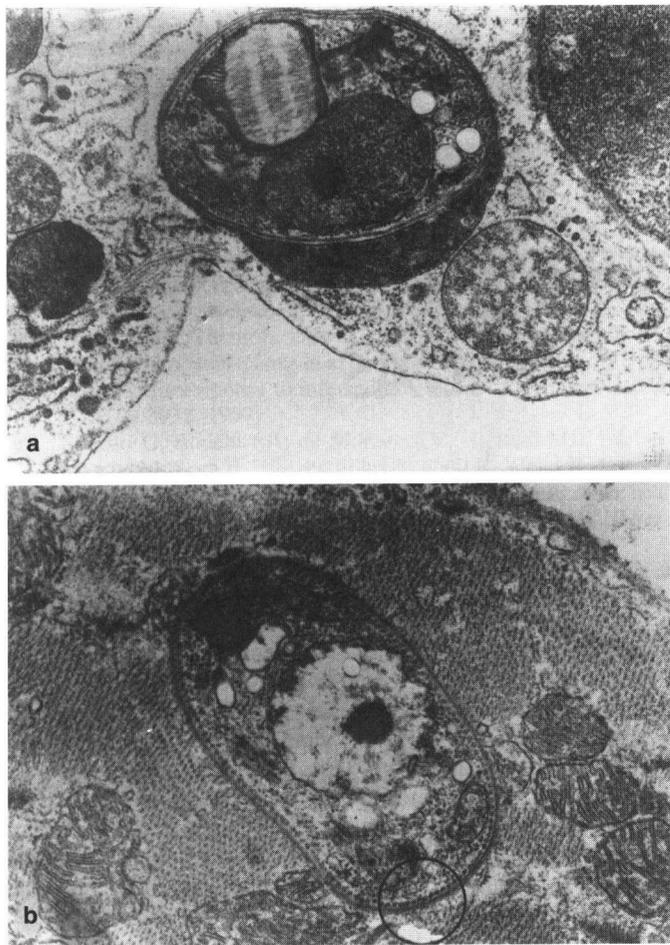
## 2. PATOLOGIA EXPERIMENTAL NO MODELO DO CAMUNDONGO

### 2.1. Fase Aguda da Infecção pelo *T. cruzi*

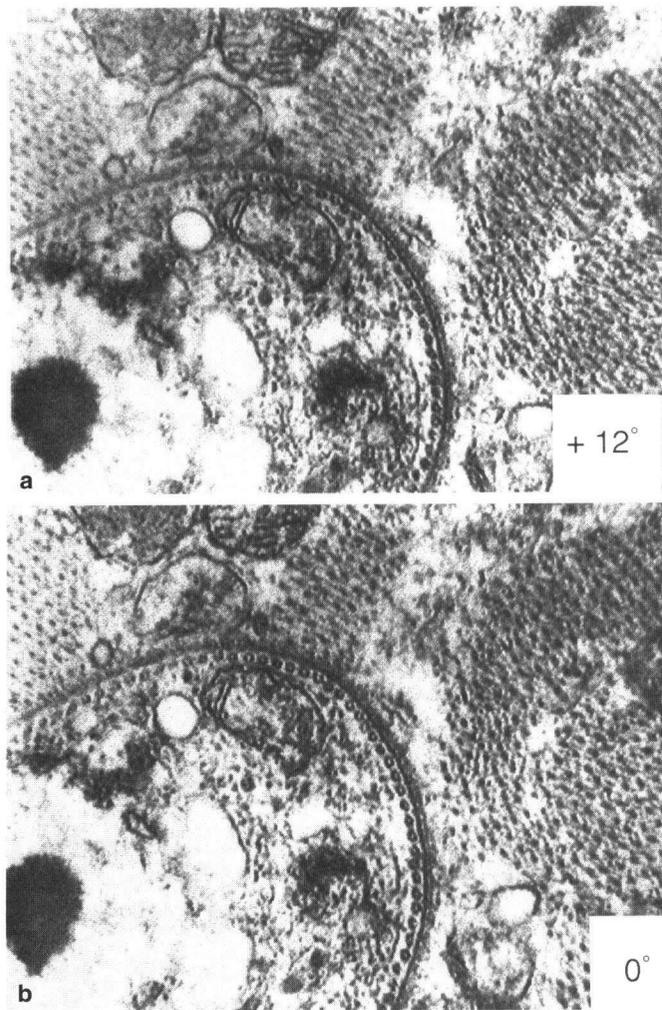
As relações parasito/hospedeiro, na infecção de vertebrados pelo *T. cruzi*, são caracterizadas pela multiplicação intracelular

## 1. INTRODUÇÃO

Desde os estudos iniciais de Chagas,<sup>1</sup> há referências à inoculação de várias espécies animais, como cães, cobaios e macacos (*Callithrix penicillata*) com o *Trypanosoma cruzi*, como um meio de estudar a evolução da infecção em diferentes vertebrados.



**Figura 1 (a, b)** Aspectos ultra-estruturais do parasitismo celular pelo *T. cruzi*, em fase precoce de invasão celular, observando-se em: **a**-forma amastigota única, com cinetoplasto balonizando, no interior de vacúolo fagolisossômico de macrófago, indicando fagocitose; **b**-forma amastigota única, no citoplasma de miócélula cardíaca, em íntimo contato com as miofibrilas e organelas citoplasmáticas, sem formação de vacúolo, indicando uma penetração ativa.



**Figura 2 (a, b)** Detalhe da forma amastigota intracelular vista na Figura 1b, analisada à platina goniométrica, a 0° de inclinação e a um ângulo de +12°, mostrando ausência de membrana ou de vacúolo fagolisossômico e integridade das miofibrilas. O parasito mostra núcleo volumoso e nítidos microtúbulos na superfície.

e evolução das formas parasitárias, pelas alterações das células parasitadas e pela resposta imunológica, com o seu componente inflamatório. O *T. cruzi*, em suas formas metacíclicas infectantes, penetra no organismo através de diferentes vias ou são inoculados experimentalmente. Os macrófagos fagocitam ativamente os parasitos após a sua penetração, com formação de um vacúolo fagolisossômico (Figura 1a) do qual eles escapam e se multiplicam no citosol. Com o progresso da infecção, os macrófagos são ativados por diferentes citocinas, dependentes de uma resposta CD4,<sup>2</sup> sendo muito importante o papel do IFN  $\gamma$ ,<sup>3-5</sup> com acentuada produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, O<sub>2</sub> e OH<sup>-</sup> e de metabólitos do óxido nítrico (NO)<sup>6,7</sup> e destruição parasitária intracelular. Além dos fatores citados, os linfócitos CD8 são também capazes de produzir citocinas que ativam os macrófagos na destruição dos parasitos intracelulares.<sup>8,9</sup> Desse modo, os macrófagos estimulados são os elementos mais importantes para que o organismo do vertebrado possa controlar a multiplicação parasitária. Nem sempre os macrófagos controlam a infecção, e os parasitos entram na microcirculação, sendo então de novo fagocitados, ou penetram ativamente em células não-fagocíticas, como as células cardíacas. A interiorização do parasito em células não-fagocíticas, como o

músculo esquelético ou cardíaco, faz-se através de um mecanismo complexo do qual participam ligantes diversos, permitindo a adesão do parasito à célula do hospedeiro. Na forma infectante do *T. cruzi*, foi identificada uma glicoproteína de superfície contendo N-acetyl-D-glicosamina, denominada Tc-85,<sup>10</sup> a qual faz parte de uma família de moléculas cuja função está relacionada com a adesão do parasito a componentes do hospedeiro,<sup>11</sup> inclusive com a laminina.<sup>12</sup> Em estudos de Schenkman et al.,<sup>13,14</sup> foram descritas glicoproteínas de 85 kD e de 82 a 90 kD, que fazem parte da família GP85, inclusive receptores para fibronectina e laminina e a transialidase, também envolvidas no processo de adesão. Quando as formas tripomastigotas emergem da célula do hospedeiro, contêm pouco ou nenhum ácido siálico. Entretanto, ao entrarem na circulação, expressam a atividade de transialidase na superfície, transferindo o ácido siálico da superfície da célula hospedeira para a superfície do parasito, gerando um epítipo (Ss-p3) que está envolvido na penetração dos tripomastigotas nas células do hospedeiro.<sup>13,14</sup>

Em estudo ultra-estrutural do coração de camundongos infectados, foi verificado, por Grimaud e Andrade,<sup>15</sup> que o parasito, logo

após a penetração na célula cardíaca, ainda em fase de pré-divisão, não está contido em vacúolo fagocítico (Figura 1b), como demonstrado ao estudo com platina goniométrica (Figura 2a, b), o que fala a favor de uma penetração ativa, não mediada por fagocitose, em células não-fagocíticas. Em músculo cardíaco e esquelético, os parasitos multiplicam-se livremente no citoplasma celular, formando grandes acúmulos parasitários, com manutenção da estrutura normal das miofibrilas e das organelas citoplasmáticas, havendo o afastamento das estruturas da célula, aparentemente sem lesá-las (Figura 3). Os estudos iniciais de Mayer e Rocha Lima,<sup>16</sup> analisando a ação do parasito sobre a célula, mostram que o seu desenvolvimento normal não lesa a célula parasitada, o que só ocorre quando os parasitos se rompem. Entretanto, à base de estudos ao microscópio eletrônico, em miocárdio de camundongos experimentalmente infectados, vários autores<sup>17-21</sup> se referem à presença de vacúolo lítico no citoplasma, relacionado com o acúmulo de parasitos intracelulares, o que, provavelmente, decorre da fase em que foram estudados, provavelmente na dependência de formas que já estão em uma fase de degradação.

Foi demonstrado, por Grimaud e Andrade,<sup>15</sup> que a integridade das miocélulas cardíacas está preservada mesmo na presença de ninho parasitário, contendo numerosos parasitos, com estrutura normal, em contato direto com as miofibrilas e as organelas intracelulares (Figura 3). Pelo contrário, a presença de formas parasitárias em desintegração determina alterações das células parasitadas, levando à sua necrose e induzindo ao aparecimento do infiltrado inflamatório. Os parasitos intracelulares multiplicam-se ativamente por divisão binária das formas amastigotas, evoluindo para formas flageladas; por vezes, sofrem degeneração espontânea, determinando alterações focais da célula parasitada. Experimentalmente, pôde-se avaliar melhor a influência da destruição parasitária intracelular nas miocélulas cardíacas pelo tratamento de camundongos com drogas anti-*T. cruzi* em uma fase precoce de infecção.<sup>22</sup> Em estudos anteriores,<sup>23</sup> foi demonstrado que os quimioterápicos Benzonidazol e Nifurtimox atuam sobre as formas parasitárias intracelulares, determinando a sua destruição. Aos estudos ao microscópio eletrônico, Andrade e Freitas<sup>22</sup> observaram, nos camundongos tratados, intensas alterações dos parasitos intracelulares, caracterizadas por vacuo-

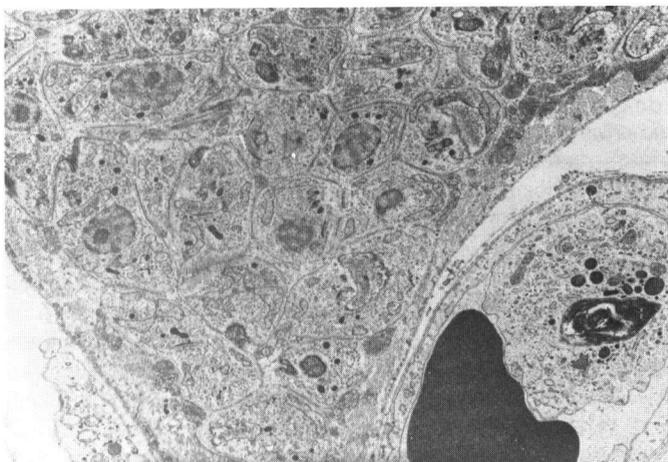
lização citoplasmática, tumefação mitocondrial, enrugamento da membrana, as quais coincidiram com lesões das miocélulas cardíacas, com lise citoplasmática em torno dos parasitos desintegrados, condensação nuclear e citoplasmática e tumefação mitocondrial. Essas alterações progredem para a ruptura da célula e aparecimento de infiltrado de macrófagos e linfócitos, com a presença também de polimorfonucleares neutrófilos. Desse modo, a liberação de produtos antigênicos do parasito no interstício determina uma inflamação aguda devido à formação local de complexos antígeno/anticorpos, como foi comprovado por Silva et al.<sup>24</sup> Estudando as lesões necróticas-inflamatórias em músculos de camundongos na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, procuraram esses autores verificar se complexos imunes estariam envolvidos na patogênese das lesões, tendo verificado depósitos de imunoglobulinas e complemento, e detectado a presença de complexos imunes no soro, concomitante com uma queda do complemento. Esses achados indicam que complexos imunes participam da patogênese das lesões necróticas-inflamatórias observadas na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Entretanto, foi observado, no modelo murino, que as lesões difusas do miocárdio e as lesões de fibras cardíacas não-parasitadas estão ligadas aos mecanismos de imunidade celular desde a fase aguda.<sup>25</sup> Há evidências de que a supressão de células CD4 pelo tratamento com anticorpo monoclonal anti-CD4 aumenta o parasitismo tissular e a parasitemia,<sup>26</sup> e foi verificado que a inativação das células T helper determina um aumento do parasitismo concomitante com diminuição do processo inflamatório.<sup>27</sup> O tratamento com anticorpos monoclonais anti-L3T4, Thy1.2, NK-1.1, *in vivo*, interfere no controle da parasitemia e impede o desenvolvimento de anticorpos específicos anti-*T. cruzi*.<sup>28</sup>

Os processos patogênicos das lesões na fase aguda da infecção, no camundongo, são complexos e nele estão envolvidos o parasito, sua multiplicação e morte intracelular e os mecanismos imunológicos a nível humoral e celular, levando às lesões características dessa fase.

### 2.1.1. Relação entre as Cepas do Parasito e os Quadros Histopatológicos

O *T. cruzi*, pelas suas características biológicas e genéticas, constituindo-se em cepas ou subespécies, pode ter comportamentos peculiares quando inoculado em animais experimentais. Em seus trabalhos iniciais, Brener<sup>29</sup> e Brener e Chiari,<sup>30</sup> considerando critérios morfológicos, a evolução da parasitemia e o tropismo tissular,<sup>31</sup> descreveram as cepas Y e CL<sup>29</sup> como cepas "polares". A caracterização morfológica e histopatológica de cepas do *T. cruzi*, proposta por Andrade,<sup>31,32</sup> foi feita através da análise do comportamento em camundongos Suíços, na fase aguda da infecção, de isolados do parasito de diferentes fontes (casos humanos, triatomíneos naturalmente infectados, reservatórios silvestres etc.). Essa análise permitiu estabelecer os tipos de cepas ou *biodemas*, designados como Tipos I, II, III, os quais apresentam uma correlação com os perfis isoenzimáticos descritos por Miles,<sup>33</sup> como foi demonstrado, ao estudo bioquímico das cepas, por Andrade et al.<sup>34</sup>

Basicamente, as alterações tissulares predominantes dependem do tropismo da cepa e, conseqüentemente, do maior grau de parasitismo dos diferentes setores do organismo.<sup>31,32</sup> Desse modo, na infecção com cepas do Tipo I, observa-se, nas fases iniciais, até 10 dias pós-infecção, parasitismo dos macrófagos em vários setores do organismo, principalmente em órgãos como o baço, fígado e linfonodos e no tecido conjuntivo intersticial, onde, além de macrófagos, são identificados adipócitos, com denso



**Figura 3** Miocélula cardíaca contendo acúmulo intracitoplasmático de formas amastigotas integras do *T. cruzi*: as formas parasitárias dissociam as miofibrilas pela expansão do ninho parasitário, porém não há lesões das organelas citoplasmáticas.

parasitismo.<sup>35</sup> Na fase mais avançada da infecção aguda, é evidente o miotropismo, com lesões inflamatórias de miocárdio, músculo esquelético e músculo liso das paredes intestinais, com envolvimento de plexos mioentéricos e lesões neuronais.

Na infecção com as cepas de Tipo II, cuja parasitemia tem um curso mais lento entre o 12.º e o 20.º dia, as lesões predominantes ocorrem no miocárdio, na fase aguda, com acentuado parasitismo das células cardíacas, evoluindo para a destruição dos miócitos parasitados e necrose dos não-parasitados, com intenso processo de miocardite. Em menor grau, há também lesões de músculo esquelético e de músculos lisos, com envolvimento de plexos nervosos mioentéricos.

Na infecção com as cepas de Tipo III, cuja parasitemia evolui lentamente, atingindo níveis elevados aos 30 dias, há nítido miotropismo, principalmente com envolvimento de músculo esquelético, desenvolvendo-se extensas lesões de fibras musculares esqueléticas e intenso processo inflamatório, lesões de arterite e periarterite, com necrose de parede vascular. As lesões miocárdicas são também proeminentes.

Levando-se em consideração que as cepas do *T. cruzi* são multiclonais e podem apresentar populações homogêneas ou heterogêneas, com a predominância de "clones principais", de acordo com Tibayrenc e Ayala,<sup>36</sup> foi sugerido por Campos et al.<sup>37</sup>, tendo como base o estudo molecular dos clones da cepa 21SF proveniente de São Felipe, BA, que a presença de um clone principal, circulando em uma mesma área endêmica, pode ser responsável pelo quadro clínico-patológico da doença nessa área. Isolando os clones de uma cepa do Brasil Central, originária de um paciente com megalosofago, Lauria-Pires et al.<sup>38</sup> identificaram, na cepa parental e nos clones, o mesmo zimodema (Z2). Recentemente foi sugerido por Macedo e Pena<sup>39</sup> um "modelo clonal-histotrópico", levando em conta que diferentes clones de uma cepa podem apresentar tropismo para diferentes tecidos, decorrente das interações moleculares na superfície celular entre o clone invasor e os tecidos do hospedeiro.

### 2.1.2. Importância da Linhagem dos Camundongos na Resistência e Suscetibilidade à Infecção pelo *T. cruzi*

Atualmente tem sido dada muita ênfase à utilização de camundongos de linhagens isogênicas, com a preocupação de obter

infecções padronizadas, garantidas pelo padrão genético. Trischman et al.<sup>40</sup> estudaram a suscetibilidade de camundongos de diferentes linhagens isogênicas à infecção pelo *T. cruzi*. Utilizaram nesse estudo as linhagens C57BL/10 (B-10), CBA, AKR, C3H/He, CBA/2 e BALB/c além de camundongos atímicos. A infecção foi feita com a cepa Brasil. Observaram maior suscetibilidade do camundongo C3H, média suscetibilidade dos camundongos BALB/c e mais resistência com os B10. Os atímicos apresentaram as mais altas parasitemias; não observaram essa relação da resistência com o H-2 (haplotipo), observado pelo exame das cepas congênicas que a resistência está ligada ao padrão genético. Boyer et al.<sup>41</sup> comprovaram a importância do padrão genético ao estudarem a infecção em camundongos portadores de um único gen *lpr*, ligado à linfoproliferação e que controla certas reações auto-imunes, observando que a mortalidade e a parasitemia eram mais elevadas nessas linhagens após a infecção com a cepa Y do *T. cruzi*.

A interação de diferentes linhagens isogênicas de camundongos com os três tipos biológicos de cepas do *T. cruzi* ou *biodemas* foi investigada em camundongos de seis diferentes linhagens: AKR, A/J, CBA, BALB/c, C3H e B-10, os quais foram inoculados com as cepas Peruana, 21SF e Colombiana.<sup>42-44</sup> Basicamente, o comportamento biológico dos três biodemas foi mantido nos animais de diferentes linhagens, variando, entretanto, em relação aos índices de parasitemia e de mortalidade, maiores ou menores de acordo com a suscetibilidade das linhagens, porém com um mesmo padrão de evolução. Avaliando-se a resistência desses animais na infecção por cada um dos tipos de cepas do *T. cruzi*, através da análise da variância, estabeleceu-se um espectro de resistência de cada linhagem frente à infecção pelas diferentes cepas, observando-se que uma mesma linhagem pode ser mais resistente a uma determinada cepa e mais suscetível a outra, embora, de uma maneira geral, as linhagens CBA e B-10 tenham se mostrado as mais resistentes e A/J e AKR as mais suscetíveis<sup>43</sup> (Tabelas 1 e 2).

O quadro histopatológico nas diferentes linhagens de camundongos, com maior ou menor grau de resistência, mostrou diferentes graus de lesão e de parasitismo dos tecidos, sendo as lesões mais acentuadas nos animais mais suscetíveis.<sup>44</sup> Além disso, foram observadas lesões peculiares de acordo com a linhagem do camundongo. Nesse particular, a cepa 21SF (Tipo II) determinou lesões inflamatórias que variaram de intensidade

**Tabela 1** Resistência de seis linhagens isogênicas de camundongo à infecção por três cepas do *Trypanosoma cruzi*

Linhagem dos camundongos	Cepas do <i>T. cruzi</i>				
	Peruana		21 SF		Colombiana
	Sobrevida*	Linhagem dos camundongos	Sobrevida*	Linhagem dos camundongos	Sobrevida*
DBA/1	14,3	B-10	200	DBA/1	83,3
B-10	12,5	DBA/1	200	C3H	38,5
BALB/c	12,5	BALB/c	90,9	B/10	26,3
A/J	12,5	C3H	33,3	BALB/c	23,3
C3H	12,5	A/J	33,3	AKR	21,3
AKR	11,1	AKR	14,3	A/J	20,8
P	>0,05		< 0,05		< 0,05

\*O tempo médio de sobrevida em dias representa a média harmônica da mortalidade estatisticamente calculada e comparada pelo teste de variância.

**Tabela 2** Média das parasitemias\* de seis linhagens isogênicas de camundongos infectados com três tipos de cepas do *Trypanosoma cruzi*

Cepas do <i>T. cruzi</i>	Linhagens dos camundongos						
	DBA	B-10	BALB/c	C3H	A/J	AKR	P
Peruana (Tipo I)	29,5	57,5	63,1	27,5	56,2	239,9	< 0,01
21 SF (Tipo II)	38,9	8,5	56,2	18,6	5,6	15,5	NS
Colombiana (Tipo III)	9,8	24,6	63,1	20,0	24,0	19,5	< 0,05

\*Média do número de parasitos em 50 campos (400 ×) obtido em diversas contagens no curso da infecção. O cálculo de P foi feito pela análise da variância usando os dados logarítmicos.

de e de constituição celular de uma linhagem para outra, com acentuadas lesões necróticas de músculo esquelético, independentemente do grau de parasitismo. Nas linhagens A/J e AKR, a necrose de fibra muscular não-parasitada ocorre sem reação, ou apenas com infiltrado mononuclear; nas linhagens DBA, BALB/c e B-10, corresponde a intenso processo inflamatório com mononucleares e polimorfonucleares neutrófilos. Na infecção com a cepa Colombiana, as lesões foram semelhantes nas seis linhagens, variando apenas o grau de parasitismo e a intensidade do processo inflamatório. Além das linhagens de camundongos que apresentam um padrão imunológico convencional, outros estudos têm sido desenvolvidos utilizando linhagens com deficiências e peculiaridades em diversos setores da resposta imunológica, permitindo uma série de testes em geral relacionados com os setores de resposta linfocitária e de produção de citocinas. Utilizando a linhagem isogênica recombinante BXH2, observou Trischman<sup>45</sup> a incapacidade de controlar a parasitemia, que foi significativamente maior aos 4-5 dias de infecção nessa linhagem do que em camundongos suscetíveis. Utilizando camundongos BALB.Xid (que são portadores de uma mutação ligada ao cromossoma X e deficientes em células CD5 B), Minoprio et al.<sup>46</sup> constataram baixa resposta de células B à infecção pelo *T. cruzi*, com baixos níveis de imunoglobulinas específicas e não-específicas no soro; entretanto, esses animais controlam a parasitemia e quase não desenvolvem lesões na fase crônica recente. Esses resultados indicam que o locus Xid controla a resposta linfocitária, o clearance parasitário e a patologia na infecção experimental pelo *T. cruzi*. Pela hibridização *in situ* e pela reação do PCR, foi comparada a expressão dos genes IL no baço de camundongos Balb/c e Balb.Xid, evidenciando que estes últimos produzem níveis mais elevados de IFN $\gamma$ , IL-2 e IL-4, porém menores níveis de IL-10.<sup>47</sup>

Em recente revisão sobre o controle genético da infecção pelo *T. cruzi*, DeTitto<sup>48</sup> postulou que, embora a resposta imune tenha importante papel na resistência, em conjunto, a sobrevida está mais relacionada com o padrão genético dos animais do que com os produtos do locus H-2 (sistema de antígenos de histocompatibilidade do camundongo). A sobrevida não estaria relacionada com o número de parasitos circulantes,<sup>49</sup> tendo sido descrito um gen relacionado com a sobrevida, que se liga no complexo H-2, ou muito próximo a este, sendo particularmente importante o haplotipo H-2s. O controle da parasitemia e da resistência/sensibilidade ao *T. cruzi* compromete genes dentro e fora do locus H-2, provavelmente como fenômenos independentes.<sup>48</sup> Desse modo, a resistência do camundongo à infecção aguda pelo *T. cruzi* é governada por múltiplos componentes genéticos dentro e fora do H-2. O resultado da infecção depende das características do parasito infectante e da combinação de alelos presentes

em cada linhagem de camundongo, incluindo fatores imunológicos e não-imunológicos.

As diferentes cepas do *T. cruzi* podem determinar diferentes respostas imunológicas no animal experimental, o que foi demonstrado em camundongos Suíços e em camundongos isogênicos inoculados com as cepas dos diferentes *biodesmas* (Peruana, 12 SF e Colombiana). Verificou-se, em camundongos Suíços, não-isogênicos,<sup>50</sup> que, embora basicamente as três cepas determinem o mesmo tipo de reação, traduzida pela elevação das imunoglobulinas (IgG2a,b e IgM), com queda inicial de IgG1, intensa celularidade do baço, com diferenciação plasmocítica e depleção do setor T, essas alterações foram nitidamente diferentes entre os três tipos de cepas no que diz respeito ao seu início, intensidade e evolução. Os níveis mais elevados de IgG2b foram detectados com a cepa 12 SF; os níveis de IgM foram mais elevados na infecção pela cepa Colombiana e mais baixos com a cepa Peruana, enquanto não houve diferenças significantes da IgG2a. A correlação entre os níveis de IgG, parasitemia e mortalidade também foi variável com as diferentes cepas. Ao analisar a resposta sorológica específica nesses animais, verificaram-se baixos níveis de anticorpos anti-*T. cruzi*, e o teste cutâneo com antígenos parasitários foi negativo. Os anticorpos específicos anti-*T. cruzi* não foram detectados na fase aguda precoce da infecção, positivando em títulos baixos (1:2 a 1:8) entre 10-16 dias, nos camundongos infectados com a cepa Peruana (Tipo I), de 16 a 24 dias com a cepa 12 SF (Tipo II) e em títulos mais elevados (1:32), de 24 a 30 dias, com a cepa Colombiana. Os testes cutâneos de hipersensibilidade tardia permanecem negativos nessa fase, usando-se como antígenos formas epimastigotas de cultura ou antígenos solúveis obtidos após diálise e liofilização.<sup>50</sup> Na fase crônica, os anticorpos específicos atingem níveis elevados, variando de 1:40 a 1:1.280 ou mais. A reação celular do baço<sup>50</sup> foi evidente, com proliferação de linfócitos e presença de células blásticas, nas polpas branca e vermelha, e hiperplasia dos centros germinais dos folículos linfóides. As células blásticas na polpa vermelha foram identificadas pela coloração de Giemsa-Lennert como imunoblastos e plasmoblastos. Reação granulomatosa com células epitelióides estava presente na fase mais avançada da infecção, acima de 20 dias, com as cepas Colombiana e 12 SF; do 6.º ao 10.º dia, foi identificado o aspecto característico de proliferação de centro germinal na sua fase I como foi descrito por Müller-Hermelink e Lennert,<sup>51</sup> com imunoblastos, centroblastos e centrócitos. Do 10.º ao 14.º dia, os centros germinais apresentavam o aspecto em "céu estrelado" peculiar à fase II de resposta proliferativa, com macrófagos contendo parasitos ou detritos celulares.<sup>50</sup> O parasitismo de macrófagos, tanto na polpa vermelha como nos centros germinais dos folículos linfóides, ocorreu apenas na infecção com as cepas de Tipo I. Cordeiro et al.<sup>52</sup> observaram uma destruição maciça de macrófagos es-

plênicos parasitados, na fase avançada da infecção do camundongo pela cepa Y, o que coincide com a queda brusca da parasitemia e alta mortalidade dos animais. Essa destruição de células parasitadas marca a passagem de um estado de suscetibilidade para resistência, com rápida restauração da arquitetura do baço. Os aspectos morfológicos observados no baço correspondem ao fenômeno de ativação policlonal descrito na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*,<sup>53,54</sup> e que cursa com uma supressão da resposta imunológica à infecção pelo *T. cruzi*. De acordo com esses autores, camundongos C3H normais, quando infectados com as cepas Y ou CL, desenvolvem um grande número de células produtoras de placas (PCF) e secretoras de IgG2a, IgG2b e IgG1 e depleção da secreção de IgM, IgE, IgG3 e IgA, indicando que o fenômeno de ativação policlonal tem participação na imunossupressão observada na infecção aguda do camundongo. De acordo com Minoprio et al.,<sup>55</sup> a consequência mais evidente da infecção experimental pelo *T. cruzi* é a ativação linfocítica maciça. Todas as classes de linfócitos estão ativadas e a resposta é policlonal, sendo a maioria não-específica para o *T. cruzi*. A infecção aguda resulta em rápida transformação blástica e atividade proliferativa dos linfócitos CD4, CD8 e LyB,<sup>56</sup> sendo levantada a hipótese de que clones anti-*self*, estimulados inespecificamente na fase aguda, persistam no animal até a fase crônica, podendo ter um papel nas reações de auto-imunidade dessa fase. Em recente revisão, Brenner e Gazzinelli<sup>57</sup> discutem o mecanismo da ativação policlonal precoce do sistema imune e sugerem que glicoconjugados (glicosilfosfatidilinositol — mucinas), presentes na superfície de tripomastigotas e amastigotas, são responsáveis pela iniciação da inflamação e da resposta imune durante a fase aguda, e pelo início da síntese de citocinas pelos macrófagos.

A evolução da infecção aguda está na dependência da resposta linfocítica, determinando o padrão das citocinas capazes de modificar essa resposta com a predominância do setor Th1 ou Th2. O papel da IL-2 foi investigado na fase aguda por diferentes autores,<sup>58-61</sup> mostrando que ela está diminuída ou bloqueada pela infecção com o *T. cruzi*. De acordo com Tarleton e Kuhn,<sup>62</sup> a IL-2 exógena pode alterar a resposta imune de linfócitos de camundongos infectados com *T. cruzi*, bem como o curso da infecção, porém não pode impedir a imunossupressão nem levar à cura parasitológica no modelo murino da infecção pelo *T. cruzi*. Silva et al.<sup>63</sup> demonstraram a importância da interleucina 10 (IL-10), citocina que tem um papel inibitório do IFN $\gamma$ . A IL-10 apresenta significativo aumento na infecção de linhagem suscetível (B6) e apenas discreto aumento em camundongos resistentes (B6D2F1). Outras citocinas, como o TGF $\beta$  e a IL-4, são também inibidores das funções dos macrófagos.

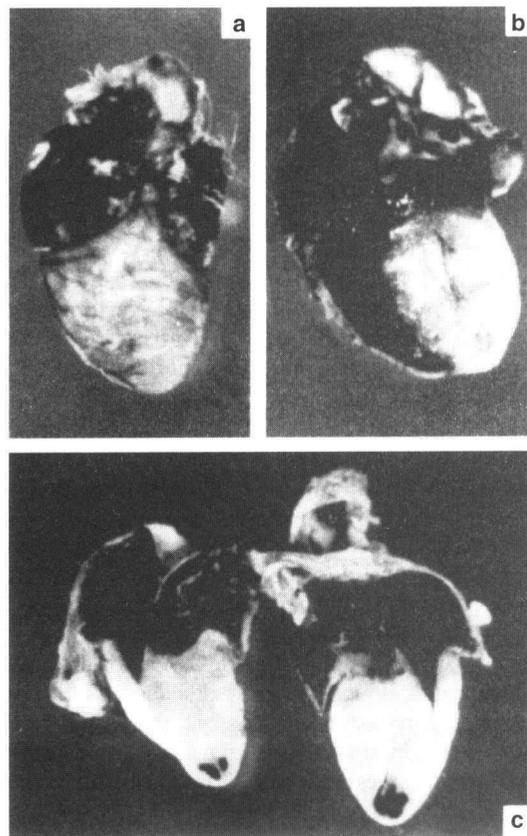
## 2.2. Fase Crônica da Infecção pelo *T. cruzi*

### 2.2.1. Aspectos Anatomopatológicos

Tentativas têm sido feitas no sentido de estabelecer o camundongo como modelo da fase crônica da infecção chagásica. Federici et al.<sup>64</sup> e Kumar et al.<sup>65</sup> estudaram a fase crônica da infecção pela cepa Colombiana, por eles descrita como eminentemente miotrópica, determinando miocardite crônica progressiva e miosite em camundongos C3H. A cepa Colombiana, pelas suas características morfológicas, possibilita uma sobrevivência prolongada quando inoculada em camundongos Suíços. Em estudos posteriores de Andrade e Andrade<sup>66,67</sup> sobre a infecção crônica prolongada em camundongos suíços infectados com a cepa

Y e com a cepa Colombiana, os quais sobreviveram à infecção com inóculos elevados durante períodos que variaram de acordo com o experimento até um máximo de 575 dias, foi observado, em todos os animais, um processo inflamatório crônico multifocal em vários setores do organismo, com envolvimento arteriolar. Ambas as cepas determinaram miocardite e miosite crônicas, porém a presença de parasitos no interior de fibras miocárdicas e de músculo esquelético era mais freqüente com a cepa Colombiana. Desse modo, pôde-se detectar, nos animais com infecção prolongada, um processo evolutivo, com envolvimento do coração, músculo esquelético, sistema nervoso autônomo simpático e parassimpático e com lesões arteriolares sugestivas de um processo imunológico, com deposição de complexos imunes.

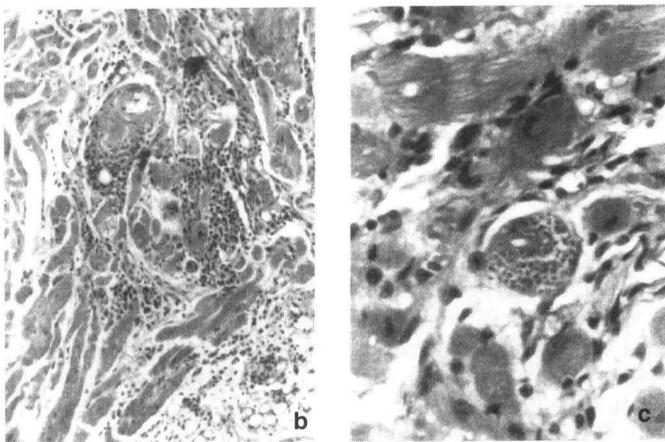
O modelo murino da cardiopatia crônica chagásica foi detalhadamente descrito por Andrade,<sup>68</sup> em 201 camundongos, sendo 73 isogênicos (AKR e A/J) e 128 Suíços, não-isogênicos. Os camundongos AKR e A/J foram infectados com as cepas do *T. cruzi* representantes dos diferentes *biodemas*, isto é, Peruana (Tipo I), 12SF (Tipo II) e Colombiana (Tipo III); os camundongos Suíços foram sobreviventes da infecção com diversas cepas de Tipos II e III. A duração da infecção variou entre 180 e 660 dias para os camundongos Suíços. Os camundongos isogênicos (AKR e A/J) foram sacrificados nos períodos de 90, 180 e 240 dias. O coração mostrou alterações macroscópicas, representa-



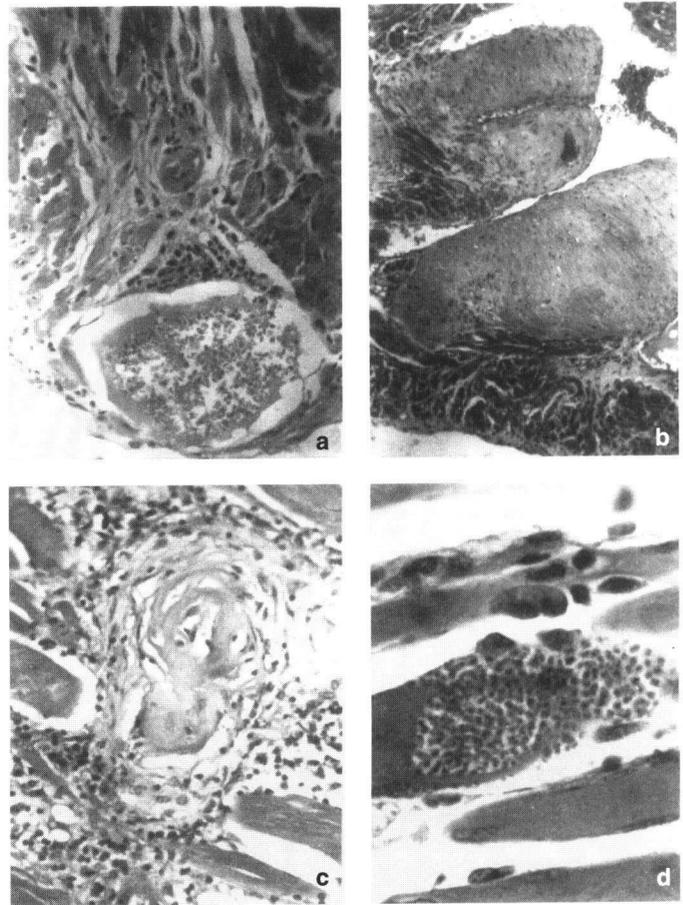
**Figura 4** Aspectos macroscópicos do coração de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*: a- vista anterior, observando-se acentuada dilatação do átrio e ventrículo direitos; b- superfície de corte sagital do coração, mostrando dilatação das cavidades direitos; c- superfície de corte do coração, mostrando dilatação dos dois átrios e dilatação aneurismática da ponta do ventrículo esquerdo.

das por dilatação global das cavidades cardíacas (Figura 4a), ou dilatação concomitantemente de átrio direito e ventrículo direito (Figura 4b). Foi visto também aneurisma da ponta do ventrículo esquerdo (Figura 4c), que foi mais freqüente nos animais infectados com a cepa Colombiana. A avaliação do "índice cardíaco", obtido pela relação entre o peso do coração e o peso corporal, revelou, através do teste de variância, para cada linhagem de camundongo, um aumento significativo nos animais cronicamente infectados, quando comparados com os controles, o que define uma cardiomegalia.

O estudo histopatológico do miocárdio (Figuras 5 e 6) mostrou infiltrados inflamatórios difusos e focais, constituídos por macrófagos, linfócitos e plasmócitos, cuja intensidade era variável de caso para caso, sendo em geral mais acentuados nos átrios. Nos animais infectados com cepas do Tipo III, foram encontrados parasitos nas fibras cardíacas, com necrose da fibra parasitada e densos infiltrados focais, mononucleares. Havia também necrose hialina de fibras não-parasitadas. Discreta a intensidade fibrose intersticial, com adensamentos focais em torno de vasos e nas áreas subepicárdicas, bem como áreas focais de fibrose em



**Figura 5** Aspectos histopatológicos da miocardite crônica do camundongo infectado pelo *T. cruzi*: a- extensa lesão fibrótico-inflamatória da parede ventricular, com perda de fibras miocárdicas e substituição por tecido fibroso; difuso infiltrado mononuclear, com adensamentos focais (100 ×); b- lesão da parede ventricular, com fibrose e denso infiltrado inflamatório periarteriolar (100 ×); c- miocélula cardíaca, com adensamento citoplasmático, picnose nuclear, infiltrado intersticial mononuclear e depósito de matriz extracelular; célula cardíaca parasitada (630 ×).



**Figura 6** Lesões cardíacas na fase crônica avançada da infecção pelo *T. cruzi* no camundongo: a- dilatação aneurismática da ponta do ventrículo esquerdo, miocardite crônica e fibrose intersticial (100 ×); b- cavidade atrial, com trombos aderentes à parede (100 ×); c- necrose da média de arteriolo do miocárdio, com processo de periarterite; d- grande ninho parasitário em fibra miocárdica em desintegração (630 ×).

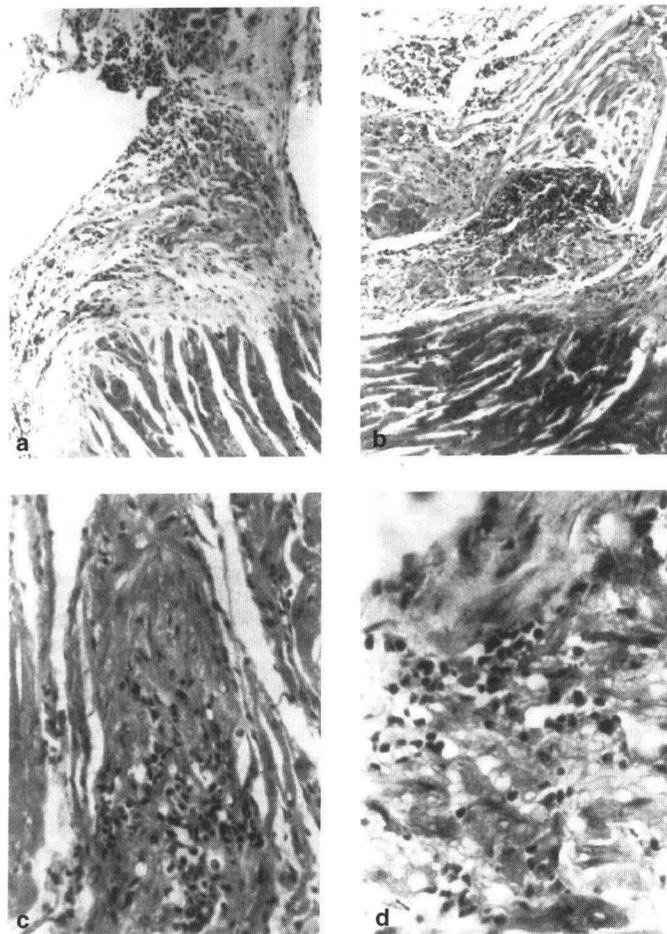
átrios e ventrículos, foi um importante componente nesses casos. Com freqüência, observava-se necrose fibrinóide de arteríolas, em geral acompanhada por infiltrado inflamatório mononuclear, com polimorfonucleares eosinófilos. Tromboses intracardíacas de átrio direito e ventrículo direito ocorreram em pequena percentagem dos casos.

Em estudo do sistema de condução do coração em cortes seriados montados em fitas plásticas, Andrade e Sadigursky<sup>69</sup> identificaram as diversas estruturas desse tecido (Figura 7), isto é, o nódulo atrioventricular, o feixe de His e o ramo direito desse feixe, sendo o ramo esquerdo mal definido nesse modelo. As lesões do sistema de condução caracterizam-se por edema, separando as miocélulas; infiltrado mononuclear difuso e focal, relacionado com necrose focal; e vacuolização e depósito adiposo nas células de condução. Finos feixes de tecido conjuntivo fibroso são vistos no interstício desse tecido. A distribuição topográfica das lesões do sistema de condução está expressa na Tabela 3, onde se pode observar que as lesões são mais freqüentes no feixe de His em 76,3% dos casos e, no ramo direito, em 73,3%.<sup>68</sup> Em alta percentagem de casos (53 a 62%), houve boa correlação entre a presença de alterações morfológicas do sistema de condução e as alterações eletrocardiográficas.

**Tabela 3** Distribuição das lesões histopatológicas do sistema de condução do coração em camundongos cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*\*

Sistema de condução	N.º de casos	Infiltrado inflamatório	Fibrose intersticial	Necrose focal	Vacuolização células s.c.
Feixe de His	30/30	76,3%	26,6%	26,6%	43,3%
Nódulo AV	7/30	43,0%	14,2%	—	—
Ramo D f.His	15/30	73,3%	13,3%	13,3%	6,6%
Ramo E f.His	8/30	37,5%	12,5%	12,5%	25,0%

\*Frequência das alterações do sistema de condução avaliada em cortes seriados.



**Figura 7** Lesões do sistema de condução do coração em camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*: **a**- septo interatrial e interventricular e esqueleto fibroso do coração: porção do feixe de His e ramo direito. O septo interatrial apresenta denso infiltrado mononuclear, que se propaga ao feixe de His (100 ×); **b**- miocárdio atrial e ventricular; porção do feixe de His, com denso infiltrado mononuclear na sua hemiporção superior e na sua continuação com o ramo direito (100 ×); **c**- septo interatrial, identificando-se o nódulo AV, de localização subendocárdica, observando-se infiltrados focais em torno dos pequenos vasos (100 ×); **d**- detalhe das miocélulas do sistema de condução, observando-se edema intersticial, vacuolização das células e infiltrado mononuclear.

Na avaliação das lesões, diagnosticadas nos animais cronicamente infectados, foram considerados os fatores: linhagem dos camundongos e cepas dos parasitos, além de outras variáveis, como a duração da infecção e o inóculo. Verificou-se uma variabilidade das lesões patológicas nos animais cronicamente in-

fectados, mesmo nos isogênicos, com ausência de lesões em uma percentagem destes ou lesões variando de discretas a intensas dentro de um mesmo grupo. Entretanto, utilizando camundongos isogênicos e controlando fatores como a duração da infecção e o inóculo, foi possível estabelecer algumas correlações entre o tipo de cepa do *T. cruzi* e a incidência e intensidade das lesões histopatológicas.<sup>67</sup> Considerando o conjunto dos animais cronicamente infectados, as alterações histopatológicas, variando de discretas a intensas, ocorreram em 85% dos casos. Houve nítida predominância na incidência e intensidade das alterações fibróticas e inflamatórias nos camundongos infectados com cepas do Tipo III (entre elas, as cepas Colombiana, Boliviana e Montalvânia).<sup>68</sup> As lesões da fase crônica foram também estudadas por Schlemper Jr. et al.,<sup>70</sup> em camundongos infectados com 17 cepas de Minas Gerais, observando miocardite crônica variável em intensidade, a qual estava diretamente relacionada com a virulência das cepas na fase aguda.

### 2.2.2. Estudo Eletrocardiográfico dos Camundongos Cronicamente Infectados

O ECG de grande percentagem desses animais foi realizado por Sadigursky e Andrade.<sup>71</sup> Observaram esses autores que a incidência de alterações eletrocardiográficas foi elevada nas três linhagens de camundongos estudadas (AKR, A/J e Suíço), sendo mais constantes na infecção pelas cepas de Tipo I (Y e Peruana) e de Tipo III (Colombiana, Boliviana e algumas amostras de Montalvânia). No camundongo normal, os traçados eletrocardiográficos foram muito semelhantes aos obtidos em outras espécies, como o cão, a não ser por algumas peculiaridades, sendo possível identificar a onda P, o espaço P-R e o complexo QRS; entretanto, a onda T de repolarização ventricular começa logo após o QRS, resultando no complexo QRST, prejudicando a caracterização do segmento S-T e da onda S. Os camundongos das três linhagens estudadas mostraram diferenças eletrocardiográficas relacionadas com a posição do vetor médio do QRS no plano frontal que, no camundongo Suíço, estava entre +30° e +75° em 80% dos animais, enquanto, nos camundongos AKR e A/J, estava predominantemente voltado para a direita (+105° a +130°). Também houve variações quanto à frequência cardíaca, que era de 503 bpm para os camundongos Suíços, 409 bpm para os A/J e 368 bpm para os AKR. Os demais parâmetros eram semelhantes nas três linhagens. As alterações mais frequentemente observadas nos camundongos cronicamente infectados, independentemente da linhagem, foram o bloqueio A-V de 1.º e 2.º graus e os distúrbios da condução intraventricular com a configuração de bloqueio do ramo direito ou do ramo esquerdo do feixe de His; taquicardia sinusal ou bradicardia; arritmia sinusal; e sobrecarga dos ventrículos direito e esquerdo. Outros estudos foram feitos vi-

**Tabela 4** Incidência de alterações eletrocardiográficas em camundongos cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi*

Linagem dos camundongos	Cepas do <i>T. cruzi</i>		
	Tipo I	Tipo II	Tipo III
AKR	87%	80%	83,3%
A/J	100%	26,1%	100%
Suíços	*	53,5%	71,4%

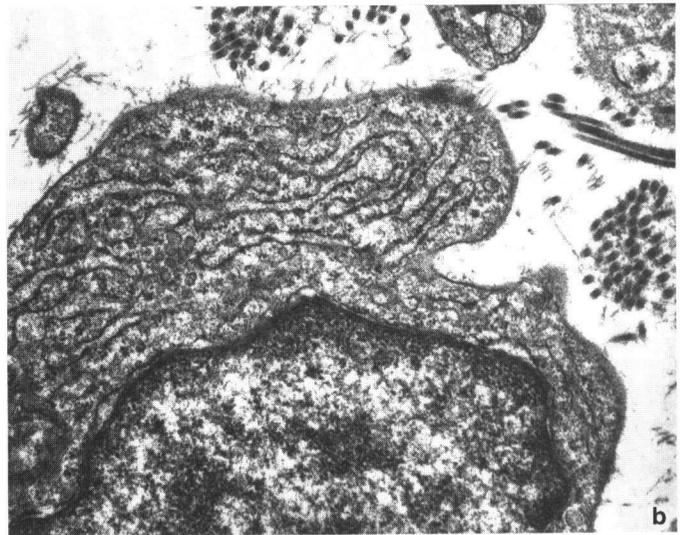
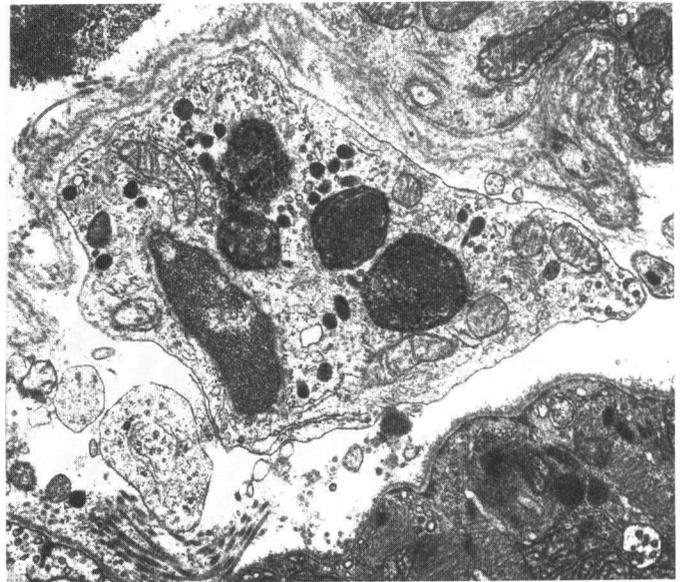
\*Não houve sobreviventes, na fase crônica, de camundongos Suíços infectados com cepas de Tipo I.

sando correlacionar a miocardite crônica com as alterações eletrocardiográficas no camundongo.<sup>72-74,76</sup> Bijovsky et al.<sup>76</sup> assinalam alterações eletrocardiográficas irreversíveis, aos 8 meses de infecção, em 8,5% dos animais e, após 12 meses, em 30%. Laguens et al.<sup>75</sup> verificaram aumento da duração do complexo QRS, além de sístoles prematuras em 32% dos casos, bloqueio de ramo direito, bloqueio AV de 1.º grau, fibrilação atrial e taquicardia. As alterações decorrentes de uma anestesia inadequada podem simular distúrbios associados a uma miocardite, como assinalado por Bijovsky et al.<sup>76</sup> Entretanto, de acordo com Sadigursky e Andrade,<sup>71</sup> o uso de anestesia pelo Nembutal sódico, em dose adequada, permitiu a obtenção de eletrocardiogramas com características normais em todos os camundongos controles não-infectados.<sup>70</sup>

**2.2.3. Estudo Ultra-estrutural do Miocárdio**

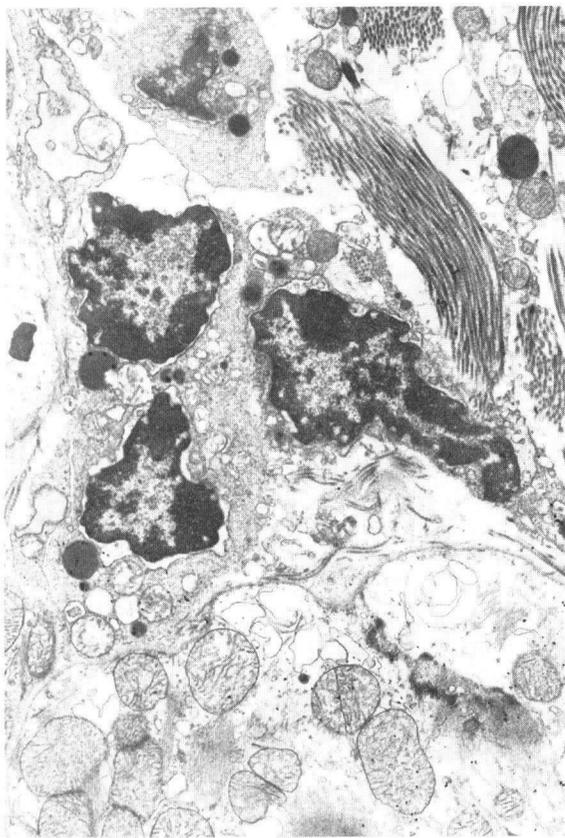
O estudo ultra-estrutural do miocárdio em camundongos cronicamente infectados, desenvolvido por Andrade e Grimaud,<sup>77</sup> contribuiu para a identificação das células do infiltrado inflamatório e dos componentes matriciais, assim como para a descrição das alterações dos miócitos cardíacos na fase crônica da infecção. Os macrófagos eram os principais componentes do infiltrado inflamatório e apareciam como grandes células mononucleares, mostrando intensa atividade fagocítica, com um ativo componente lisossômico. Algumas dessas células continham formas amastigotas em degeneração no interior de fagossomas (Figura 8a), membrana plasmática irregular com expansões citoplasmáticas e numerosas vesículas pinocitóticas. Em pontos de junção dos prolongamentos dos macrófagos com células cardíacas, havia nítidas alterações da membrana basal dos miócitos e vacuolização citoplasmática (Figura 9). Esses aspectos apontam para um importante papel dos macrófagos como células efetoras das alterações miocárdicas. Linfócitos e plasmócitos eram raros.

No interstício, eram vistos numerosos fibroblastos, com sinais de síntese intracelular, com retículo endoplasmático dilatado (Figura 8b) e vesículas de transporte indicando atividade de síntese de matriz colagênica. Miofibroblastos eram vistos ocasionalmente. O tecido intersticial aparecia ampliado pela presença de edema e células inflamatórias, bem como de microfibrilas associadas com fibrilas e feixes colagênicos. Aspectos de condensação do colágeno, sugerindo degradação, estavam presentes, coincidindo com a presença de macrófagos contendo fibrilas de colágeno intrafagossômicas. As alterações vasculares eram proeminentes, com necrose fibrinóide das paredes arteriolas e depósitos de fibrina extravascular. Os capilares estavam alterados, com perda das junções intercelulares e tumefação endotelial. Os miócitos cardíacos mostravam diferentes graus de altera-

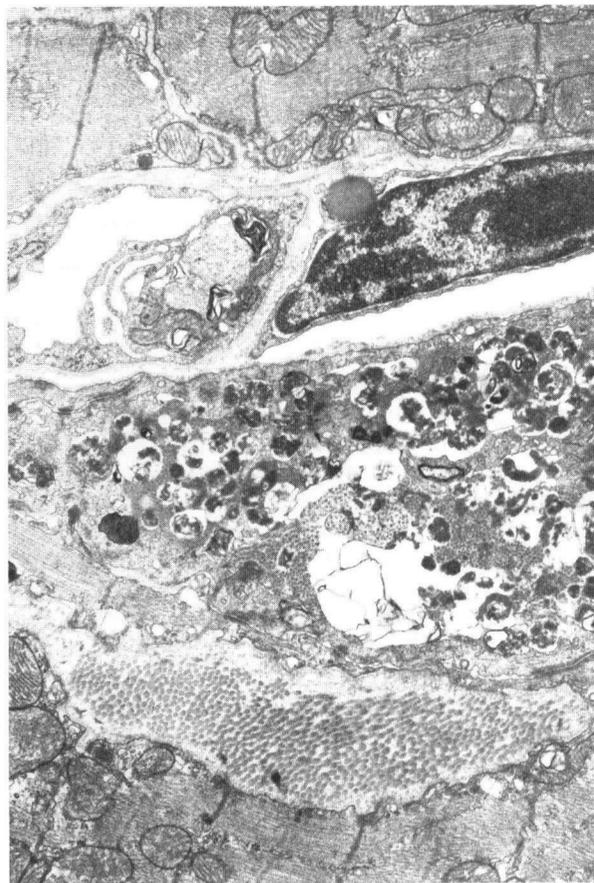


**Figura 8** Estudo ultra-estrutural: a- segmento de um macrófago, nas vizinhanças de célula cardíaca, com formas amastigotas densificadas no seu citoplasma, além da presença de componente lisossômico ativo. A célula cardíaca está alterada e há depósito matricial amorfo ou formando feixes colagênicos; b- fibroblasto com sinais de atividade, retículo endoplasmático dilatado, hipertrofiado.

ção em relação à presença dos infiltrados inflamatórios, com moderada desorganização das miofibrilas, tumefação mitocondrial e cristólise, vesiculação do retículo endoplasmático, presença de autofagossomas e acúmulo de figuras mielínicas (Figuras 9 e 10). Foi também detectada, em áreas focais, dissociação das junções dos discos intercalares. Alterações nucleares, com densificação cromatínica e inclusões intranucleares, estavam presentes. Os achados descritos à microscopia eletrônica permitiram confirmar a participação dos macrófagos no processo inflamatório e na destruição focal de miócitos não-parasitados, assim como os aspectos da fibrogênese nesse modelo, além de contribuir para um melhor conhecimento sobre as alterações dos diversos compartimentos da célula cardíaca na infecção crônica pelo *T. cruzi*.



**Figura 9** Estudo ultra-estrutural: miocárdio de camundongo infectado pelo *T. cruzi*: presença de células macrofágicas no interstício do coração, cujos prolongamentos aderem à fibra cardíaca, a qual mostra alterações citoplasmáticas, com vacuolização, depósitos elétrondensos, tumefação mitocondrial. Depósito matricial de fibras colágenas densas. (ME. 4.000 ×.)



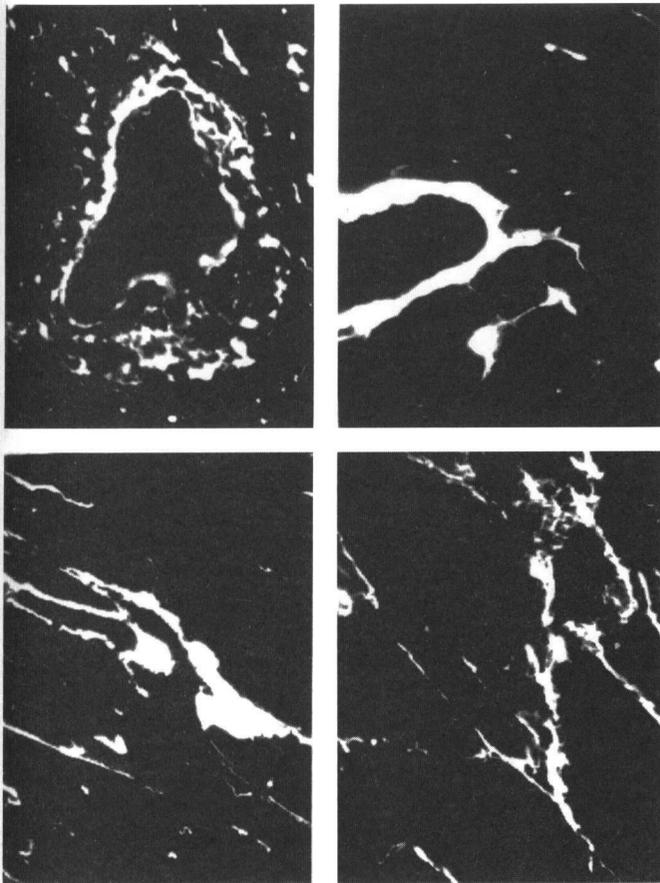
**Figura 10** Estudo ultra-estrutural: célula cardíaca em desintegração, com vacúolos e grumos intrafagossômicos de material elétrondenso. A célula lesada está entre duas outras células inteiras e vizinha a um capilar sanguíneo normal. Isso indica o caráter segmentar da lesão das células não-parasitadas.

#### 2.2.4. A Matriz Extracelular do Miocárdio na Infecção Crônica Experimental pelo *T. cruzi*

O estudo seqüencial do desenvolvimento da fibrose no miocárdio, na infecção crônica pelo *T. cruzi*, foi feito pela imunotipagem dos componentes matriciais, utilizando o método de imunofluorescência, com anticorpos específicos purificados, contra os componentes da matriz intersticial, como a fibronectina, a laminina e os diferentes tipos de colágenos envolvidos no processo fibrótico: colágenos Tipo I, Tipo III e Tipo IV.<sup>78</sup> O estudo foi feito na fase subaguda precoce (26 a 30 dias pós-infecção com a cepa 12 SF), na fase subaguda tardia (50 dias pós-infecção com a cepa Colombiana), na infecção crônica precoce (80 a 90 dias pós-infecção com a cepa Colombiana) e na fase crônica tardia (150 a 200 dias pós-infecção com a cepa Colombiana). A matriz extracelular normal foi estudada em camundongos controles intactos, o que permitiu estabelecer o padrão normal dos componentes estudados e demonstrar que houve uma nítida alteração na sua quantidade e distribuição desde as fases precoces da infecção subaguda; a laminina aparecia, então, como depósitos homogêneos, regulares, no sarcolema das células cardíacas, e como depósitos perivasculares; a fibronectina formava depósitos fibrilares intersticiais, diretamente relacionados com infiltrados inflamatórios; o colágeno Tipo III formava intensos

depósitos em torno de arteríolas e nas paredes vasculares. Nas fases subaguda tardia e nas fases crônicas, observaram-se diminuição da fibronectina e nítido aumento dos depósitos de laminina e dos colágenos Tipos III e IV. Na fase crônica tardia, o colágeno de Tipo III formava depósitos difusos, interfasciculares, com densos espessamentos focais e depósitos em paredes vasculares, e o Tipo IV apresentava difuso espessamento, com adensamentos focais e depósitos em paredes de vênulas e arteríolas, sendo também identificado no tecido de condução (Figuras 11 e 12). O colágeno de Tipo I não mostrou alterações quando comparado com o padrão dos controles. A presença de moléculas de fibronectina, laminina e dos colágenos III e IV está ligada ao processo inflamatório e à persistência do infiltrado de macrófagos, o que sugere que o processo de fibrose pode reverter se o processo inflamatório regredir.

A reversibilidade da fibrose, no modelo murino, foi comprovada pelo tratamento específico da infecção, com os medicamentos anti-*T. cruzi* em uso clínico, Nifurtimox e Benzonidazol, e com droga experimental: o MK-436.<sup>79</sup> Os camundongos tratados e curados apresentaram nítida regressão das lesões fibróticas e inflamatórias. O estudo ultra-estrutural mostrou degradação matricial caracterizada por perda da periodicidade, condensação de feixes colágenicos e pela presença de áreas líticas e áreas de rarefação da matriz intersticial. A relação da fibrose com o pro-



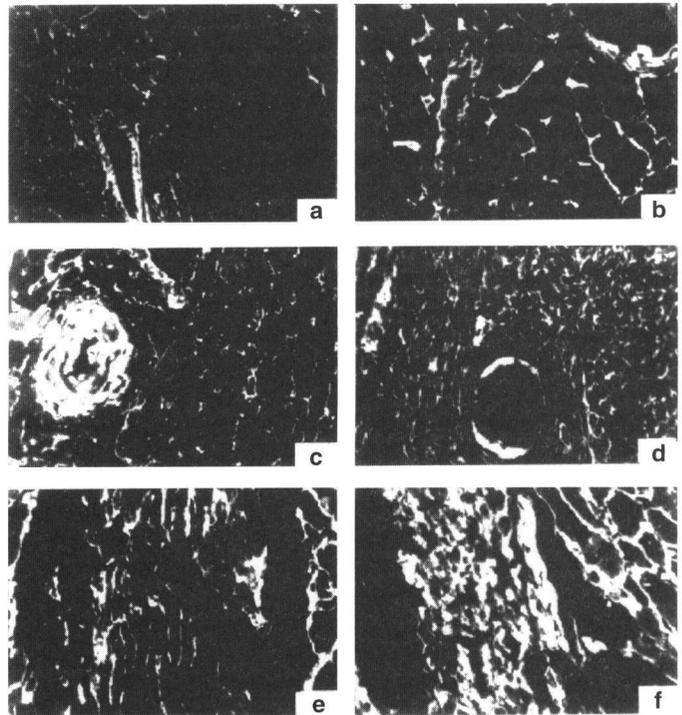
**Figura 11** Imunotipagem do colágeno em secções do coração de camundongo cronicamente infectado pelo *T. cruzi*: observam-se depósitos de colágeno de Tipo III, com fluorescência positiva nas paredes vasculares (vênulas e arteríolas) e denso feixe de colágeno Tipo III perimisial. (400 ×.)

cesso inflamatório indica que a regressão dessas lesões pelo tratamento específico pode, secundariamente, levar à involução da fibrose.

**2.2.5. Aspectos Imunopatológicos na Fase Crônica da Infecção do Camundongo pelo *T. cruzi***

Na fase crônica da infecção, a resposta celular é predominante, envolvendo principalmente os linfócitos CD4+ e CD8, porém os fatores sorológicos também são envolvidos, tendo sido assinalado o papel do aumento das imunoglobulinas IgG2a e b no maior grau de resistência de camundongos à infecção.<sup>42,80-82</sup> Nessa fase, anticorpos parasito-específicos, que fixam o complemento e lisam as formas tripomastigotas sanguíneas, são considerados as principais moléculas efetoras responsáveis pela manutenção da infecção latente.<sup>57</sup> A transferência passiva de soro imune de camundongos infectados pelo *T. cruzi* protege contra uma infecção letal,<sup>57</sup> e os anticorpos reconhecem epítopos na superfície de tripomastigotas vivos e são responsáveis, *in vitro*, pela reação de lise mediada por complemento, sendo designados como anticorpos líticos.<sup>83</sup> Esses anticorpos estão relacionados com um polipeptídeo de 160 kD da membrana da forma tripomastigota do parasito.

O quadro de miocardite crônica fibrosante observado na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, ao lado de lesões de necrose



**Figura 12** Imunotipagem do colágeno — Tipo IV: a, b- observam-se depósitos na membrana basal dos miócitos; c, d- paredes arteriulares com depósito colagênico; e, f- segmento do feixe de His mostrando depósito de colágeno de Tipo IV na membrana das células. (100 ×.)

arteriolar e de destruição focal de células cardíacas não-parasitadas, sugere a participação de um mecanismo de hipersensibilidade tardia na patogenia dessas lesões. Com o objetivo de caracterizar os componentes do processo imunológico envolvido nessas lesões, Zhang e Tarleton<sup>84</sup> fizeram dupla marcação histoquímica e demonstraram as diversas citocinas e moléculas de adesão envolvidas na infecção crônica pelo *T. cruzi*, assim como a presença de grande número de células produtoras de TNF $\alpha$ , TGF $\beta$ , IL-11 E IL-6, as quais se correlacionam com o aumento da expressão de moléculas de adesão: CAM, LFA, VLA-4 e VCAM; aparentemente, tanto as citocinas inflamatórias como as não-inflamatórias determinam o padrão da resposta celular e a gravidade da lesão. Ligantes da matriz extracelular, como a laminina e seu receptor VLA-6, foram identificados como determinando, *in vivo*, a ativação de linfócitos e o seu papel na auto-reatividade dependente de células T- CD4+.<sup>85</sup> No modelo de transplante de coração para a orelha de camundongos singenéticos, cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, observaram esses autores a formação de densa rede de laminina durante a rejeição, identificando células CD4+ do doador nas áreas ricas em laminina.<sup>85</sup>

Há evidências de que a presença do parasito e de seus antígenos nos tecidos estimula e mantém as lesões inflamatórias, como foi demonstrado no coração de camundongo<sup>86</sup> e humano.<sup>87,88</sup> A importância dos parasitos e de seus antígenos na manutenção das lesões havia sido anteriormente sugerida pela verificação de que o tratamento curativo de camundongos cronicamente infectados<sup>81</sup> determinava a regressão das lesões, verificando-se, inclusive, a reversibilidade do processo de fibrose intersticial do miocárdio nos camundongos tratados e curados,<sup>81</sup> como anteriormente re-

ferido. De acordo com Dos Reis,<sup>89</sup> a presença de parasitos nos tecidos pode ser decisiva para a secreção de citocinas inflamatórias e para a rotura dos mecanismos de tolerância.

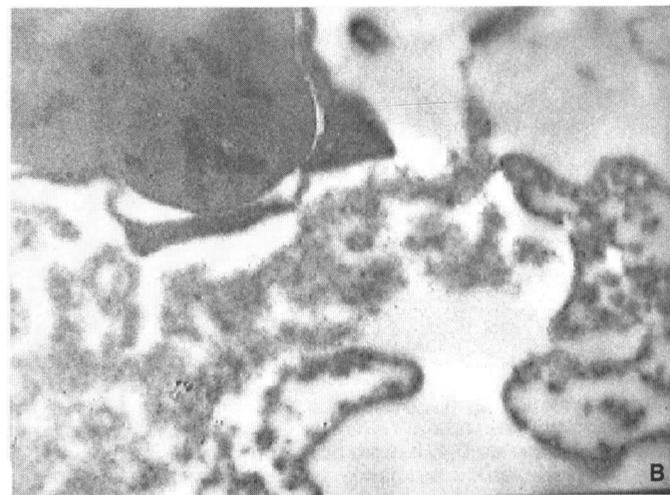
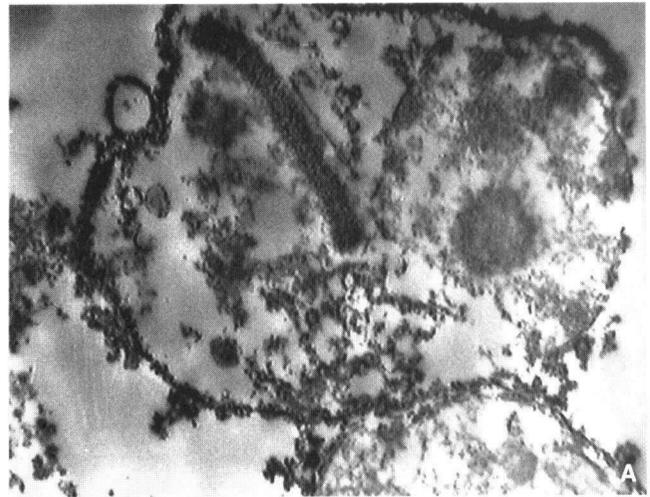
Os mecanismos de auto-imunidade têm sido considerados por diversos autores como importantes na patogenia das lesões determinadas pelo *T. cruzi*. Sadigursky et al.<sup>90</sup> verificaram reação cruzada entre os antígenos do *T. cruzi* e a ATPase do retículo sarcoplásmico de miocárdio de camundongos, sugerindo a sua participação nas reações de auto-imunidade. Foi demonstrada a transferência, por meio de linfócitos T de animais cronicamente infectados, de lesão inflamatória de nervo periférico e de reação cutânea de hipersensibilidade tardia para camundongos singenéticos.<sup>26</sup> Ainda em relação ao mecanismo de auto-imunidade, foi detectada a presença de auto-anticorpos antimiosina e antidesmina em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, o que foi correlacionado com a miocardite nesses animais.<sup>91</sup>

Foi descrita por Ribeiro dos Santos et al.<sup>92</sup> a rejeição de transplante de coração de camundongos recém-nascidos, implantado nas orelhas de camundongos singenéticos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, mediada por linfócitos CD4 auto-reativos. A natureza auto-imune dessa reação foi recentemente contestada por Tarleton e Zhang,<sup>93</sup> os quais reproduzem a miocardite nos transplantes de coração de camundongos recém-nascidos singenéticos apenas quando estes são infectados pelo *T. cruzi*, quer por injeção direta do parasito, no transplante bem estabelecido, quer quando o receptor é infectado após o transplante.

Dessa maneira, continua em aberto a discussão sobre os mecanismos envolvidos nas reações de hipersensibilidade tardia da doença de Chagas em relação ao modelo murino, levando-se em conta a importância do parasito e dos seus antígenos em contraposição aos fenômenos de auto-imunidade.

### 2.2.6. Memória Imunológica na Fase Crônica da Infecção pelo *T. cruzi*

Nos camundongos cronicamente infectados, submetidos a tratamento quimioterápico específico, nos quais diferentes testes demonstraram a negatificação parasitológica, foi observado que os testes sorológicos permaneciam positivos em uma percentagem de casos, quando investigados até 6 meses após o tratamento.<sup>94</sup> Isso levou à investigação dos mecanismos envolvidos, tendo Andrade et al.<sup>94</sup> levantado a hipótese de que antígenos parasitários estariam sendo seqüestrados pelas células dendríticas foliculares do baço, que são células apresentadoras de antígenos. Para confirmar essa hipótese, foi investigada a presença, nessas células, de antígenos parasitários específicos pela técnica da imunoeletromicroscopia, com marcação dos antígenos pela peroxidase, após tratamento das secções criopreservadas, com anticorpo específico, purificado, anti-*T. cruzi*. Os resultados mostraram marcação positiva em células dendríticas, nos centros germinais dos folículos linfóides, visualizadas como depósitos densos, osmiofílicos, na membrana celular (Figura 13). As células dendríticas foliculares capturam complexos antígeno-anticorpo e, como células apresentadoras de antígenos, elas os fornecem às células B de memória imunológica, envolvidas na resposta humoral e responsáveis pela manutenção da sorologia positiva, mesmo após cura parasitológica, durante períodos mais ou menos prolongados. Tendo em vista que, em pacientes humanos, os testes sorológicos ditos “convencionais” falham muitas vezes como diagnóstico de cura, e só vêm a negativar 1 ano ou mais após tratamento curativo, é interessante a compreensão de que isso pode ser devido a uma memória imunológica, como observado experimentalmente.



**Figura 13** Imunoeletromicroscopia: **A)** observa-se forma amastigota do *T. cruzi* em secção de baço de camundongo na fase aguda da infecção: utilizando-se anticorpo anti-*T. cruzi* purificado, foi demonstrado positividade para os antígenos parasitários; **B)** baço de camundongos infectados e tratados — observam-se antígenos seqüestrados em células dendríticas foliculares — prolongamentos com marcação idêntica à vista na membrana do parasito. (ME. 7.000 ×.)

### 2.3. Alterações do Sistema Nervoso Autônomo no Modelo do Camundongo

Na doença de Chagas, o comprometimento do sistema nervoso autônomo, não só de plexos nervosos intracardíacos, mas também dos plexos mioentéricos, tem sido objeto de numerosos estudos. A manifestação mais importante e confirmada desse comprometimento é representada pelos “megás” do aparelho digestivo.

Alterações do sistema nervoso autônomo têm sido descritas em camundongos, na fase aguda e na fase crônica da infecção chagásica, tendo sido esses animais utilizados para o estudo quantitativo das células neuronais dos plexos mioentéricos, para estudos morfológicos à microscopia ótica e eletrônica.<sup>65,95-104</sup> Esses estudos detalhados, feitos por diversos autores, permitiram demonstrar alterações ganglionares nervosas não só no setor dos

plexos mioentéricos, como também nos plexos parassimpáticos intracardíacos, em gânglios celíacos e em gânglios simpáticos. As alterações neuronais, à microscopia eletrônica,<sup>103</sup> são representadas por tumefação e vacuolização das mitocôndrias, hipertrofia do complexo de Golgi, dilatação das cisternas do retículo endoplasmático, cromatólise e vacuolização, grande número de lisossomas e granulações osmiofílicas nos neurônios.

Com o objetivo de melhor investigar a patogenia das alterações neuronais, procurou-se avaliar a importância da inflamação, no desenvolvimento dessas lesões em camundongos infectados com a cepa Y e tratados, na fase aguda da infecção, por corticóide;<sup>96</sup> foi então observado que a supressão da inflamação pelo uso do corticóide abole a destruição neuronal, mesmo com parasitismo intraganglionar, estando os parasitos morfológicamente íntegros. Esses resultados indicam, assim, um importante papel da inflamação na determinação das lesões neuronais, sugerindo que a maior destruição ocorreria quando houvesse uma maior concentração de parasitos, isto é, na fase aguda. Entretanto, há a possibilidade de que mecanismos auto-ímmunes poderiam estar envolvidos na destruição neuronal da doença de Chagas, sendo responsáveis pela inflamação que ocorre na fase crônica da infecção, envolvendo os gânglios nervosos simpáticos e parassimpáticos, como anteriormente demonstrado.<sup>66</sup> Os mecanismos envolvidos poderiam depender da presença de epítomos nas células, com reação cruzada com o *T. cruzi*<sup>105</sup> ou pela adsorção, na superfície celular, de antígenos parasitários, levando a reações cruzadas.<sup>106</sup> Essas lesões ganglionares são, entretanto, focais e segmentares, diferindo dos infiltrados inflamatórios difusos do miocárdio, atribuídos por outros autores a fenômenos auto-ímmunes.<sup>89,91,92,107</sup>

Recentemente, através do PCR em tecido humano, Vago et al.<sup>108</sup> puderam identificar o kDNA do *T. cruzi* em três espécimes de megasôfago de pacientes chagásicos, enquanto, nos fragmentos de esôfago de dois pacientes chagásicos, porém sem megasôfago, o resultado foi negativo, indicando a importância da presença do parasito ou do seu DNA específico nas lesões inflamatórias do esôfago, o que, entretanto, não afasta a possibilidade de que mecanismos auto-ímmunes estejam também envolvidos.

O papel das diferentes cepas do *T. cruzi* na patogenia das lesões neuronais é assunto ainda não bem esclarecido. As “diferenças geográficas” da doença de Chagas estão centradas nas diferenças de incidência de megas do aparelho digestivo em diferentes regiões, pois a presença de cardiopatia é comum em todas as áreas. Estudo amplo de Miles et al.<sup>109</sup> enfoca o problema comparando as cepas cujos zimodemas predominam no Brasil com as de outras regiões, como a Venezuela, atribuindo a essas diferenças as manifestações peculiares da doença. Em estudo sistemático de 138 cepas do *T. cruzi*, de diferentes áreas geográficas,<sup>110</sup> foi confirmado, pelo estudo de número significativo de amostras de duas áreas endêmicas (São Felipe, Bahia, e Mambá, Goiás) a predominância de um mesmo tipo de cepa (Tipo II, Zimodema 2), chamando a atenção essa ocorrência na região central do Brasil, onde são comuns os megas do aparelho digestivo. Lauria Pires et al.<sup>38</sup> isolaram, de um caso de mega do aparelho digestivo, uma cepa que designaram como SLU142, da qual obtiveram vários clones; e tanto a cepa parental como os clones foram caracterizados como pertencentes ao zimodema 2, apresentando-se de alta virulência. O estudo histopatológico<sup>111</sup> mostrou que as lesões inflamatórias mais intensas do intestino grosso foram observadas na infecção pela cepa parental SLU142, derivada de caso de megasôfago. Trata-se de evidências indiretas da influência de cepas do parasito nessa manifestação da

doença. Os estudos experimentais têm procurado comparar a infecção com diferentes cepas em relação às lesões neuronais. Na fase aguda da infecção pela cepa Y, são detectadas formas amastigotas no interior do plexo de Auerbach, em células da bainha de Schwann ou, raramente, em células neuronais e também nas fibras musculares do intestino nas vizinhanças do plexo, com a presença de infiltrado inflamatório e alterações degenerativas dos neurônios.<sup>96</sup> Em camundongos com infecção prolongada pelas cepas Y e Colombiana, foram observadas diferenças no comprometimento do sistema nervoso autônomo,<sup>66</sup> sendo nitidamente mais intenso o envolvimento dos plexos nervosos mioentéricos e dos gânglios nervosos simpáticos, nos camundongos infectados pela cepa Y (Tipo I), quando comparados com os infectados pela cepa Colombiana (Tipo III). O estudo dos gânglios nervosos simpáticos paravertebrais mostrou, por vezes, infiltrado inflamatório e fibrose intersticial com proliferação de células da bainha de Schwann, diminuição do número de neurônios e alterações destes. O estudo quantitativo das células neuronais do plexo de Auerbach do cólon, correlacionado com o número observado em animais controles intactos da mesma idade, mostrou diminuição significativa nos animais infectados com a cepa Y, enquanto as diferenças observadas nos animais infectados pela cepa Colombiana não foram estatisticamente significantes. Também Tafuri e Brener<sup>99</sup> demonstraram que a cepa Y causa lesões mais intensas das células neuronais, quando comparada com outras cepas. Diversos estudos feitos com a infecção pela cepa Y demonstraram alterações neuronais graves.<sup>96,97,102</sup> Analisando as lesões obtidas com as cepas ABC e Berenice na fase aguda, Tafuri e Brener<sup>100</sup> concluíram que a cepa Berenice produz lesões mais intensas, com esfacelo dos neurônios e intensa ganglionite, enquanto a cepa ABC determina lesões mais discretas. Esses autores<sup>101</sup> observaram diferença de intensidade de lesões neuronais na fase crônica entre as cepas ABC e PNM. Em estudo de cepas isoladas do Recôncavo Baiano, classificadas como de Tipo II, foram também evidenciadas alterações das células ganglionares nervosas dos plexos mioentéricos, associadas à presença de parasitismo da parede muscular lisa do intestino e de processo inflamatório associado, sendo essas lesões segmentares. Nesse estudo, a avaliação quantitativa não demonstrou diminuição significativa do número de neurônios.<sup>32</sup> Entretanto, estudos posteriores com as cepas de Tipo II confirmaram o envolvimento dos plexos mioentéricos pelo processo inflamatório na infecção com as cepas de Tipo II, Z2.<sup>110</sup>

A investigação sobre a influência direta das cepas do parasito no desenvolvimento das alterações neuronais foi posteriormente realizada por Souza et al.,<sup>112</sup> em estudo evolutivo bem controlado, em camundongos infectados com os três tipos de cepas. O tropismo para os plexos nervosos mioentéricos e gânglios nervosos simpáticos e parassimpáticos foi semelhante na infecção pelos 3 tipos de cepas, sendo discreto em todas. Entretanto, em decorrência de diferenças na virulência e patogenicidade das cepas biologicamente distintas, foram observados diferentes graus de envolvimento dos plexos mioentéricos pelo processo inflamatório entre as diferentes cepas. As alterações observadas consistiam em infiltração ganglionar, peri- e intraganglionar por células mononucleares, congestão, edema e, raramente, presença de amastigotas em células intraganglionares, na fase aguda da infecção. Na presença de inflamação, os neurônios apresentavam tumefação citoplasmática, vacuolização, decréscimo da basofilia citoplasmática, condensação nuclear, cariorrexe e perda celular. Por vezes, era também possível identificar neurofagia, proliferação de células satélites e edema intersticial com

dissociação das fibras nervosas. Não havia alterações neuronais na ausência de inflamação. Foi confirmado, no trabalho referido,<sup>112</sup> que as lesões dos neurônios foram mais acentuadas na infecção com a cepa Y. As diferenças no grau de lesões de uma cepa para outra foram atribuídas ao maior ou menor grau de inflamação que ocorre nos tecidos vizinhos aos plexos, como os músculos lisos da parede entérica e o tecido conjuntivo adiposo pericardíaco e perivertebral. É interessante observar que a cepa Y, de Tipo I, que determinou maior grau de lesões em todos os estudos, caracteriza-se por determinar lesões disseminadas no conjuntivo intersticial, com parasitismo e inflamação do tecido gorduroso, especialmente na base do coração, no tecido paravertebral e no retroperitônio, com envolvimento do mesentério e parede intestinal, gânglios nervosos parassimpáticos pericardíacos e simpáticos paravertebrais. As cepas de Tipo I (Y) podem determinar parasitismo de músculos lisos da parede intestinal, também observado com as cepas de Tipo II.

Desse modo, considerando o processo inflamatório como fundamental no desenvolvimento das lesões neuronais, a distribuição preferencial dos parasitos em determinados tecidos, de acordo com a cepa, seria, em última análise, o fator determinante do maior ou menor envolvimento dessas estruturas nervosas e, conseqüentemente, dos distúrbios de inervação que levam aos megas do aparelho digestivo, como sugerido por Andrade e Andrade.<sup>96</sup>

### 3. PATOLOGIA EXPERIMENTAL NO MODELO CANINO

Os conhecimentos sobre o modelo canino experimental da doença de Chagas evoluíram progressivamente. Torres,<sup>113</sup> em seu estudo da patologia do miocárdio na doença de Chagas, utiliza não só 4 casos agudos humanos, como também cães experimentalmente infectados para descrever as alterações miocárdicas determinadas pela multiplicação parasitária intracelular. Outro estudo sistemático foi feito por Taquini,<sup>114</sup> que observou alterações eletrocardiográficas na fase aguda, indicativas de grave dano miocárdico, sem, entretanto, fazer uma correlação histopatológica. Pizzi<sup>115</sup> estudou a infecção chagásica em cães jovens inoculados com cepas virulentas, verificando parasitismo acentuado de miocárdio, músculo esquelético e intestino e escasso parasitismo de macrófagos. Magalhães e Freire<sup>116</sup> fizeram estudo eletrocardiográfico de cães jovens, infectados, que morreram na fase aguda e de sobreviventes na fase crônica, observando alterações de vários tipos na fase aguda sem, contudo, observar bloqueios nessa fase; concluíram que as alterações da sístole elétrica e baixa voltagem de QRS e T indicam lesão do miocárdio, o que foi comprovado pelo estudo histopatológico. Badinez,<sup>117</sup> estudando o comportamento de diferentes cepas do *T. cruzi* em diferentes hospedeiros, estudou os aspectos anatomopatológicos em 50 cães inoculados experimentalmente, observando mortalidade elevada na fase aguda, com acentuada miocardite. Pellegrino<sup>118</sup> estudou as alterações eletrocardiográficas em cães experimentalmente infectados, descreveu diversos distúrbios na fase aguda e no início da fase crônica e, em dois deles, que passaram à fase crônica de mais de um ano de duração, um dos quais entrou em insuficiência cardíaca congestiva, observou bloqueio de ramo direito e bloqueio intraventricular. Laranja et al.<sup>119</sup> descreveram a fase crônica da infecção em cães inoculados com sangue de pacientes chagásicos ou com fezes de triatomíneos, mostrando um quadro clínico-patológico e alterações electrocar-

diográficas superponíveis às observadas no homem, tanto na fase aguda como na crônica. Outros estudos em cães foram desenvolvidos por vários pesquisadores,<sup>120-124</sup> que fizeram exaustiva descrição eletrocardiográfica e anatomopatológica de grande número de cães, muitos dos quais morreram na fase aguda e outros atingiram a fase crônica. Esses estudos permitiram descrever o quadro eletrocardiográfico e histopatológico da fase aguda, porém, na fase crônica, os achados foram pouco consistentes, em geral referidos como focos de cicatrização no miocárdio, aparentemente correspondendo a casos de forma indeterminada, nenhum deles com franca insuficiência cardíaca. Esses autores detectaram alterações eletrocardiográficas pela colocação direta de eletrodos na parede cardíaca lesada, demonstrando correlação direta entre as alterações eletrocardiográficas e histopatológicas, tendo sido descritos aneurismas ventriculares na fase aguda, correspondentes a áreas de miocitólise e inflamação.<sup>125</sup> Kramer<sup>126</sup> estudou detalhadamente a infecção experimental do cão, levando em conta dados quantitativos; procurou correlacionar os níveis parasitêmicos com o parasitismo tissular, observando uma relação positiva entre os piques de parasitemia e o número de amastigotas nos tecidos.

Com o objetivo de esclarecer diferentes aspectos da patologia e da patogenia da doença de Chagas, utilizamos o cão para o estudo das diversas fases da infecção experimental pelo *T. cruzi*.<sup>127-131</sup> Utilizando uma cepa do *T. cruzi* isolada de um paciente humano que chegou ao óbito na fase aguda da infecção (cepa 12 SF), foram inoculados cães jovens que desenvolveram quadro agudo grave, com alto índice de letalidade até 21 dias de infecção e quadro eletrocardiográfico e anatomopatológico idêntico ao apresentado pelo paciente,<sup>127</sup> indicando que, no modelo canino, pelo menos na fase aguda, os resultados obtidos experimentalmente podem reproduzir a doença humana. Com o objetivo de estabelecer as correlações entre as alterações eletrocardiográficas e as lesões histopatológicas nas diversas fases da infecção, os cães infectados foram acompanhados com eletrocardiogramas seqüenciados e estudo detalhado do sistema de condução do coração utilizando cortes seriados montados em fitas plásticas de acordo com o método de Pickett e Sommer.<sup>132</sup> Esse método tem permitido identificar os segmentos desse sistema e demonstrar a topografia das lesões histopatológicas presentes, bem como correlacioná-las com as alterações eletrocardiográficas encontradas. Nesse particular, o cão tem se mostrado o modelo ideal. O tecido excitocondutor do coração nesse animal é bem definido anatomicamente, com uma distribuição topográfica comparável à observada no coração humano. Diversas perguntas podem ser respondidas quando se faz o estudo seqüenciado desse sistema desde a fase aguda até a fase indeterminada e crônica cardíaca da doença, em grupos experimentais controlados, permitindo interpretar as lesões e o seu significado e prognóstico.

Lana et al.,<sup>133</sup> utilizando 64 cães mestiços, subdivididos em dois grupos, infectados com as cepas Be-62 e Be-78, ambas provenientes de xenodiagnóstico da paciente Berenice, considerada como o primeiro caso humano descrito por Chagas,<sup>1</sup> observaram, na maioria dos animais, fase aguda fatal. Os animais que sobreviveram e atingiram a fase crônica apresentaram, em parte, uma evolução para a forma crônica cardíaca, com acentuada fibrose miocárdica, ou apresentaram uma forma indeterminada.

Os estudos experimentais em cães pressupõem a possibilidade de fazer uma avaliação seqüenciada das diversas fases da infecção e compará-las com o modelo humano. Nesse particular, destacamos, a seguir, a fase aguda, a fase crônica indeterminada e a fase crônica cardíaca.

### 3.1. Alterações Histopatológicas na Fase Aguda da Infecção no Cão

Na fase aguda, os cães desenvolvem intensa miocardite com parasitismo acentuado de miócitos e lesões necróticas de células cardíacas não-parasitadas, além de intenso processo inflamatório. A miocardite inicia-se nos átrios e propaga-se aos ventrículos, predominando no átrio direito e metade direita do septo interventricular e na parede livre do ventrículo direito. O nódulo sinoatrial (SA) é mal identificado, devido ao intenso processo inflamatório. No nódulo atrioventricular (nódulo AV), as lesões mais intensas estão na parte mais alta, com densa infiltração celular, perda de fibras específicas e presença de amastigotas. O feixe de His e seus ramos em geral apresentam inflamação intensa, podendo ocorrer áreas de necrose.<sup>127</sup>

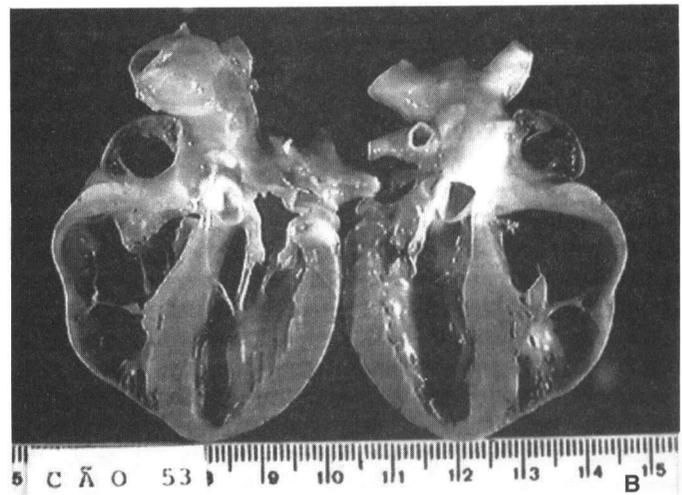
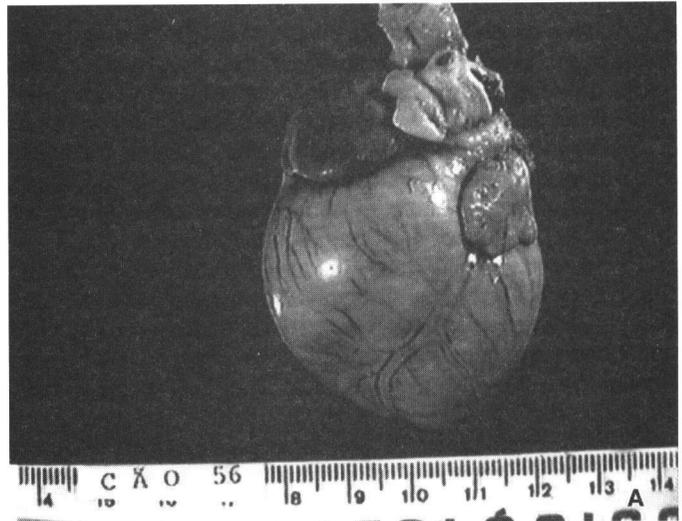
O estudo ultra-estrutural do miocárdio mostrou parasitos intracelulares íntegros ou em necrose e/ou apoptose, permitindo obter importantes informações sobre a participação de um mecanismo imune envolvido na fase aguda da infecção.<sup>134</sup> Foi demonstrada a presença de grandes linfócitos granulares e pequenos linfócitos agranulares aderentes às células cardíacas. Lesões focais da membrana basal, miocitólise e separação das junções intercelulares estavam presentes em relação à aderência de linfócitos granulares, observando-se necrose e seqüestração de porções dos miócitos englobados por macrófagos. Essas alterações sugerem um mecanismo citotóxico e citolítico, mediado por células imunes efetoras, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*.<sup>134</sup> A presença de grandes linfócitos aderentes ao endotélio dos capilares caracterizou também uma microangiopatia.

O quadro eletrocardiográfico na fase aguda está correlacionado com as lesões inflamatórias e necróticas do sistema de condução, correspondendo a alterações do tipo isquêmico, bloqueios intraventriculares e hemibloqueios de ramo esquerdo. Interessante observação decorreu do estudo do sistema de condução de cães na fase aguda, onde se demonstrou que, nos casos em que se desenvolveram bloqueios do feixe de His e dos seus ramos, havia necrose das miocélulas específicas desse sistema, sendo este um sinal de péssimo prognóstico. Em outros casos agudos, com intenso infiltrado nesse sistema, porém sem necrose, não ocorreram bloqueios eletrocardiográficos indicativos de lesões do tecido excitocondutor. Em muitos casos, houve regressão das alterações representativas dos distúrbios de condução intra-atrial, quando os cães foram submetidos a tratamento específico associado a um anti-inflamatório potente, indicando que o infiltrado inflamatório tem importante papel nesses distúrbios e que eles são reversíveis.<sup>135</sup>

### 3.2. Alterações Histopatológicas na Fase Crônica Indeterminada do Cão

A forma indeterminada no cão, como no homem, cursa sem sintomatologia e sem alterações eletrocardiográficas. Os animais acompanhados desde a fase aguda até 3 anos após a infecção apresentam bom desenvolvimento, com saúde aparente e ativos. O estudo histopatológico do coração, nesses animais, mostrou apenas lesões inflamatórias focais discretas, constituídas por macrófagos e linfócitos. Em estudo detalhado de cães, na fase indeterminada da doença, os quais haviam sido inoculados com diferentes cepas do *T. cruzi*, Andrade et al.<sup>136</sup> descreveram alterações macroscópicas mínimas, com discreta dilatação das câmaras direitas em alguns casos; ao exame microscópico, foram

observados, em 50% dos casos, focos de infiltração mononuclear e fibrose, principalmente em átrio e ventrículo direitos, enquanto o miocárdio do ventrículo esquerdo é essencialmente normal. Os infiltrados inflamatórios consistem essencialmente em linfócitos, com alguns macrófagos e plasmócitos e raros focos de fibrose cicatricial; não foram encontrados parasitos no miocárdio nesses casos. O nódulo sinusal (SA) nesses animais, contrariamente ao observado nos controles, mostrava densificação do colágeno intersticial e, algumas vezes, placas de fibrose. Por vezes, havia infiltração adiposa do miocárdio atingindo o nódulo SA. O nódulo atrioventricular (AV) mostrava fibrose difusa intersticial de moderada intensidade, correspondente à atrofia e ao desaparecimento das fibras específicas do sistema de condução; porém, não havia destruição completa nem perda de continuidade das fibras do sistema. O feixe de His mostrava, por vezes, fibrose e infiltração adiposa (Figura 14a, b), atingindo até 70% do feixe principal e propagando-se à origem do ramo direito. Entretanto, o infiltrado inflamatório era escasso e focal, sen-



**Figura 14** Aspectos macroscópicos do coração de cães jovens na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*: **A)** coração aumentado de volume à custa de dilatação do ventrículo direito; átrio direito dilatado e acen-tuadamente congestionado; **B)** secção sagital do coração, evidenciando a dilatação de átrio e ventrículo direitos e moderada hipertrofia de ventrículo esquerdo.

do representado por poucos focos de infiltração linfocitária, e totalmente ausente em muitos casos. A constatação de lesões residuais, com escaras ou focos de fibrose, sem atividade, no tecido de condução, pode contribuir para uma melhor avaliação prognóstica nos casos de forma indeterminada, no sentido de que, nem sempre, alterações espontâneas ou provocadas do ECG representariam um sinal de cardiopatia evolutiva, como demonstraram Scalabrini et al.<sup>137</sup>

Em estudo ao microscópio eletrônico, constataram Andrade et al.<sup>138</sup> que, diferentemente do que foi observado na fase aguda, as células linfocíticas não mostram tendência a aderir ao miócito, não determinam alterações citotóxicas sobre estes e mostram tendência ao desaparecimento por apoptose, com condensação citoplasmática e alterações características da cromatina nuclear.<sup>138</sup> Esses achados falam a favor de um equilíbrio parasito/hospedeiro nessa fase e de uma auto-regulação da inflamação pelo processo de apoptose das células efectoras da resposta imunológica. Esse aparente equilíbrio pode ser rompido, quando se interfere com a rede imunológica e são suprimidos os mecanismos de supressão da hipersensibilidade tardia pelo uso de ciclofosfamida em baixas doses, como descrito por Andrade et al.<sup>139</sup> Na forma indeterminada, a resposta do cão a esse tratamento resultou na instalação de uma miocardite crônica ativa, que variou de intensidade nos diferentes animais tratados, sendo intensa e difusa em alguns, com necrose focal fibrinóide e lítica de células cardíacas e substituição das miocélulas em desintegração por intenso infiltrado mononuclear. Os controles não-tratados apresentavam apenas miocardite focal discreta, representada por acúmulos focais de linfócitos no interstício.

Desse modo, o cão se mostrou um excelente modelo para futuros estudos sobre os mecanismos imunológicos, responsáveis pela manutenção da forma indeterminada e pela sua eventual evolução para uma forma crônica cardíaca.

### 3.3. A Cardiopatia Crônica no Modelo Experimental Canino

Em cães com infecção crônica pelo *T. cruzi*, Anselmi et al.<sup>122,123,125</sup> fizeram correlação entre achados eletrocardiográficos e histopatológicos, incluindo o estudo do sistema de condução.<sup>124</sup> Verificaram, através da implantação de eletrodos no coração do cão, que os aneurismas da parede e da ponta correspondem a alterações de zona inativada e de desnivelamento do segmento ST e alterações da onda T.

Em cão com infecção experimental de 16 meses de duração pelo *T. cruzi*, o qual desenvolveu um quadro de insuficiência cardíaca congestiva com todas as características da cardiopatia chagásica humana, apresentando alterações eletrocardiográficas evolutivas, com bloqueio de ramo direito e hemibloqueio anterior esquerdo, Laranja e Andrade<sup>140</sup> descreveram uma miocardite crônica difusa, evolutiva e fibrosante. As secções do coração mostraram processo inflamatório, difusamente distribuído no miocárdio, dissociando e substituindo as células cardíacas. Os infiltrados eram predominantemente linfocitários, com plasmócitos e macrófagos de permeio. Havia espessamento difuso do tecido intersticial, principalmente em paredes atriais e em ventrículo direito, acompanhado de infiltrado mononuclear difuso. Não foram vistos parasitos, porém as miocélulas cardíacas não-parasitadas apresentavam, eventualmente, alterações degenerativas, com vacuolização, fragmentação, atrofia e edema intermitofibrilar.

Os aspectos apresentados mostram que o cão tem como principal vantagem reproduzir as diversas fases da doença de Chagas, permitindo um monitoramento eletrocardiográfico e correlação com lesões do sistema excitocondutor do coração. Além disso, o cão tem sido muito utilizado pelos fisiologistas para o estudo eletrofisiológico do coração, o que permite uma sólida base para a interpretação dos achados na doença de Chagas.

Como desvantagem, há o fato de necessitar de um longo período de acompanhamento para que se possa surpreender a fase crônica cardíaca, permanecendo os cães na fase indeterminada em alta percentagem dos casos, sendo raros os casos descritos na literatura de forma crônica cardíaca bem desenvolvida.

### 3.4. Investigação dos Mecanismos Patogênicos no Modelo Canino

Os estudos no cão têm contribuído para o esclarecimento dos mecanismos patogênicos envolvidos nas diferentes fases da infecção pelo *T. cruzi*, como já referido.

Em estudo recente, 8 cães jovens, pesando entre 1.000 e 1.900 g, inoculados com tripomastigotas sanguíneas ( $4 \times 10^5$ /kg) da cepa 12 SF, foram estudados na fase aguda da infecção, com o objetivo de investigar os mecanismos patogênicos envolvidos nessa fase. O coração de cada um dos cães sacrificados foi submetido a um estudo histopatológico, ultra-estrutural e imunoistoquímico, com o objetivo de descrever detalhadamente as alterações morfológicas e de diagnosticar a participação das células inflamatórias (linhagens de linfócitos) e de células apresentadoras de antígenos (células dendríticas intersticiais do miocárdio).<sup>141</sup> Foi também investigada a participação do fenômeno de apoptose na evolução das lesões não só dos parasitos e de células inflamatórias, mas também das células cardíacas não-parasitadas.<sup>142</sup>

A demonstração do fenômeno de apoptose *in vivo*, na infecção pelo *T. cruzi*, foi feita pela primeira vez no modelo canino,<sup>142</sup> com envolvimento dos miócitos, de linfócitos e de parasitos intra- e extracelulares. Com o objetivo de investigar a ocorrência de apoptose no processo de miocardite aguda, foi usada a técnica de incorporação ao DNA do núcleo, de desoxinucleotídeos marcados pela fluoresceína, pela desoxinucleotíдил-transferase. A expressão de *Bcl-2*, *Bax* and *Fas* nos diversos tipos celulares e no *T. cruzi* foi examinada por método imunoistoquímico usando anticorpo conjugado ao vermelho-Texas. Os núcleos foram corados pelo DAPI e as preparações examinadas pelo microscópio confocal a *laser*. A apoptose foi identificada: 1) em miócitos cardíacos e em células endoteliais de capilares e vênulas; 2) em células imunes efectoras — macrófagos, linfócitos granulares e agranulares — e em células dendríticas intersticiais; 3) em formas intra- e extracelulares do *T. cruzi*. A apoptose dos miócitos e das células endoteliais estava relacionada com aumento de reatividade para *Fas* e *Bax* e decréscimo de atividade para *Bcl-2*. A apoptose das células imunes pode representar uma regressão da inflamação ou uma modulação da resposta imune. A presença de apoptose representa um importante fator na patogênese da miocardite aguda chagásica. Em estudo de linfócitos de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, a estimulação *in vitro* das células T resultou em apoptose de linfócitos CD4, mas não de CD8, sugerindo que a depleção das células CD4 na fase crônica da infecção está relacionada com a apoptose seletiva dessas células.<sup>143</sup> Entretanto, não foi determinado se esse mecanismo imunológico também ocorre no modelo canino.

Com o objetivo de esclarecer a participação dos tipos de linfócitos na miocardite chagásica do cão, foi feita a tipagem das linhagens de linfócitos no miocárdio, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção. Na fase aguda, os linfócitos CD4+ eram os mais proeminentes e formavam acúmulos em focos inflamatórios que substituíam células cardíacas destruídas. Os linfócitos CD8 eram pouco numerosos, dispersos nos focos inflamatórios e no interstício. Na fase crônica indeterminada, havia pequenos focos de infiltração em torno de células cardíacas destruídas, onde os linfócitos CD4+ e CD8+ apareciam em quantidades semelhantes. Nos casos de miocardite crônica, os infiltrados inflamatórios eram bem evidentes, variando de intensidade de um caso para outro, seja como extensos infiltrados perivasculares, seguindo os trajetos de pequenos vasos com predominância de linfócitos CD4+ e pequeno número de CD8+, seja como extensas áreas focais em torno de células cardíacas destruídas, com predominância de linfócitos CD8; nessas áreas, os plasmócitos apareciam em número significativo. É, pois, interessante assinalar a participação de linfócitos CD8 e CD4 nos infiltrados inflamatórios do miocárdio, variando a sua distribuição de acordo com a sua topografia.

As células dendríticas intersticiais do coração, que são células MHC-II dependentes, têm um importante papel no transporte de antígenos e na sensibilização das células T CD4 do baço através da sua capacidade de migração e apresentação de antígenos, iniciando assim o processo de rejeição de transplantes. Na doença de Chagas, o parasitismo cardíaco e a liberação de antígenos parasitários propiciam as condições de captação desses antígenos pelas células dendríticas, que, desse modo, poderiam estar mantendo o estado de hipersensibilidade tardia do organismo na infecção pelo *T. cruzi*. A partir dessa hipótese, procurou-se investigar a participação dessas células na patogenia da doença. Com esse objetivo, foram usadas técnicas de imunistoquímica utilizando-se como marcador das células dendríticas a proteína S/100.<sup>144</sup> Posteriormente, foi pesquisada, nessas células, a presença de antígenos parasitários através da imunomarcagem com peroxidase, usando como anticorpo primário o anti-*T. cruzi* e, como anticorpo secundário, o soro de coelho conjugado com peroxidase.<sup>145</sup> Foi demonstrada, nesse estudo, a presença de antígenos parasitários seqüestrados em células dendríticas intersticiais do miocárdio, observando-se significativo aumento dessas células não só na fase aguda como também na fase crônica da infecção. As células dendríticas apresentaram nítida relação com os infiltrados inflamatórios e tendência a se associarem aos linfócitos CD4.

Esses achados contribuem para o esclarecimento da patogenia das lesões da fase crônica e reforçam o papel dos antígenos parasitários na manutenção da resposta celular nesse modelo. Além disso, confirmam a importância da hipersensibilidade tardia no desenvolvimento das lesões, com manutenção dos antígenos parasitários nas células dendríticas intersticiais do coração.

## 4. OUTROS MODELOS EXPERIMENTAIS

### 4.1. Ratos

O rato tem sido utilizado em várias investigações sobre aspectos gerais da infecção pelo *T. cruzi*. A infecção nesse animal progride até a terceira semana, quando ocorre o óbito, ou os ani-

mais passam a uma fase crônica, dependendo da patogenicidade da cepa, como foi visto por Brand<sup>146</sup> estudando comparativamente o curso da infecção em ratos pelas cepas Brasil, Panamá, Welcome e Guatemala. As lesões com a cepa Brasil foram mais disseminadas, atingindo células macrofágicas, miocárdio e músculo esquelético, com alta mortalidade, enquanto as demais determinaram apenas discreta miocardite. De acordo com Vichi,<sup>147</sup> a cepa Y determinou infecção grave em ratos Wistar de 25 a 50 g, com alta mortalidade entre o 10.º e o 25.º dia, lesões irregulares em miocárdio, com intensa miocardite em alguns. Em ratos Wistar de 40 dias, inoculados com essa mesma cepa (Y), Scorza e Scorza<sup>148</sup> observaram miocardite de grande intensidade, que atingiu o máximo aos 18 dias de infecção, porém os animais não morreram espontaneamente até mais de 30 dias após a infecção. Nesses animais foi visto envolvimento do sistema nervoso autônomo em coração, com ganglionite e periganglionite intensas. Em ratos Lewis foram detectadas diferenças qualitativas e quantitativas na parasitemia e nas lesões tissulares na infecção com 4 clones do *T. cruzi*.<sup>149</sup> O clone SylvioX10/7 determinou altas parasitemias, e os animais morreram na fase aguda; com os clones SylvioX10/4, Miranda/78 ou Miranda/80, a infecção foi menos virulenta e não foi fatal. Com o clone SylvioX10/4 houve um desenvolvimento de fibrose mais extensa do que nos demais. Em detalhado estudo histopatológico de ratos inoculados com as cepas Y, 12SF e Colombiana, Chapadeiro et al.<sup>150</sup> descreveram as lesões da fase aguda e crônica com as três cepas, chamando a atenção para pontos importantes que foram observados: 1) há acentuadas lesões inflamatórias e parasitismo cardíaco na fase aguda, semelhante nas três cepas; 2) há nítidas lesões inflamatórias na fase crônica, variando de grau leve, moderado ou intenso, sendo descritas lesões focais, zonais (focais confluentes) ou difusas. Chamam a atenção esses autores para a importância do inóculo na intensidade das lesões; na infecção com as cepas Y e 12 SF, os inóculos baixos não determinaram lesões ou estas eram de grau leve; com a cepa Colombiana, entretanto, mesmo os baixos inóculos determinaram lesões significativas. Nos ratos infectados com inóculos médios e altos das cepas Y e 12 SF, ou com inóculo médio da cepa Colombiana, as lesões histopatológicas estavam presentes em todos os grupos. Considerando as lesões da fase crônica e aplicando o método de escores para avaliação semiquantitativa das lesões histopatológicas, chegou à conclusão de que o acometimento crônico nos ratos chagásicos foi usualmente de grau leve a moderado. Alguns animais, entretanto, inoculados com quaisquer das cepas, exibiram graves lesões cardíacas, principalmente de inervação intrínseca e do miocárdio atrial ou ventricular.<sup>150</sup>

Usando o modelo do rato, Revelli et al.<sup>151</sup> verificaram ainda, na fase aguda, uma resposta humoral específica, alterações leves e não-progressivas do eletrocardiograma aos 6 meses de infecção e uma alta percentagem de miocardite crônica focal, até um ano após a infecção, com lesões focais discretas, sendo os linfócitos as células predominantes.<sup>152</sup> Nesse modelo, os ratos foram tratados com IFN $\gamma$  tendo sido observado que a prevalência da miocardite crônica focal nos animais tratados não mostrou alterações em relação aos controles, porém houve reversão da relação CD4/CD8, dos linfócitos T no baço e linfonodos, com o uso do IFN $\gamma$ .<sup>152</sup> Na infecção de ratos Wistar com a cepa Y, observou-se predominância de células T CD8+ no miocárdio a partir do 9.º dia de infecção, com aumento progressivo até o óbito, aos 18 dias. Desse modo, a ativação policlonal de linfócitos T, induzida pela infecção com o *T. cruzi*, resultou num estímulo à atividade dos linfócitos CD8+ no baço, sangue e miocárdio.<sup>153</sup>

Estudando o efeito da timectomia em ratos adultos infectados com o *T. cruzi*, Botasso et al.<sup>154</sup> observaram aumento das lesões crônicas miocárdicas nos ratos timectomizados, sugerindo que a timectomia interfere no mecanismo imunorregulatório, levando à exacerbação das lesões de auto-imunidade.

O rato tem sido usado como modelo para o estudo do sistema nervoso autônomo e da desnervação que ocorre na doença de Chagas, tendo Alcântara e Oliveira<sup>155</sup> e Alcântara et al.<sup>156</sup> demonstrado acentuado grau de desnervação do plexo de Auerbach em ratos Wistar e Norvegicus infectados pelo *T. cruzi* e estudados na fase crônica da infecção. Machado e Ribeiro<sup>157</sup> estudaram a desnervação simpática no coração em ratos infectados com a cepa Y, verificando que, na fase aguda, aos 6 dias de infecção, paralelamente ao acentuado parasitismo e inflamação no miocárdio, iniciava-se a desnervação simpática, e, aos 20 dias, não eram encontradas terminações nervosas no miocárdio ou em vasos. Com o objetivo de investigar alterações da função parassimpática no coração, ratos Wistar infectados pelo *T. cruzi* (cepas Y, São Felipe e Colômbia) foram avaliados quanto à bradicardia barorreflexa após injeção de fenilefrina.<sup>158</sup> Os resultados obtidos mostraram disfunção autonômica semelhante à observada na doença de Chagas humana, resultante primariamente de alterações da atividade parassimpática eferente, causada por lesões neurogânglionares intrínsecas. Na tentativa de correlacionar a desnervação parassimpática com a disfunção autonômica cardíaca no rato, na fase aguda e crônica da infecção pelo *T. cruzi*, Chapadeiro et al.<sup>159,160</sup> fizeram o estudo histológico e a contagem de neurônios nos plexos cardíacos. Embora tivessem constatado, na fase aguda, a presença de ganglionite, periganglionite e neurite, não houve diminuição significativa do número de neurônios tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção, tendo incluído na contagem não só os neurônios normais mas também aqueles com sinais de degeneração.

Desse modo, o modelo do rato tem vantagens quanto a determinados tipos de experimentos com o *T. cruzi*, contribuindo para o esclarecimento dos mecanismos patogênicos da doença.

## 4.2. Coelhos

Os coelhos têm sido utilizados por diferentes pesquisadores a partir dos estudos de Agosin e Badinez,<sup>161</sup> os quais observaram lesões tissulares com grandes ninhos de parasitos no interior de fibras musculares. Teixeira et al.<sup>162</sup> estudaram a infecção crônica em coelhos, tendo descrito uma miocardite crônica difusa, sem parasitos, nos tecidos e o desenvolvimento de megacólon em um dos animais, bem como um caso de transmissão congênita, detalhando, posteriormente, o estudo desse modelo.<sup>163</sup>

Em nossa experiência, o coelho é um animal pouco suscetível e não desenvolve um quadro agudo patente, sendo observadas baixas parasitemias, lesões focais pouco significativas e lesões de fase crônica escassas e pouco acentuadas. Nesse estudo foram utilizados três grupos experimentais com 6 coelhos em cada grupo, sendo utilizados animais jovens, com 40 a 45 dias, logo após o desmame. Em cada grupo foram utilizados coelhos de uma mesma ninhada inoculados com formas tripomastigotas sanguíneas de diferentes cepas do *T. cruzi*. O estudo histopatológico feito na fase aguda mostrou pequenos focos de infiltração mononuclear esparsos no miocárdio, que correspondiam a focos de destruição de fibras cardíacas, observando-se, localmente, a presença de detritos celulares. Não havia infiltrado infla-

matório difuso do miocárdio e não foram vistas alterações musculares ou de outros órgãos ou tecidos. O estudo da fase crônica mostrou a presença de focos de infiltração mononuclear, raros e esparsos, e pequenos focos de fibrose intersticial, não sendo encontrados parasitos. Não se pôde, assim, confirmar, nesse estudo, a presença de uma miocardite crônica evolutiva, nem lesões tissulares outras que pudessem recomendar, sob o ponto de vista anatomopatológico, o coelho como um bom modelo experimental para o estudo da patologia da doença de Chagas. Vale ressaltar, entretanto, que os animais na fase crônica apresentaram positividade da reação de fixação de complemento. Em estudos imunológicos, Teixeira e Santos Buch<sup>164</sup> utilizaram o modelo do coelho, tendo sido obtidos bons resultados na demonstração de fenômenos de hipersensibilidade celular e humoral na doença de Chagas. Ramirez e Brener<sup>165</sup> estudaram a infecção crônica em coelhos infectados com as cepas Y e CL, tendo descrito focos de inflamação crônica, em graus variáveis, nos 7 coelhos estudados.

## 4.3. Primatas

Os primatas do gênero *Callithrix penicillata* foram usados desde Chagas<sup>1</sup> e desenvolveram infecção 20 a 30 dias após terem sido expostos aos triatomíneos infectados, com grande número de tripomastigotas no sangue periférico. Dorland<sup>166</sup> contaminou macacos através da conjuntiva ocular, usando cepas de origem humana do Panamá e da Venezuela e cepas isoladas no Texas e na Califórnia, em todos obtendo uma infecção positiva, alguns com sinal de Romaña, observando uma miocardite discreta com formas amastigotas no miocárdio. Marsden et al.<sup>167</sup> estudaram o comportamento da cepa Peruana em macacos *rhesus* por inoculação subcutânea, na pálpebra, observando o desenvolvimento de edema periorbital e presença de parasitos no sangue periférico, além de elevação progressiva dos níveis de IgM. Bolomo et al.<sup>168</sup> (1980) descreveram, no macaco *Cebus*, um quadro de infecção crônica que os autores compararam com a forma crônica da doença no homem. Os estudos de Falasca et al.<sup>169</sup> demonstraram, em animais com 20 a 25 meses de infecção, lesões miocárdicas com acúmulos focais de linfócitos e miocitólise; focos de fibrose intersticial com discreto infiltrado de leucócitos foram vistos de 36 a 47 meses, porém não foram vistos parasitos. As lesões eram mais proeminentes nas paredes ventriculares e no septo. O estudo eletrocardiográfico, nesse modelo,<sup>170</sup> mostrou bloqueio de ramo direito, sobrecarga de ventrículo esquerdo, distúrbios de repolarização, hemibloqueio anterior esquerdo e extra-sístoles.

Podemos concluir que os primatas podem se constituir em um bom modelo para o estudo da fase crônica da doença de Chagas, desenvolvendo uma forma leve, geralmente assintomática, característica da forma indeterminada, ou apresentando alterações eletrocardiográficas que indicam a evolução para uma forma cardíaca.

## 4.4. Cobaiois

Os cobaiois têm servido de modelo para a infecção experimental pelo *T. cruzi* desde as fases iniciais das pesquisas sobre a doença de Chagas. Desenvolvem uma infecção de curso regular com 6 a 7 dias de incubação, evoluindo até 30 dias, em média. Nessa fase, os cobaiois infectados em geral morrem. As lesões ocorrem em miocárdio e músculo esquelético, com envolvimento

também de células do sistema fagocítico mononuclear, prestando-se o animal para estudos da cardite experimental em seus aspectos imunológicos e ultra-estruturais.<sup>171</sup> Há, em geral, uma miocardite crônica difusa, tendo Franco<sup>172</sup> comprovado a presença de antígenos parasitários intimamente relacionados com as lesões intersticiais e observado a presença de material antigênico no citoplasma de células inflamatórias e no endotélio tumefeito dos capilares. Mesmo nos casos crônicos, demonstrou esse autor a presença de antígenos relacionados com os focos inflamatórios.

A infecção de cobaias com diferentes cepas do *T. cruzi* foi desenvolvida por Falângola,<sup>173</sup> com o objetivo de estudar o desenvolvimento de lesões do sistema nervoso central nesse modelo, em comparação com outras espécies animais, como o rato e o camundongo. Na infecção pela cepa 21SF, as lesões inflamatórias, localizadas nos plexos coróides, eram pouco frequentes (33,3% dos casos) e sempre discretas, e a pesquisa de parasitos ou antígenos parasitários foi sempre negativa. Com a cepa Peruana, as lesões meningoencefálicas eram discretas e ocorreram em apenas 25% dos casos. Também com a cepa Colombiana as lesões eram discretas e de baixa incidência. Desse modo, o cobaio não é um bom modelo para estudo das lesões do sistema nervoso central.

O modelo do cobaio para estudo da patologia da doença de Chagas, que foi usado nos estudos iniciais, está sendo cada vez menos empregado, substituído pelo camundongo e pelo rato.

#### 4.5. O *Calomys callosus* (Rodentia Cricetidae)

O *Calomys callosus* é um reservatório natural do *Trypanosoma cruzi*. A biologia desse roedor e a sua manutenção em laboratório foram descritas por Mello.<sup>174</sup> É de interesse verificar como se comporta esse animal quando infectado por cepas do *T. cruzi* mantidas em laboratório. Com esse objetivo, Borges et al.<sup>175</sup> desenvolveram estudos da infecção do *C. callosus* com diferentes cepas do *T. cruzi* em comparação com o camundongo, não só quanto ao desenvolvimento de lesões histopatológicas como em relação à ativação dos macrófagos peritoneais desses animais frente à infecção. Foram utilizadas, nesse estudo, as cepas Y, F, M226 (isolada de *C. callosus* naturalmente infectado) e Costalimai (isolada de *Triatoma costalimai*). O *C. callosus* mostrou níveis parasitemicos superponíveis aos do camundongo com as cepas Y e F, porém, enquanto os camundongos tiveram alta mortalidade, todos os *Calomys* sobreviveram à infecção, mostrando regressão das lesões histopatológicas entre 40 e 60 dias. Com as duas cepas do *T. cruzi* de origem silvestre (M226 e Costalimai), os camundongos não desenvolveram parasitemias patentes, porém apresentavam intensas lesões tissulares, enquanto os *C. callosus* desenvolveram baixas parasitemias e ausência de lesões, indicando uma adaptação e maior resistência às cepas silvestres. O estudo histopatológico e ultra-estrutural permitiu demonstrar aspectos peculiares da infecção desse roedor, como descrito por Andrade et al.<sup>176</sup> Verificaram esses autores que o *C. callosus*, quando infectado pela cepa F, que tem as características de uma cepa de Tipo III, Z1, desenvolve intensas lesões inflamatórias em músculo esquelético e miocárdio, com predominância de macrófagos, que assumem aspecto epitelióide, de linfócitos e fibroblastos. Simultaneamente se desenvolve intenso processo fibrogênico, que se inicia precocemente (26 a 30 dias), com acentuada proliferação fibroblástica e espessamento da

matriz intercelular, com depósito de colágeno (Figura 15). Dos 50 aos 60 dias de infecção, observa-se regressão da inflamação e da fibrose, restando apenas infiltrados focais residuais. Os depósitos colagênicos intersticiais mostram densificação e a matriz mostra sinais de fibrólise, indicando regressão do processo fibrogênico (Figura 16).

A ativação de macrófagos peritoneais foi idêntica em camundongos e *Calomys* infectados com a cepa Y. Na infecção com a cepa F, a liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> foi idêntica nas duas espécies, porém variou no *timing*, pois continuava elevada em camundongos após os 60 dias quando as lesões estavam presentes e era muito baixa nos *Calomys* entre 40 e 60 dias, correspondendo à regressão das lesões observada nessa espécie. As maiores diferenças na liberação de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> de macrófagos peritoneais foram vistas com as duas cepas silvestres (Costalimai e M226). A primeira destas determinou, no camundongo, altos níveis de ativação dos macrófagos, o que correspondeu à intensa agressão tissular determinada por essa cepa, enquanto o *C. callosus* apresentou apenas discreta ativação de macrófagos e ausência de lesões. Os mesmos achados foram obtidos com a cepa M226.<sup>175</sup>

O estudo dos níveis de gama Interferon (IFN- $\gamma$ ) no *C. callosus*<sup>177</sup> demonstrou níveis mais altos no soro dos animais infectados com a cepa F, a qual se caracteriza por determinar, no *C. callosus*, lesões de grande intensidade em miocárdio e músculo esquelético na fase aguda da infecção, com regressão total por volta de 60 dias. O *C. callosus* infectado pela cepa F constitui-

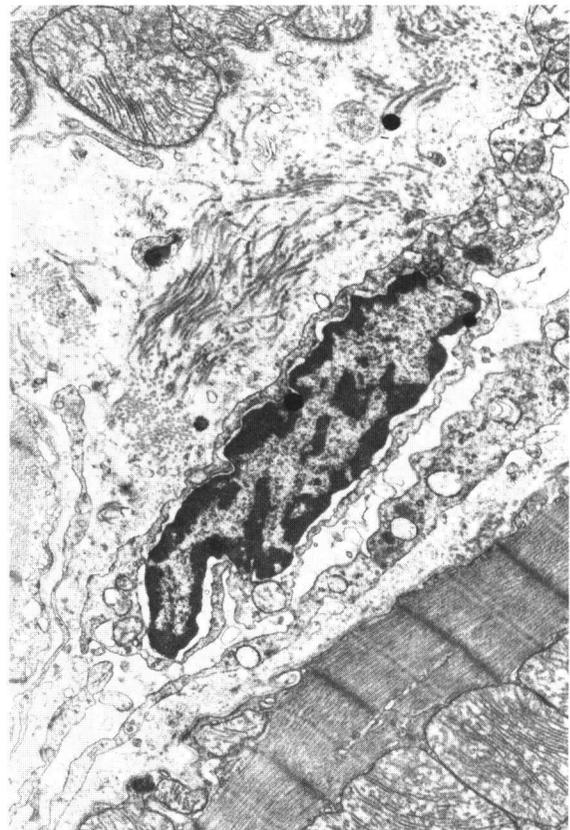
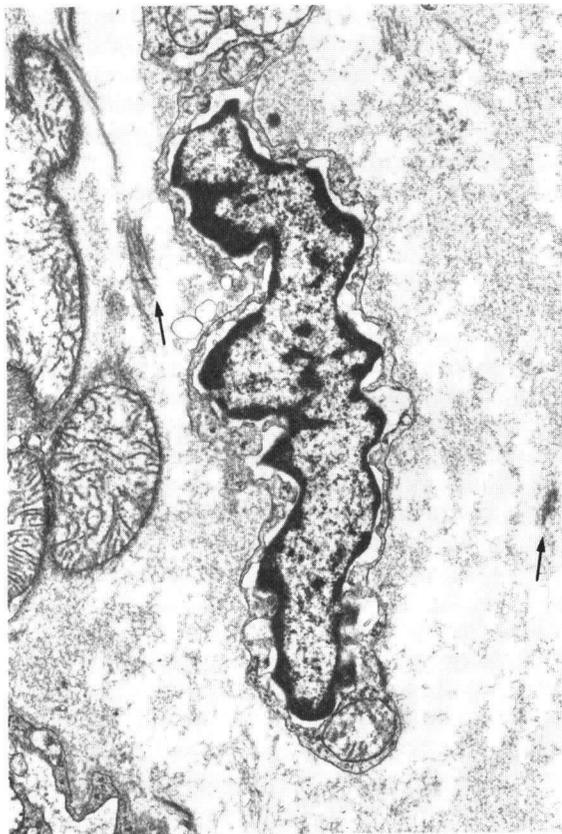


Figura 15 Aspectos da fibrogênese no miocárdio de *Calomys callosus* infectado pelo *T. cruzi*: presença de fibroblasto, depósito de colágeno e componente fibrilar matricial. (ME. 4.000  $\times$ .)



**Figura 16** Regressão espontânea da fibrose do miocárdio em *Calomys callosus* com 60 dias de infecção pelo *T. cruzi*: presença de fibroblasto, sinais de fibrólise da matriz intersticial e densificação de pequenos feixes colagênicos. (ME. 4.000  $\times$ )

se, dessa maneira, em um excelente modelo para o estudo da resistência nessa espécie, e a sua correlação com os aspectos peculiares da sua patologia. De fato, embora considerado "resistente" devido à ausência de mortalidade e à negatização parasitêmica, o *C. callosus* desenvolve acentuadas lesões, com intenso e precoce processo fibrogênico.

As peculiaridades apresentadas por esse modelo recomendam-no para as pesquisas sobre o controle imunológico da infecção, processo de fibrogênese e regressão espontânea da fibrose. Além disso, é um animal de pequeno porte e de fácil manuseio. A dificuldade está apenas na obtenção e manutenção de colônias desses animais para a sua fácil utilização, como ocorre com o camundongo.

## 5. CONCLUSÃO

Ao concluir o presente capítulo, vale assinalar que, de acordo com o objetivo proposto, foi dado ênfase aos aspectos mais ligados à patologia experimental e à imunopatologia nos diversos modelos, tendo como base as alterações observadas *in vivo* e seus aspectos patogênicos.

Em outros capítulos deste livro estão bem desenvolvidos os aspectos imunológicos *in vitro* e *in vivo*, e parasitológicos propriamente ditos, os quais, juntamente com os quadros morfológicos, se constituem nas bases para a compreensão da doença de Chagas.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Chagas C. Nova tripanosomíase humana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1909.
2. Minoprio P. Chagas' disease: CD5 B-cell dependent Th2 pathology? *Res Immunol*, 142:137-140, 1991.
3. Wirth JJ, Kierzenbaum F, Sonnenfeld G, Zlotnik A. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cells association with and killing of *T. cruzi*. *Infect Immun*, 49:61-66, 1985.
4. Reed SG. In vivo administration of recombinant IFN-gamma induces macrophage activation and prevent acute disease, immune suppression and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *J Immunol*, 140:4342-4347, 1988.
5. Plata F, Garcia-Pons G, Wiezerbin J. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*. Synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma *in vivo*. *Ann Institut Pasteur/Immunology*, 138:397-415, 1987.
6. Gazzinelli RT, Oswald P, Hieny S, James SL, Sher A. The microbicidal activity of interferon- $\delta$ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine dependent, nitrogen oxide-mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- $\beta$ . *Eur J Immunol*, 22:2501-2506, 1992.
7. Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. Nitric oxide is involved in control of *T. cruzi* induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infect Immun*, 62:5177-5182, 1994.
8. Tarleton RL. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Res Immunol*, 142:130-133, 1991.
9. Tarleton RL. Depletion of CD8+T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *J Immunol*, 144:117-124, 1990.
10. Katzin AM, Colli W. Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi*: na N-acetyl-D-glucosamine containing surface glycoprotein specific for the trypomastogote stage. *Biochem Biophys Acta*, 68:208-215, 1985.
11. Alves MJM. Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are adhesion proteins. *Braz. J Med Biol Res*, 29:831-833, 1996.
12. Giordano R, Chammas R, Veiga SS, Colli W, Alves MJ. An acidic component of the heterogeneous Tc 85 protein family from the surface of *Trypanosoma cruzi* is a laminin binding glycoprotein. *Mol Biochem Parasitol*, 65:85-94, 1994.
13. Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell*, 65:1117-1125, 1991.
14. Schenkman S, Pontes de Carvalho L, Nussenzweig V. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J Exp Med*, 175:567-575, 1992.
15. Grimaud JÁ, Andrade SG. *Trypanosoma cruzi*: Relationship between the intracellular parasitic forms and cardiac myocytes. *Cel Mol Biol*, 30:59-65, 1984.
16. Mayer M, Rocha Lima, H. El comportamiento del *Schizotrypanum cruzi* in animals homeotermicos y artropodos. *Arch Venezol Patol Trop Parasitol Med*, 2:9-49, 1954.
17. Mac-Clure E, Poche R. Die experimental Chagas myocarditis der weissen maus in elektronenmikroskopischen bild. *Virchows Arch Pathol Anat Physiol*, 333:405-420, 1960.
18. Sanabria A. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse myocardium. I. *Trypanosoma Form Exper Parasitol*, 14:81-91, 1963.
19. Sanabria A. Ultrastructure of *Trypanosoma cruzi* in mouse myocardium. II. Crithidial and leishmanial forms. *Exper Parasitol*, 15:125-137, 1964.
20. Tafuri WL. Microscopia eletrônica do miocárdio na fase aguda da tripanosomíase experimental. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 11:151-164, 1969a.
21. Tafuri WL, Raso P. Lesões do sistema nervoso autônomo simpático do camundongo na fase aguda da tripanosomose cruzi expe-

- rimental. Estudo ao microscópio ótico e eletrônico. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 21:178-188, 1979.
22. Andrade SG, Freitas LAR. *Trypanosoma cruzi*: cardiac myocells alterations due to spontaneous or therapeutically induced intracellular parasite desintegration. *Cell Mol Biol*, 33:797-805, 1987.
  23. Andrade SG, Magalhães JB, Pontes AL. Evaluation of chemotherapy with benzimidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bull Wrld Hlth Org*, 63:721-726, 1985.
  24. Silva JC, Pirmez C, Morgado MG, Galvão-Castro B. Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the infection. *Parasite Immunol*, 7:457-466, 1985.
  25. Ribeiro dos Santos R, Pirmez C, Savino W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. *Res Immunol*, 142:134-137, 1991.
  26. Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G, Milon G, Marshal G, Eisen H. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. *Eur J Immunol*, 17:1027-1033, 1987.
  27. Russo M, Starobinas N, Minoprio P, Coutinho AG, Hontebeyrie-Joskowicz M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi* — infected mice after inactivation of helper T cells. *Ann Inst Pasteur (Immunol)*, 139:225-236, 1988.
  28. Rottenberg M, Cardoni RL, Anderson R, Segura EL, ORN A. Role of T help/inducer cells as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand J Immunol*, 28:573-582, 1988.
  29. Brener Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*, 59:19-26, 1965.
  30. Brener Z, Chiari E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 5:220-224, 1963.
  31. Andrade SG, Carvalho ML, Figueira RM. Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz Méd Bahia*, 70:32-42, 1970.
  32. Andrade SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Patol Trop*, 3:65-121, 1974a.
  33. Miles MA, Lanham SM, Souza AA, Pova M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 74:221-237, 1980.
  34. Andrade V, Brodskyn C, Andrade SG. Correlation between isoenzyme patterns and biological behavior of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 77:796-799, 1983.
  35. Andrade ZA, Rocha Silva HR. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 90:521-522, 1995.
  36. Tibayrenc M, Ayala F. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evaluation*, 42:277-292, 1988.
  37. Campos RF, Gonçalves MS, dos Reis EAG, dos Reis MG. Comparative analysis by PCR amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe — Bahia, its clones and subclones: Possibility of predominance of a principal clone in this area. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 94:23-29, 1999.
  38. Lauria-Pires L, Teixeira ARL. Virulence and pathogenicity associated with diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients. *Am J Trop Med Hyg*, 55:304-310, 1996a.
  39. Macedo AM, Pena SDJ. Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the pathogenesis of Chagas' disease. *Parasitol Today*, 14:119-123, 1998.
  40. Trischman T, Tanowitz H, Wittner M, Bloom B. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exper Parasitol*, 45:160-168, 1978.
  41. Boyer MH, Hoff R, Kipinis TL, Murphy ED, Roths JB. *Trypanosoma cruzi*: susceptibility in mice carrying mutant gene Ipr (lymphoproliferation). *Parasite Immunol*, 5:135-142, 1983.
  42. Andrade V, Barral Netto M, Magalhães JB, Andrade SG. Aspectos imunológicos da infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos por três diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 80:203-211, 1985a.
  43. Andrade V, Barral Netto M, Andrade SG. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Brazilian J Med Biol Res*, 18:499-506, 1985b.
  44. Andrade V, Andrade SG, Barral Netto M, Pontes AL, Castro R. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. *Rev Soc Bras Med Trop*, 18:143-154, 1985c.
  45. Trischman TM. *Trypanosoma cruzi*: early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. *Exper Parasitol*, 62:194-201, 1986.
  46. Minoprio P, Coutinho A, Spinella S, Hontebeyrie-Joskowicz M. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *Int Immunol*, 3:427-433, 1991.
  47. Minoprio P, el-Cheikh MC, Murphy E, Hontebeyrie-Joskowicz M, Coffman R, Coutinho A, O'Garra A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. *J Immunol*, 151:4200-4208, 1993.
  48. DeTitto E. Bases genéticas. Em: Storino R, Milei J (eds). *Enfermedad de Chagas*. Buenos Aires: Mosby-Doyma, pp 75-86, 1994.
  49. Wrightsman R, Krassner S, Watson J. Genetic control of response to *Trypanosoma cruzi* in mice. Multiple genes influencing parasite-mice and survival. *Infect Immun*, 36:637-644, 1982.
  50. Andrade SG, Andrade V, Brodskyn C, Magalhães JB. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Ann Trop Med Parasitol*, 79:397-407, 1985.
  51. Muller-Hermelink HK, Lennert K. The cytologic, histologic and functional bases for a modern classification of lymphomas. Em: Lennert K (ed). *Malignant lymphomas other than Hodgkin's disease*. Berlin: Springer-Verlag, 1978.
  52. Cordeiro ZM, Dahia ACG, Andrade ZA. Kinetics of *T. cruzi* destruction in the mouse spleen. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30:3-9, 1997.
  53. Corsini AC, Costa MG. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). I — Evidences of polyclonal B cell activation in experimental infections mimicked by an extract nepaied from circulating trypomastigotes. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 23:114-121, 1981.
  54. D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A, Kipinis T, Eisen H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Eur J Immunol*, 15:21-203, 1985.
  55. Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa S, Coutinho A. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: The predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI Tcells. *Immunol Reviews*, 112:183-207, 1989.
  56. Minoprio PM, Eisen H, Forini L, D'Imperio Lima MR, Joskowicz M, Coutinho A. Polyclonal lymphocyte response to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I — Quantitation of both T and B cell responses. *Scand J Immunol*, 24:661-668, 1986.
  57. Brener Z, Gazzinelli RT. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*, 114:103-110, 1997.
  58. Harel-Bellan A, Joskowicz M, Fradelizi D, Eisen H. T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: production of and response to interleukin 2. *Eur J Immunol*, 15:438-442, 1985.
  59. Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi* induced suppression of IL-2 production. I — Evidence for the presence of IL-2 producing cells. *J Immunol*, 140:2763-2768, 1988a.
  60. Tarleton RL. *Trypanosoma cruzi* induced suppression of IL-2 production. II — Evidence for a role of suppressor cells. *J Immunol*, 140:2769-2773, 1988b.

61. Kierzenbaum F, Moretti E, Szein MB. *Trypanosoma cruzi* induces suppression of DNA synthesis and inhibits expression of interleukin-2. *Immunology*, 74:317-322, 1991.
62. Tarleton R, Kuhn RE. Restoration of *in vitro* immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing IL-2. *J Immunol*, 133:1570-1575, 1984.
63. Silva JS, Morrissey PJ, Grabstein KH, Mohler KM, Anderson D, Reed SG. Interleukin-10 and interferon  $\delta$  regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *J Exper Med*, 175:169-174, 1992.
64. Federici EE, Abelmann WE, Neva FA. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*, 13:272-280, 1964.
65. Kumar R, Kline IK, Abelmann WH. Experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis. Relative effects upon the right and left ventricles. *Am J Pathol*, 57:31-48, 1969.
66. Andrade SG, Andrade ZA. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 10:180-187, 1968.
67. Andrade SG, Andrade ZA. Aspectos anátomo-patológicos e resposta terapêutica na infecção chagásica crônica experimental. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 18:268-275, 1976.
68. Andrade SG. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 85:17-27, 1990.
69. Andrade SG, Sadigursky M. The conduction system of the heart in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: histopathological lesions and electrocardiographic correlations. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82:59-66, 1987.
70. Schlemper Jr BR, Avila CM, Coura JR, Brener Z. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. *Rev Soc Bras Med Trop*, 16: 23-30, 1983.
71. Sadigursky M, Andrade SG. Electrocardiographic changes in experimental chronic murine Chagas' disease. *Brazilian J Med Biol Res*, 19:379-388, 1986.
72. Laguens RP, Cabeza-Meckert PM, Basombrio MA, Chambo JG, Cossio PM, Arana RM, Gelp R. Infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*, 40(suppl 1):33-39, 1980.
73. Molina HA, Milei J, Rimoldi MT, Gonzalez Cappa SM, Storino RA. Histopathology of the heart conducting system in experimental Chagas' disease in the mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 82:241-246, 1988.
74. Bolomo NJ, Morales MC, Basombrio MA, Milei J, De La Veja M, Cossio PM. El ratón Swiss modelo experimental de enfermedad de Chagas. *Bol Acad Nac (Buenos Aires)*, 60:133-143, 1982.
75. Laguens RP, Cabeza-Meckert PM, Gelpi RL. Chronic Chagas' disease in the mouse. I — Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina (Buenos Aires)*, 41:35-39, 1981.
76. Bijovsky AT, Elizari MV, Müller LA, Katzin VI, Gonzaléz-Cappa SM. Chronic infection in mice, with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 25:207-214, 1983.
77. Andrade SG, Grimaud JA. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi*. An ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 81:29-41, 1986.
78. 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 *T. cruzi*. *Am J Trop Med Hyg*, 40:252-260, 1989a.
79. Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* under specific chemotherapy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 86:187-200, 1991a.
80. Takeara HA, Perini A, Silva MH. Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Exper Parasitol*, 52:137-146, 1981.
81. Brodskyn CI, Silva AMN, Takeara HA, Mota I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *T. cruzi*. *Immunol Cell Biol*, 67:343-348, 1989.
82. Juri MA, Ferreira A, Ramos A, Hoecker G. Non-lytic antibodies in H2 controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian J Med Biol Res*, 23:685-695, 1990.
83. Krettli AU, Brener Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to Bem-Younes-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Tricottet V, Eisen H, Reynes M, Said G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 82:77-83, 1988.
84. 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* infection. *Exper Parasitol*, 84:203-213, 1996.
85. 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*, 159:997-1003, 1997.
86. Ben-Younes-Chennoufi A, Hontebeyrie-Joskowicz M, Said G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 82:77-83, 1988.
87. Higushi ML, Brito T, Reis M, Barbosa A, Bellotti G, Pereira-Barreto AC, Pileggi F. Correlation between *T. cruzi* parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis. Light microscopy and immunohistochemical findings. *Cardiovasc Pathol*, 2:101-106, 1993.
88. Jones EM, Colley DG, Tostes S, Lopes ER, Vnencak-Jones CL, MC Curley TL. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. *Am J Trop Med Hyg*, 48:348-357, 1993.
89. Dos Reis G. Cell mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol Today*, 13:335-340, 1997.
90. Sadigursky M, Acosta AM, Santos-Buch C. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. *Am J Trop Med Hyg*, 31:934-941, 1982.
91. Tibbets RS, McCormick TS, Rowland EC, Miller SD, Engman DM. Cardiac antigen-specific autoantibody production is associated with cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J Immunol*, 152:1493-1499, 1994.
92. Ribeiro dos Santos R, Rossi MA, Laus JL, Santana Silva J, 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 Exper Med*, 175:29-39, 1992.
93. 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 USA*, 94:3932-3937, 1997.
94. Andrade SG, Freitas LAR, Peyrol S, Pimentel AS, Sadigursky M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infecting persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. *Bull Wld Hlth Org*, 69:191-197, 1991b.
95. Alcântara FG, Oliveira JAM, Oliveira JSM. Parassimpático do trato digestivo no camundongo com infecção chagásica aguda experimental. *O Hospital*, 68:1189-1199, 1965.
96. Andrade SG, Andrade ZA. Doença de Chagas e alterações neuronais do plexo de Auerbach. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 8:219-224, 1966.
97. Okumura MM. Contribuição para o estudo das lesões dos neurônios do plexo mientérico do cólon na moléstia de Chagas experimental no camundongo branco (*mus musculus*). *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*, 22:192-204, 1967.
98. Okumura MM, Brito T, Silva LHP, Silva AC, Correa Neto A. The pathology of experimental Chagas' disease in mice. I — Digestive

- tract changes, with a reference to necrotizing arteritis. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 2:17-20, 1960.
99. Tafuri WL, Brener Z. Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na tripanosomíase cruzi experimental na fase aguda. *O Hospital (Rio de Janeiro)*, 69:371-383, 1966a.
  100. Tafuri WL, Brener Z. Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na fase crônica da tripanosomíase cruzi experimental. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 8:177-183, 1966b.
  101. Tafuri WL, Brener Z. Lesões do plexo de Meissner e de Auerbach do intestino do camundongo albino na fase crônica da tripanosomíase cruzi experimental. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 9:149-154, 1967.
  102. Tafuri WL, Raso P. Lesões do sistema nervoso autônomo do camundongo albino na tripanosomíase cruzi. *O Hospital (Rio de Janeiro)*, 62:1324-1342, 1962.
  103. Tafuri WL. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 19:405-417, 1970.
  104. Tafuri WL. Light and electron microscope studies of the autonomic nervous system in experimental and human American Trypanosomiasis. *Virchows Arch Abt A Pathol Anat*, 354:136-149, 1971.
  105. Van Voorhis WC, Schlekewy L, Trong H. Molecular mimicry by *Trypanosoma cruzi*: the F - 160 epitope that mimics mammalian nerve can be mapped to a 12-amino acid peptide. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88:5593-5597, 1991.
  106. Ribeiro dos Santos R, Hudson L. *Trypanosoma cruzi*: binding of parasite antigen to mammalian cells. *Parasite Immunol*, 20:1-10, 1998.
  107. Sadigursky M, von Kreuter BF, Pei-Ying Ling BS, Santos Buch CA. Association of elevated anti-sarcolema, anti-idiotypic antibody levels with the clinical and pathological expression of chronic Chagas' myocarditis. *Circulation*, 80:1267-1276, 1990.
  108. Vago AR, Macedo AM, Adad SJ, D'Avila Reis, D, Corrêa-Oliveira R. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. *Lancet*, 348:891-892, 1996.
  109. Miles MA, Cedillos RA, Pova MM, Souza AA, Prata A, Macedo V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease. *Lancet*, i:1338-1340, 1981.
  110. Andrade SG, Magalhães JB. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. *Rev Soc Bras Med Trop*, 30:27-35, 1997.
  111. Lauria-Pires L, Bogliolo AR, Teixeira ARL. Diversity of *Trypanosoma cruzi* stocks and clones derived from Chagas' disease patients II — Isoenzyme and RFLP characterizations. *Exper Parasitol*, 82:182-190, 1996b.
  112. Souza MM, Andrade SG, Barbosa Jr AA, Santos RTM, Alves VAF, Andrade ZA. *Trypanosoma cruzi* strains and autonomic nervous system pathology in experimental Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 91:217-224, 1996.
  113. Torres CM. Estudo do miocárdio na moléstia de Chagas (forma aguda). *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 9:114-139, 1917.
  114. Taquini AC. Electrograma na enfermidade de Chagas experimental. *Rev Arq Cardiol*, 8:115-121, 1942.
  115. Pizzi TP. Sobre el problema de las formas delgadas del *Trypanosoma cruzi* (comunicacion preliminar). *Bol Inform Parasitol Chileno*, 8:26-30, 1953.
  116. Magalhães BF, Freire AS. O eletrocardiograma na doença de Chagas experimental. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 42:243-261, 1945.
  117. Badinez OS. Contribución a la anatomia patologica de la enfermidade de Chagas experimental. *Biológica*, 3:3-52, 1945.
  118. Pellegrino J. O eletrocardiograma na fase crônica da doença de Chagas experimental no cão. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 44:615-647, 1946.
  119. Laranja FS, Pellegrino J, Dias E. Experimental Chagas' disease. *Am Heart J*, 4:646, 1949.
  120. Pifano FC, Anselmi A, Aleman C, Suarez JA, Vasquez AD. Miocardiopatia chagásica experimental. Valoración del método de investigación experimental para el estudio de las propiedades fundamentales de corazón de perro con infección chagásica aguda y crônica. *Arq Venezol Med Trop Parasitol Med*, 4:37-62, 1962.
  121. Pifano FC, Anselmi A, Dominguez CA, Romero MJ. La electrofisiología del corazón chagásico en condiciones experimentales y su correlación con la miocardiopatia del hombre. *Rev Venezol San Assit Social*, 31:91-102, 1966.
  122. Anselmi A, Pifano FC, Suarez JA, Domingues A, Vasquez AD, Anselmi G. Experimental *Schizotrypanum cruzi* myocarditis. *Am Heart J*, 70:638-656, 1965.
  123. Anselmi A, Pifano F, Suarez JA, Guerdil O. Myocardiopathy in Chagas' disease. I — Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas' myocarditis. *Am Heart J*, 72:469-481, 1966.
  124. Anselmi A, Guerdil O, Suarez JA, Anselmi G. Disturbances in the AV conduction system in Chagas' myocarditis in the dog. *Circ Res*, 20:56-64, 1967.
  125. Anselmi A, Moleiro F, Suarez R, Suarez JA, Ruesta V. Ventricular aneurysms in acute experimental Chagas' myocardiopathy. *Chest*, 59:654-658, 1971.
  126. Kramer Jr AW. Experimental Chagas' disease in purebred beagle dog acutely infected with *Trypanosoma cruzi* (B strain). *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 14:291-300, 1972.
  127. Andrade ZA. Patologia do sistema excito-condutor do coração na miocardiopatia chagásica. *Rev Patol Trop*, 3:367-428, 1974b.
  128. Andrade ZA, Andrade SG. A patologia da doença de Chagas experimental no cão. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 75:77-95, 1980.
  129. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Lima JAC. Doença de Chagas experimental no cão. Relação morfológica e eletrocardiográfica na fase aguda da infecção. *Arq Bras Cardiol*, 35:485-490, 1980.
  130. Andrade ZA. The canine model of Chagas' disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 79(supl):77-83, 1984.
  131. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M. Damage and healing in the conduction tissue of the heart (An experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*). *J Pathol*, 143:93-101, 1984.
  132. Pickett P, Sommer JR. Thirty-five mm film as mounting base and plastic spray as cover glass for histologic sections. *Arch Pathol*, 69:239-247, 1960.
  133. Lana M, Chiari E, Tafuri WL. Experimental Chagas' disease in dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87:59-71, 1992.
  134. Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans UJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *Am J Pathol*, 144:1403-1411, 1994.
  135. Andrade SG, Andrade ZA, Sadigursky M. Combined treatment with a nitrofuranic and a corticoid in experimental Chagas' disease. *Am J Trop Med Hyg*, 29:766-773, 1980.
  136. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Maguire JH. Experimental Chagas' disease in dogs: A pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Arch Pathol Lab Med*, 105:450-464, 1981.
  137. Scalabrini A, Cardoso A, Andrade SG, Andrade ZA. Correlação clínico-patológica na forma indeterminada da doença de Chagas experimental do cão. *Arq Bras Cardiol*, 67:385-388, 1996.
  138. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M, Wenthold JR, Hilbert SL, Ferrans VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *Am J Trop Med Hyg*, 57:328-336, 1997.
  139. Andrade ZA, Andrade SG, Sadigursky M. Enhancement of chronic *T. cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of Cyclophosphamide. *Am J Pathol*, 127:467-473, 1987.
  140. Laranja FS, Andrade ZA. Forma crônica cardíaca da doença de Chagas no cão. *Arq Bras Cardiol*, 35:377-380, 1980.
  141. Andrade ZA, Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ. Mechanisms of myocardial damage in acute experimental *T. cruzi* infection of dogs. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87(supl II):98, 1992.

142. Zhang J, Andrade ZA, Andrade SG, Takeda K, Sadigursky M, Ferrans VJ. Apoptosis in a canine model of acute chagasic myocarditis. *J Mol Cell Cardiol*, 31:581-596, 1999.
143. Lopes MF, da Veiga VF, Santos AR, Fonseca ME, dos Reis GA. Activation-induced CE4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *J Immunol*, 154:744-752, 1995.
144. Andrade SG, Correa R, Sadigursky M, Ferrans VJ. Dendritic cells (DC) of the heart in dogs chronically infected with *Trypanosoma cruzi* and treated with low doses of cyclophosphamide. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87 (supl II):156, 1992.
145. Andrade SG, Pimentel AR, Andrade ZA. Interstitial dendritic cells of the heart: specific *Trypanosoma cruzi* antigens presentation and myocarditis. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 93(supl II):258, 1998.
146. Brand T, Tobie EJ, Kissling RE. Observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. *J Infect Dis*, 85:5-16, 1949.
147. Vichi FL. Avaliação quantitativa do parasitismo do coração, vasos da base e coronária do rato na fase aguda da moléstia de Chagas. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 6:292-296, 1964.
148. Scorza C, Scorza JV. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninth day after inoculation. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 14:171-177, 1972.
149. Postan M, McDaniel JP, Dvorak JA. Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. *Trans Roy Soc Trop Med Hyg*, 81:415-419, 1987.
150. Chapadeiro E, Beraldo PSS, Jesus PC, Oliveira Jr WP, Junqueira Jr LF. Lesões cardíacas em ratos Wistar inoculados com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, 21:95-103, 1988.
151. Revelli SS, Amerio N, Moreno HS, Valenti JL, Balbarrey H, Morini JC. Enfermedad de Chagas cronica en la rata. Características serológicas, electrocardiograficas e histopatológicas. *Medicina (Buenos Aires)*, 40 (supl I):69-76, 1980.
152. Revelli SS, Davila H, Ferro ME, Romero-Piffiguer M, Musso O, Valenti J, Bernabo J, Falcoff E, Wietzerbin J, Botasso O. Acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infection in the rat. Response to splenic treatment with recombinant interferon-gamma. *Microbiol Immunol*, 39:275-281, 1995.
153. Sato MN, Yamashiro-Kanashiro EH, Tanji MM, Kaneno R, Higushi ML, Duarte AJ. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in rats. *Infect Immun*, 60:1024-1030, 1992.
154. Botasso AO, Reelli SS, Davila H, Valenti JL, Musso OC, Ferro ME, Romero-Piffiguer M, Morini JC. Enhanced myocardial lesions in chronically *Trypanosoma cruzi* infected rats subjected to adult thymectomy. *Immunol Letter*, 37:175-180, 1993.
155. Alcântara FG, Oliveira JAM. Estudo quantitativo dos neurônios do plexo de Auerbach e a sua distribuição no tubo digestivo do rato Wistar. *Rev Bras Med*, 21:369-371, 1964.
156. Alcântara FG, Costa RB, Oliveira JAM. Desnervação dos plexos intramurais do trato digestivo em *Rattus norvegicus* albinus chagásicos crônicos. *Rev Bras Med*, 21:560-562, 1964.
157. Machado CRS, Ribeiro ALP. Experimental American trypanosomiasis in rats: sympathetic denervation, parasitism and inflammatory process. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 84:549-556, 1989.
158. Junqueira Jr LF, Beraldo PS, Chapadeiro E, Jesus PC. Cardiac autonomic dysfunction and neuroganglionitis in a rat model of chronic Chagas' disease. *Cardiovasc Res*, 26:324-329, 1992.
159. Chapadeiro E, Florêncio RFC, Afonso PC, Beraldo PSS, Jesus PC, Junqueira Jr LF. Neuronal counting and parasympathetic dysfunction in the hearts of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 33:337-341, 1991.
160. Chapadeiro E, Beraldo PSS, Jesus PC, Fernandes PD, Junqueira Jr LF. Estudo dos neurônios do plexo cardíaco na infecção aguda pelo *Trypanosoma cruzi* em ratos albinos. *Rev Soc Bras Med Trop*, 27:79-81, 1994.
161. Agosin M, Badinez O. Algunas características de la infección experimental en conejos. *Bol Inf Parasitol Chilenas*, 4:6-7, 1948.
162. Teixeira ARL, 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*, 80:163-180, 1975.
163. Teixeira ARL, Figueiredo F, Rezende Filho J, Macedo V. Chagas' disease: a clinical, parasitological, immunological and pathological study in rabbits. *Am J Trop Med Hyg*, 32:258-272, 1983.
164. Teixeira ARL, Santos-Buch CA. The immunology of experimental Chagas' disease. II — Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigen. *Immunology*, 28:401-410, 1975.
165. Ramirez LE, Brener Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas' disease. I — Parasitological studies. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 82:531-536, 1987.
166. Dorland JD. Infection in monkeys with strains of *Trypanosoma cruzi* isolated in the United States. *US Publ Hlth Rep*, 58:1006-1010, 1943.
167. Marsden PD, Voller A, Seah SKK, Hawkey C, Green D. Behaviour of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* in rhesus monkeys. *Rev Soc Bras Med Trop*, 4:177-182, 1970.
168. Bolomo N, Milei J, Cossio PM, Segura E. Experimental Chagas' disease in a South American primate (*Cebus* sp.) *Medicina*, 40:667-672, 1980.
169. Falasca CA, Gili M, Grana D, Gomez E, Zoppi J, Mareso E. Chronic myocardial damage in experimental *T. cruzi* infection of a new world primate *Cebus* sp. Monkey. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 32:151-161, 1990.
170. Falasca CA, Grana DR, Mareso EA, Gomez E, Gili MM. Electrocardiographic changes in chronic *Trypanosoma cruzi* infected *Cebus apella* monkeys. *Arq Bras Cardiol*, 56:287-293, 1991.
171. Lopes ER, Tafuri WL, Chapadeiro D. Estudo morfológico e quantitativo dos núcleos dorsal do vago e hipoglosso em chagásicos crônicos, com e sem megaesôfago. *Rev Inst Med Trop São Paulo*, 11:123-129, 1969.
172. Franco MF. Cardite experimental do cobaio pela cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Correlação entre a histopatologia e a presença de antígenos parasitários identificados por imunofluorescência indireta. Tese. Botucatu: S.Paulo, 1972.
173. Falângola MF. Envolvimento do sistema nervoso central na doença de Chagas experimental. (Estudo imuno-histopatológico comparativo da infecção aguda por diferentes cepas em diferentes espécies animais.) *Dissertação de Mestrado*. Salvador: Faculdade de Medicina — UFBA, 1990.
174. Mello DA. *Calomys callosus* Renger, 1930 (*Rodentia cricetidae*): sua caracterização, distribuição, biologia, criação e manejo de uma cepa em laboratório. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 76:611-669, 1984.
175. Borges MM, Andrade SG, Pilatti CG, Prado Jr JC, Kloetzel JK. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi* *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 87:493-502, 1992.
176. Andrade SG, Kloetzel JK, Borges MM, Ferrans VJ. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimental infected with *Trypanosoma cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 89:379-393, 1994.
177. Borges MM, Vasao R, Andrade SG, Pereira CA, Kloetzel JK. Interferon-gamma levels during the course of *Trypanosoma cruzi* infection of *Calomys callosus* (*Rodentia*) cricetidae and Swiss mice. *Parasitol Res*, 81:498-504, 1995.

## *Lista de Autores*

### **ACHILÉA LISBOA BITTENCOURT**

Professora de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

### **ADEMIR ROCHA**

Professor Titular, Faculdade de Medicina de Uberlândia, Uberlândia, MG.

### **ALEJANDRO O. LUQUETTI**

Professor Adjunto, Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

### **ÁLVARO VALENTIM LIMA SARABANDA**

Médico da Seção de Cardiologia, Hospital das Clínicas, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

### **ANIS RASSI**

Professor Emérito, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

### **ANIS RASSI JUNIOR**

Professor, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

### **ANTONIO CARLOS SILVEIRA**

Coordenador de Controle de Doenças Transmitidas por Vetores, Fundação Nacional de Saúde, Ministério da Saúde, Brasília, DF.

### **ANTONIO LUIZ PINHO RIBEIRO**

Professor Adjunto, Departamento de Clínica Médica da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

### **CLAUDIA IDA BRODSKYN**

Professora Adjunta, Instituto de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

### **EDÉCIO CUNHA-NETO**

Pesquisador, Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração, USP, São Paulo, SP.

### **EDIMAR A. BOCCHI**

Professor Livre-Docente, Laboratório de Imunologia, Instituto do Coração, USP, São Paulo, SP.

### **EDISON REIS LOPES**

Professor Titular, Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro, Uberaba, MG.

### **ELOI S. GARCIA**

Pesquisador Titular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ.

### **GABRIEL A. SCHMUÑIS**

Oficina Sanitária Panamericana, Organização Mundial de Saúde, Washington, DC – USA.

### **GEORGE A. DOS REIS**

Professor Titular, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

### **GUSTAVO GABRIEL RASSI**

Chefe do Setor de Imunologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

### **HÉLIO MOREIRA**

Professor Titular, Departamento de Cirurgia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

### **ITALO A. SHERLOCK**

Pesquisador Titular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), Salvador, BA.

### **J. ROMEU CANÇADO**

Professor Emérito, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

### **JOÃO CARLOS PINTO DIAS**

Professor Titular, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

### **JOFFRE MARCONDES DE REZENDE**

Professor Emérito, Universidade Federal de Goiás, Goiânia, GO.

### **JORGE KALIL**

Professor Titular, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, São Paulo, SP.

### **JOSÉ ANTONIO MARIN-NETO**

Professor Titular, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

### **JOSÉ FRANCO DA SILVEIRA**

Professor Titular, Escola Paulista de Medicina, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, SP.

### **MANOEL BARRAL-NETTO**

Pesquisador Titular, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (FIOCRUZ), Salvador, BA.

**MANOEL OTÁVIO DA COSTA ROCHA**

Professor Adjunto, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG.

**MARCELA F. LOPES**

Professora Adjunta, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

**MARCELO SIMÃO FERREIRA**

Professor Titular, Faculdade de Medicina de Uberlândia, Uberlândia, MG.

**MARCUS VINICIUS SIMÕES**

Professor Assistente, Departamento de Clínica Médica, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, USP, Ribeirão Preto, SP.

**PATRICIA DE AZAMBUJA**

Pesquisadora Titular, Departamento de Bioquímica e Biologia Molecular, Instituto Oswaldo Cruz (FIOCRUZ), Rio de Janeiro, RJ.

**SÉRGIO DE ANDRADE NISHIOKA**

Professor Assistente, Faculdade de Medicina de Uberlândia, Uberlândia, MG.

**SONIA G. ANDRADE**

Professora Adjunta, Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.

**WANDERLEY DE SOUZA**

Professor Titular, Centro de Ciências da Saúde, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, RJ.

**ZIGMAN BRENER**

Pesquisador Titular, Centro de Pesquisas René Rachou (FIOCRUZ), Belo Horizonte, MG.

**ZILTON A. ANDRADE**

Professor Emérito, Universidade Federal da Bahia, Salvador, BA.