



UFBA

UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ESTUDO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA NA  
INFECÇÃO MURINA EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma  
Cruzi*: EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA EM BAIXAS DOSES  
NA EXACERBAÇÃO DAS LESÕES**

TORRICELI SOUZA THÉ

Salvador - Bahia - Brasil  
2006



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
CENTRO DE PESQUISAS GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**ESTUDO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA NA  
INFECÇÃO MURINA EXPERIMENTAL *PELO Trypanosoma  
cruzi*: EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA EM BAIXAS DOSES  
NA EXACERBAÇÃO DAS LESOES**

**TORRICELI SOUZA THÉ**

**Orientador(es): Dr. SONIA GUMES ANDRADE**

Dissertação Apresentada para  
Obtenção do Grau de Mestre em  
Patologia (Área de Concentração:  
Patologia Experimental)

**Salvador - Bahia - Brasil**

**2006**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

Thé, Torriceli Souza

T374e Estudo da hipersensibilidade tardia na infecção murina experimental pelo  
*Trypanosoma cruzi*: efeito da ciclofosfamida em baixas doses na exacerbação das  
lesões [manuscrito] / Torriceli Souza Thé. - 2006.

120 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo  
Cruz. Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.

Orientador: Prof. Dra. Sonia Gumes Andrade, Laboratório de Chagas Experimental,  
Autoimunidade e Imunologia Celular

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Doença de Chagas. 3. Patologia 4. Imunologia.  
I.Título.

CDU 593.161:616.937

P.12  
V.1N/233  
201507

12/11

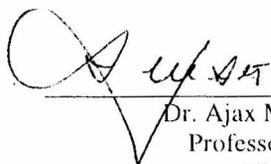
2015/11/17  
T374e

ESTUDO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO  
EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*: EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA EM BAIXAS DOSES  
NA EXACERBAÇÃO DAS LESÕES

**TORRICELI SOUZA THÉ**

FOLHA DE APROVAÇÃO

COMISSÃO EXAMINADORA



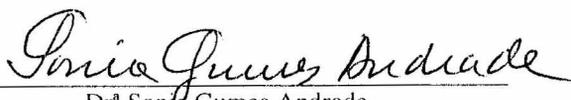
---

Dr. Ajax Mercês Atta  
Professor Titular  
UFBA



---

Dr. Eduardo Antônio G. Ramos  
Pesquisador Titular  
CPqGM - FIOCRUZ



---

Dr.ª Sonia Gumes Andrade  
Pesquisadora Titular  
CPqGM - FIOCRUZ

## ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1 O GENERO TRYPANOSOMA.....	1
1.2 ASPECTOS BÁSICOS DA BIOLOGIA DO TRYPANOSOMA CRUZI.....	2
1.3 O VETOR DA DOENÇA DE CHAGAS .....	4
1.4 A DOENÇA DE CHAGAS .....	4
1.4.1 A FASE AGUDA.....	6
1.4.2 A FASE CRONICA.....	8
1.4.2.1 A FORMA INDETERMINADA.....	9
1.5 A TRANSIÇÃO DA FORMA CRONICA INDETERMINADA PARA A FORMA CRONICA CARDIACA.....	10
1.6 PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS.....	11
1.6.1 AUTO-IMUNIDADE NA DOENÇA DE CHAGAS.....	12
1.6.2 HIPERSENSIBILIDADE TARDIA.....	14
1.6.3 CÉLULAS DENDRITICAS E APRESENTAÇÃO ANTIGENICA: ANTIGENOS DE TRYPANOSOMA CRUZI E HIPERSENSIBILIDADE TARDIA..	15
1.7 AÇÃO DA CICLOFOSFAMIDA NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA NA DOENÇA DE CHAGAS.....	18
2. JUSTIFICATIVA E RELEVANCIA.....	22
3. HIPÓTESE .....	23
4. OBJETIVOS.....	24
4.1 OBJETIVO GERAL.....	24
4.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	24
5. MATERIAL E METODOS .....	26

5.1 ANIMAIS EXPERIMENTAIS E INÓCULO .....	26
5.2 ACOMPANHAMENTO .....	27
5.2.1 PARASITEMIA.....	27
5.2.2 MORTALIDADE.....	27
5.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS.....	27
5.4 TRATAMENTO COM CICLOFOSFAMIDA .....	28
5.4.1 DOSE.....	28
5.5 TESTE CUTÂNEO.....	29
5.6 PREPARO DO ANTÍGENO.....	29
5.6.1 DOSAGEM PROTEICA DO CONTEUDO ANTIGENICO OBTIDO.....	30
5.7 INJECAO INTRADERMICA NO COXIM DA PATA TRAZEIRA DIREITA.....	30
5.8 MEDIÇÃO DA ESPESSURA DA PATA.....	30
5.9 EUTANÁSIA DOS ANIMAIS.....	31
5.10 ESTUDO HISTOPATOLOGICO.....	31
5.11 COLETA DE MATERIAL PARA HISTOPATOLOGIA DO TESTE CUTÂNEO.....	32
5.12 IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	32
5.12.1 IMUNOMARCAÇÃO COM – ANTI-CD4, CD8, ANTI-CD25 EM TECIDOS CRIOPRESERVADOS.....	33
5.12.2 IMUNOMARCAÇÃO COM ANTICORPOS ANTI- <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> EM TECIDOS FIXADOS EM FORMOL .....	34
5.13 TESTE SOROLÓGICO DE IMUNOFLUORESCENCIA INDIRETA .....	34
5.14 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS TECIDOS COLETADOS.....	35

5.14.1	DESCRIÇÃO DAS LESOES.....	35
5.14.2	ANÁLISE QUANTITATIVA.....	35
5.14.2.1	MORFOMETRIA.....	35
5.15	RELAÇÃO DO PESO DO BAÇO DIVIDIDO PELO PESO CORPORAL .....	36
5.16	TESTE ESTATÍSTICO UTILIZADO.....	36
5.17	LEUCOGRAMA.....	36
6.	RESULTADOS.....	38
6.1	PARASITEMIAS.....	38
6.2	MORTALIDADE.....	38
6.3	TESTE SOROLÓGICO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.....	39
6.4	AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA PELA ESPESSURA DA PATA.....	40
6.5	ESTUDO HISTOSTOPATOLOGICO DO TESTE CUTÂNEO (COM ANTÍGENO PARASITÁRIO) EM CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFECTADOS PELO <i>T. CRUZI</i> : CONTROLES E TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA EM BAIXAS DOSES .....	41
6.6	HISTOPATOLOGIA DO TECIDO CARDÍACO.....	42
6.7	MORFOMETRIA DO TECIDO CARDÍACO.....	44
6.8	HISTOPATOLOGIA E MORFOMETRIA DO TECIDO MUSCULAR.....	45
6.9	RELAÇÃO PESO DO BAÇO X PESO CORPORAL.....	45
6.10	IMUNOHISTOQUÍMICA - CD25, CD 4, CD8 ANTI- <i>T. CRUZI</i> .....	46
6.10.1	Densidade de células T CD25 no baço (marcador de ativação inicial ou recente).....	46
6.10.2	Densidade de células T CD4 e CD8 no miocárdio.....	47

6.10.3 Imunomarcacão com anticorpo policlonal anti- <i>T. cruzi</i> .....	47
6.11 – LEUCOGRAMA.....	47
7. DISCUSSÃO.....	49
8. CONCLUSÕES.....	56
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58
FIGURAS E TABELAS	

## RESUMO

### ESTUDO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL PELO *Trypanosoma cruzi*: EFEITO DA CICLOFOSFAMIDA EM BAIXAS DOSES NA EXACERBAÇÃO DAS LESÕES. TORRICELI S. THÉ

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, determina no homem e em outros vertebrados uma infecção aguda que cursa com miocardite, evoluindo para o óbito em baixa percentagem de casos ou para uma fase crônica. Nesta, o indivíduo pode permanecer em uma forma assintomática, sem alterações eletrocardiográficas e ou radiológicas do coração ou do trato digestivo a qual representa a forma indeterminada da doença. As lesões cardíacas nestes casos são representadas por focos isolados de infiltração por células inflamatórias e são auto-limitadas. Alguns podem evoluir para uma forma crônica cardíaca progressiva, com ou sem envolvimento do tubo digestivo. Os fatores responsáveis pela transição de uma forma indeterminada para uma forma cardíaca da doença, ainda não estão bem esclarecidos. Células regulatórias, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>, podem participar na modulação do sistema imune do hospedeiro, impedindo a progressão do processo inflamatório, por um mecanismo de supressão da hipersensibilidade tardia. Estudos em cães na forma indeterminada demonstraram que o uso de ciclofosfamida em baixas doses interfere na rede supressora imunológica, causando exacerbação das lesões cardíacas. Com o objetivo de estudar o mecanismo envolvido na transição entre a forma indeterminada e a forma crônica cardíaca e o papel da ciclofosfamida na modulação da resposta imunológica, dois grupos de camundongos BALB/C foram infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e acompanhados até a fase crônica (180 dias). Um grupo foi submetido ao tratamento com ciclofosfamida na dose 20mg/kg, ministrado em 3 doses semanais/mês. Um grupo de animais infectados não tratados foi deixado como controle. Todos foram submetidos ao teste cutâneo, pela injeção intradérmica na pata, de antígeno de *T. cruzi* (3mg/mL). Para estudo evolutivo da hipersensibilidade tardia (24h, 48h, e 72h). Foi feita a medida das patas que receberam antígeno e as que receberam solução salina como controle, comparando os grupos tratados aos não tratados. Coração e músculo esquelético foram submetidos a estudo histopatológico. Também foi feito estudo imunohistoquímico, objetivando caracterizar as populações de células CD4<sup>+</sup>, CD8<sup>+</sup>, do infiltrado inflamatório e CD25<sup>+</sup> do baço. Nos animais tratados com ciclofosfamida em baixas doses as lesões de miocárdio foram intensificadas, com presença no miocárdio de lesões focais necróticas inflamatórias, as quais eram raras ou ausentes, no grupo somente infectado. A reação da pata destes animais também mostrou maior intensidade na resposta ao teste cutâneo com antígeno parasitário, evidenciada pela medida da espessura da pata e pela análise histopatológica com lesões intradérmicas focais, infiltrativas, perivasculares e intersticiais. A imunomarcagem das subpopulações de células analisadas mostrou o predomínio de linfócitos T CD8 tanto no grupo tratado como no grupo somente infectado. Foi visto que o tratamento com ciclofosfamida em baixas doses aumentou significativamente a quantidade de células T CD8 positivas no coração dos animais. Em relação às células T CD4 não houve aumento significativo destas nos animais submetidos ao tratamento. A imunomarcagem das células T regulatórias (Treg) no baço mostrou um aumento significativo no número de células em ativação inicial, que expressam marcadores de superfície CD25 as quais também estão envolvidas na regulação do sistema imune do hospedeiro. Conclui-se com este trabalho que a ciclofosfamida em baixas doses interfere na rede supressora imunológica favorecendo o aumento das lesões inflamatórias e também aumento de reações de hipersensibilidade tardia e que isto se correlacionou com modificações em subpopulações celulares importantes na patogenia de lesões na fase crônica da doença de Chagas. **PALAVRAS CHAVE** : *Trypanosoma cruzi*, Doença de Chagas, Forma indeterminada, Ciclofosfamida

## ABSTRACT

### INVESTIGATION ON THE DELAYED TYPE HYPERSENSITIVITY IN THE CHRONIC PHASE OF EXPERIMENTAL INFECTION WITH *Trypanosoma cruzi* :INFLUENCE OF THE TREATMENT WITH CYCLOPHOSPHAMIDE IN LOW DOSES ON THE INTENSIFICATION OF LESIONS. **TORRICELI S. THÉ**

*Trypanosoma cruzi*, the ethiological agent of Chagas disease, produces in men and other vertebrates, an acute infection with myocarditis that progress to death in a low percentage of cases or to a chronic form. In the chronic phase, the patient may stay in an asymptomatic or indeterminate form without electrocardiographic alterations or radiological anomalies of the heart or the digestive tract. Cardiac lesions in these cases are represented by isolated auto-limited inflammatory foci. Some cases could pass to a chronic progressive myocarditis, with or without involvement of the digestive tract. The factors that determine the transition from the indeterminate to the cardiac form of Chagas disease, are not yet well known. Regulatory T cells CD4+CD25+, are supposed to participate in the host immune system modulation, and to impede the evolution of the inflammatory process, through the suppression of delayed type hypersensitivity (DTH). Investigations developed in dogs in the indeterminate form of the disease have demonstrated that treatment with cyclophosphamide in low doses interferes with the immunological network and determines the intensification of cardiac lesions. With the objective of to investigate the mechanisms involved in the transition from the indeterminate to the chronic cardiac form and the influence of cyclophosphamide in the modulation of this response, two groups of BALB/C mice has been infected with the Colombian strain of *T. cruzi* and followed until the chronic phase (180 days). One group was treated with cyclophosphamide in the dosis of 20mg/kg of body weight, three doses/week during one month. One group of chronically infected mice, not treated, stayed as controls. The mice of both groups were submitted to the skin-test, by intradermal injection in the hind-foot, of *T. cruzi* antigen (3mg/mL). For the evolutive study of DTH (with 24, 48 and 72 hours), the measurement of the hind foot injected with the antigen and the control injected with saline solution, was done in both groups. Sections of the heart and skeletal muscles, were submitted to histopathological study. Immunohistochemical identification of the inflammatory cells populations, CD4+, CD8+ in the heart and CD25+ in the spleen was performed. Results have demonstrated the intensification of myocardial lesions in mice treated with cyclophosphamide in low doses, with the presence of necrotic-inflammatory lesions of the myocardium that were rare or absent in the untreated group. Also the response of the skin test was more intense in this group, detected by measurement of the lesion and by the presence of intradermic focal and diffuse inflammatory or peri-vascular infiltrations. Immunostaining of inflammatory cells showed the predominance of TCD8+ lymphocytes in both groups. The number of CD8+ cells increased significantly in mice treated with cyclophosphamide, but no increasing was observed for the TCD4+ lymphocytes. Immunostaining of T regulatory cells in the spleen have shown a significant increasing in the number of cells with initial activation, expressing surface markers CD25 also involved in the immune system regulation. In conclusion, cyclophosphamide in low doses interferes in the suppressor immunological network, determine the increasing of inflammatory lesions and the intensification of DTH. These findings correlate with modifications of cells populations involved in the pathogenesis of the lesions in the chronic phase of Chagas disease. **KEY WORDS:** *Trypanosoma cruzi*, Chagas disease, Indetermined form, Cyclophosphamide.

# INTRODUÇÃO

## 1.1 O gênero *Trypanosoma*

Os protozoários flagelados do gênero *Trypanosoma* possuem um comportamento biológico complexo. Este gênero compreende organismos capazes de parasitar todas as classes e muitas ordens de hospedeiros vertebrados atuais (STEVENS *et al.* 1999). São também encontrados organismos invertebrados fazendo parte de seu ciclo biológico, do filo Arthropoda das ordens Hemiptera e Diptera, com espécies pertencentes às famílias Reduviidae e Glossinidae, vetores importantes na transmissão de doenças conhecidas como a doença do sono na África, e doença de Chagas nas Américas.

Os tripanosomas envolvidos na etiologia de doenças humanas são bastante diferentes. O *T. brucei*, que está relacionado com a doença do sono é transmitido via saliva do inseto díptero do gênero *Glossina*, enquanto que o *T. cruzi*, responsável pela doença de Chagas é transmitido pelas fezes de triatomíneo contaminadas com as formas infectantes. Tais diferenças nas vias de infecção, permitiu separar estas duas espécies em seções denominadas salivaria e estercoraria, respectivamente (HOARE, 1972).

Estudos filogenéticos baseados em análises de subunidades ribossomais (HAAG *et al.*, 1998) determinaram a divisão do gênero *Trypanosoma*, com suas 47 espécies, em pelo menos três diferentes clados. Dois deles possuem espécies que parasitam o homem e o terceiro é restrito a um ambiente aquático. O clado *T. cruzi*, engloba os parasitos do Subgênero *Schizotrypanum* mais *T. rangeli* e outras

espécies. O clado *T. brucei*, compreende todos os tripanosomas da seção salivaria (HOARE, 1972).

Baseando-se em dados paleobiogeográficos (STEVENS *et al*, 1999, BRIONES *et al*, 1999) e nas taxas de mudanças evolutivas nos genes do RNA ribossomal, acredita-se que a divergência dos clados *T. brucei* e *T. cruzi* se deu por volta de 100 até 150 milhões de anos atrás (STEVENS *et al*, 1999, HAAG *et al*, 1998), no Cretáceo médio, na era mesozóica.

Apesar da antiga historia evolutiva do gênero *Trypanosoma*, o contato destes organismos com os primeiros hominídeos não se deu antes da evolução destes últimos, num período ocorrido por volta de 5 a 15 milhões de anos atrás, sendo que o gênero *Homo* a cerca de 3 milhões de anos e a espécie *Homo sapiens* não menos do que 300 mil anos atrás na África (JOHANSON & TAIEB, 1976). No continente americano este contato se deu mais tardiamente no momento em que ocorreu a migração humana. Este período data de cerca de 30 a 40 mil anos atrás. Porém, as primeiras culturas nômades estabelecidos datam de cerca de 3 mil anos, quando então estes podem ter sido infectados ao invadir o habitat já estabelecido dos outros hospedeiros de *T. cruzi* e *T. brucei* (ROTHHAMMER *et al*. 1985), então, fazendo parte do ciclo do parasito.

## **1.2 Aspectos básicos da Biologia do *Trypanosoma cruzi***

O protozoário hemoflagelado *T. cruzi*, possui um ciclo biológico do tipo heteroxeno, que se passa no hospedeiro invertebrado (vetor) e outro no vertebrado. O ciclo no vertebrado ocorre em uma variedade de animais

pertencentes à classe Mamalia. Como exemplo podemos citar marsupiais, roedores, primatas, neste último caso inclui-se o homem.

O ciclo biológico do parasito tem uma fase no vetor, que se infecta quando exerce o repasto sangüíneo num reservatório natural ou até mesmo num indivíduo infectado. Após este momento o parasito sofre algumas modificações estruturais na luz do tubo digestivo do inseto. Em seguida o parasito segue seu ciclo passando pelo estômago e alcançando o intestino, local onde ele se transforma em epimastigotas. Neste local existe multiplicação intensa do parasito por fissão binária longitudinal. Alguns epimastigotas alcançam a região posterior do intestino e neste local eles sofrem uma metamorfose e passam a adquirir a forma infectante denominada tripomastigota metacíclica.

Ao exercer novamente o repasto sanguíneo o barbeiro pode infectar o hospedeiro vertebrado através de formas metacíclicas do *T. cruzi* presentes nas fezes. Estas podem penetrar pela pele do indivíduo através de soluções de continuidade deixadas no local da picada ou até mesmo por micro abrasões causadas pelo ato de coçar, resultante do incômodo provocado pela introdução da probóscida do inseto na pele.

Após este período os parasitos podem então completar o ciclo biológico indo para as células do corpo humano, particularmente do sistema mononuclear fagocitário e musculares esqueléticas e cardíacas. No interior destas células o parasito se multiplica intensamente por sucessivas divisões binárias até causar o rompimento da célula hospedeira. Em seguida, os parasitos podem atingir a circulação sanguínea novamente ou invadir novas células do tecido onde se encontra.

### 1.3 O vetor da doença de Chagas

O inseto vetor do *Trypanosoma cruzi*, também já foi relatado, antes das descrições de Carlos Chagas, séculos antes do descobrimento científico. Charles Darwin, um naturalista que contribuiu de maneira imensurável para o estudo e entendimento da origem e evolução das espécies, descreveu no seu diário de viagens do dia 26 de março de 1835, a existência de insetos perturbadores do sono noturno. Pelas características descritas por ele, hoje se sabe que estes insetos eram os barbeiros.

Hoje sabemos que os insetos responsáveis pela transmissão do parasito para os hospedeiros vertebrados pertencem a ordem Hemiptera, família Reduviidae, da sub-família Triatominae. Os principais gêneros envolvidos na transmissão são: *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*. Estes insetos são hematófagos e quando estão exercendo o repasto sanguíneo no hospedeiro vertebrado, excretam suas fezes contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas, que por sua vez podem penetrar por micro-abrasões ou por soluções de continuidade deixadas na pele do hospedeiro.

### 1.4 A Doença de Chagas

Como assinalado anteriormente, muitos fatos mostraram a antiguidade do gênero *Trypanosoma* e, por sua vez, o próprio *Trypanosoma cruzi*. A doença de Chagas atinge a humanidade há muito tempo, bem antes de ter sido descrita em detalhe. Estudos recentes realizados em múmias exumadas da região norte do Chile,

pertencentes a um período de 2500 anos atrás, revelaram a presença de DNA do *Trypanosoma cruzi*, o que mostra que o mal de Chagas também foi, provavelmente, motivo de preocupação em civilizações que existiram em tempos passados (FERREIRA et al. 2000). Mesmo sem ter sido descrita em detalhe, esta infecção já era presente, pois, manifestações clínicas bem características desta já eram relatadas anteriormente em indivíduos doentes.

Foi somente em 1909 que o cientista brasileiro Carlos Chagas determinou em detalhes o agente etiológico, o vetor envolvido na transmissão, os sinais clínicos característicos da doença, o ciclo biológico e os reservatórios naturais que participam no processo. A doença apresenta uma fase aguda e uma fase crônica, a qual pode ser sintomática ou assintomática. Na fase aguda da infecção, os sintomas clínicos se apresentam com um espectro de manifestações que variam em frequência e intensidade, podendo mostrar sinais de porta de entrada, sinal de Romaña e chagoma de inoculação, ou até mesmo, alterações sistêmicas. Na fase crônica sintomática podem ocorrer manifestações cardíacas e/ou digestivas, de natureza progressiva.

A fase crônica assintomática é representada pela forma indeterminada onde os indivíduos infectados, com exames sorológicos positivos, não mostram sinais de doença, nem apresentam alterações eletrocardiográficas ou radiológicas do coração, esôfago e intestino. Porém, estudos têm demonstrado que estes indivíduos apresentam uma miocardite focal discreta e, principalmente, redução do número de neurônios nos plexos nervosos parassimpáticos do coração e do tubo digestivo (KOBBERLE, 1958, HIGUCHI, 1995, LOPES *et al*, 1975, LOPES *et al*, 1981). A maioria dos indivíduos permanece na fase indeterminada pelo resto de

suas vidas, entretanto cerca de 30% destes acabam por desenvolver uma fase crônica progressiva que evolui para uma cardiomiopatia crônica descompensada (DIAS & COURA, 1997).

#### **1.4.1 Fase aguda**

Nos humanos, esta fase ocorre nos primeiros meses de infecção e compreende alguns sintomas e sinais clínicos bem característicos (LARANJA, 1953). A infecção do indivíduo ocorre quando o inseto vetor excreta suas fezes contaminadas com formas tripomastigotas metacíclicas sobre a epiderme do indivíduo. Neste momento pode haver a contaminação, caso o parasito consiga penetrar no seu hospedeiro.

Ainda na fase aguda, como consequência da penetração do parasito, o indivíduo pode manifestar sinais característicos de porta de entrada, como o sinal de Romaña, que foi descrito pela primeira vez por ROMAÑA (1935) caracterizado pelo desenvolvimento de edema que acomete as duas pálpebras (bipalpebral) sendo visto na maioria das vezes em um dos lados da face (unilateral). Este tipo de lesão é acompanhada por congestão da conjuntiva ocular e infartamento dos linfonodos satélites. Após a descrição detalhada deste sinal, os casos agudos de doença de Chagas começaram a ser mais facilmente identificados. Outro sinal característico desta fase é o chagoma de inoculação, formando-se em disposição geralmente circular na pele, que se apresenta com eritema e, mostrando também, como no primeiro, infartamento dos linfonodos satélites (MAZZA & FREIRE, 1940).

É importante salientar que nem todos os indivíduos apresentam sinais de porta de entrada aparentes.

A fase aguda da doença de Chagas é na realidade uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*. Isso pode ser evidenciado pela presença de amastigotas em muitos tipos celulares situados nos diferentes tecidos como em macrófagos, em músculo liso, estriado esquelético, cardíaco, onde as lesões são mais comuns, e outros onde são mais raramente encontrados como ovário e testículo (LENZI *et al*, 1998, CABRINE-SANTOS *et al*, 2003). Além destes também já foram encontrados parasitos no interior de adipócitos e também em neurônios (ANDRADE & SILVA, 1995, VILLELA, 1932).

A primeira importante reação imunológica contra o *T. cruzi* se caracteriza por uma inflamação mononuclear focal devido à ruptura das células parasitadas, onde existe a liberação de uma série de mediadores tanto do hospedeiro quanto do próprio protozoário. Sabe-se que a entrada do parasito na célula do hospedeiro, se dá através da interação entre moléculas de adesão (BOSGHETTI *et al*, 1987, ALVES 1996), o qual após a entrada, escapa do vacúolo parasitóforo, podendo então se multiplicar no citoplasma da célula até a ruptura da mesma. É neste momento, que os produtos antigênicos liberados no interstício, desencadeiam uma resposta imunológica mediada principalmente por células mononucleares, tais como linfócitos, macrófagos etc., com uma reação inflamatória aguda e focal exsudativa e mononuclear com áreas de necrose (TAFURI, 1999)

Uma característica marcante na fase aguda é a parasitemia. Esta é bem evidente, tornando fácil a visualização do parasito em amostras de sangue

coletadas do indivíduo. Porém depende da quantidade de parasitos que consegue infectar o indivíduo. Conforme discutido por ROMANHÂ E TERRACINI (1945), quando este número é baixo, a fase aguda pode passar despercebida, sendo por estes, considerada como estágio crônico desde o início da infecção. Em outros casos, a parasitemia é evidente e o indivíduo apresenta um quadro febril moderado e intermitente, que na maioria das vezes oscila em torno de 38°C. Esta pode ser acompanhada de cefaléia, mal estar e hiporexia.

Alguns indivíduos apresentam um quadro de alterações sistêmicas, como o edema subcutâneo, aumento de volume dos linfonodos, hepatoesplenomegalia e, ainda, algumas complicações cardíacas e meningoencefálicas.

No coração, a inflamação assume um padrão difuso, com células inflamatórias mononucleares e edema de miocárdio, se estendendo ao sistema excito condutor, nervos e gânglios nervosos autônomos (ANDRADE, 1991). Esta inflamação geralmente é acompanhada por necrose de células parasitadas ou não, além de alterações eletrocardiográficas como arritmias, falha cardíaca e morte (ANDRADE, 1984).

#### **1.4.2 Fase Crônica**

A miocardite aguda difusa, que ocorre no primeiro momento da infecção, regride espontaneamente depois de um período de dois a três meses na maioria dos casos. Pode evoluir para uma miocardite focal moderada, que permanece e que pode durar anos sem nenhum sinal ou dano cumulativo (ANDRADE, 1999). Uma parcela destes indivíduos pode, espontaneamente, evoluir para uma forma

crônica progressiva, com insuficiência cardíaca, devido a uma miocardite crônica difusa que pode ser atribuída a fatores relacionados à hipersensibilidade tardia contra antígenos do próprio parasito conforme visto recentemente por MARTIN e TARLETON (2005), onde células T mantêm uma resposta imune efetora com a persistência deste durante a infecção, ou a mecanismos de natureza auto-imune (ENGMAN, and LEON, 2002, LEON and ENGMAN, 2001, SOARES *et al*, 2001, SADIGURSKY *et al*, 1982). Outros setores também podem ser atingidos, a exemplo do tubo digestivo, com o aparecimento dos “megas” do aparelho digestivo (megaesôfago e megacólon).

#### **1.4.2.1 Forma indeterminada**

Esta forma da doença de Chagas é definida por um curso clínico silencioso prolongado, após a fase aguda da doença. Os indivíduos apresentam evidências sorológicas e/ou parasitológicas da infecção, mas permanecem assintomáticos e não exibem sinais eletrocardiográficos de envolvimento cardíaco, nem anormalidades ao exame de raio X do trato digestivo e o exame anatomopatológico revela miocardite focal discreta. Entretanto, estudos clínicos longitudinais têm demonstrado que aqueles que se apresentam na forma indeterminada tentem a permanecer assintomáticos por um longo período de tempo, e conseqüentemente o seu prognóstico é considerado bom. Isto é um indicativo de que as lesões moderadas focais características desta forma não são cumulativas.

Estudos ultraestruturais demonstraram que as células inflamatórias que participam no processo são principalmente linfócitos, plasmócitos, macrófagos, alguns polimorfonucleares e mastócitos (ANDRADE *et al*, 1997). Estas se acumulam em áreas focais do interstício do miocárdio sem estabelecer contato célula/célula com os miocardiócitos, não invadindo ou destruindo os mesmos, como ocorre na infecção aguda. Em algumas destas lesões focais existem evidências de degradação da matriz extracelular, e células inflamatórias. Estas mudanças são indicativas de um mecanismo cíclico de evolução para lesões inflamatórias focais, acompanhado de remoção gradual, pela degradação do excesso de matriz e eliminação das células inflamatórias por apoptose (ANDRADE *et al*, 1997). Provavelmente, a formação de novas lesões é balanceada pela remoção das mais antigas, permitindo a sobrevivência do hospedeiro, quase sem nenhuma manifestação clínica. Indivíduos que passam para uma fase indeterminada da doença podem sobreviver muito tempo, sem desenvolver qualquer tipo de sintoma e/ou sinais da doença. Entretanto, Os fatores relacionados com a transição da forma indeterminada para uma forma crônica ainda não estão bem esclarecidos

### **1.5 A transição da forma indeterminada para a forma crônica cardíaca**

ANDRADE *et al*. (1987) demonstraram através de experimentos realizados com cães na fase crônica da doença de Chagas, que estes animais quando submetidos ao tratamento com ciclofosfamida em baixas doses apresentavam uma exacerbação das lesões inflamatórias do miocárdio.

Desde muito tempo já se tinham evidências de que algumas células poderiam estar relacionadas com a supressão da resposta imune do hospedeiro (SCHWARTZ *et al*, 1978); naquela época se atribuía estas funções às células T supressoras. Atualmente estas células receberam uma nova denominação, sendo chamadas de células T regulatórias, as quais expressam os marcadores de superfícies CD4+ CD25+, e comprovadamente estão envolvidas na regulação do sistema imune, exercendo atividade supressora da hipersensibilidade tardia (SHEVACH, 2001). A depleção destas células tem sido descrita como causa de muitas doenças auto-imunes, órgão específicas, em modelos animais (SAKAGUCHI *et al*, 1995), demonstrando seu papel como célula regulatória. CRISPIN *et al*, (2004) mostraram que existe uma *down-regulation* de moléculas co-estimulatórias, CD80 e CD86, na superfície das células dendríticas e células B, quando estas são submetidas à co-cultura com as células T regulatórias. CEDERBOM *et al*. (2000) estudaram as interações entre as células regulatórias e as células apresentadoras de antígeno e também mostraram que estas células são capazes de baixar os níveis de expressão de moléculas co-estimulatórias sobre a membrana das células apresentadoras de antígeno.

## **1.6 Patogenia da doença de Chagas**

Diferentes autores têm investigado o tipo de linfócitos envolvidos nas lesões tissulares na infecção crônica pelo *T. cruzi* e mostraram que os linfócitos T CD4+ são os principais componentes da reação inflamatória (MINOPRIO *et al.*, 1987,

1989; HONTEBEYRIE-JOSKOWICKZ *et al.*, 1987; TARLETON, 1991 e RIBEIRO DOS SANTOS, 1990). Em trabalho recente, ANDRADE *et al.* (2000) demonstraram o importante papel das células dendríticas intersticiais do coração, as quais captam os antígenos parasitários e atuam sobre as áreas T do baço estimulando a resposta inflamatória do miocárdio pela estimulação dos linfócitos CD4+. Estes achados demonstram a importância dos fenômenos de hipersensibilidade tardia no desenvolvimento de lesões na forma crônica cardíaca da doença de Chagas

Na forma indeterminada existe um aparente equilíbrio hospedeiro/parasito, modulado por fatores supressores da hipersensibilidade tardia (ANDRADE *et al.*, 1987). Não são, entretanto, conhecidos os mecanismos que desencadeiam a transição entre a forma indeterminada e a forma crônica cardíaca da doença. Enquanto na forma indeterminada, as lesões são focais e auto-limitadas (ANDRADE *et al.*, 1997), na forma crônica cardíaca são intensas, difusas, destrutivas e fibrosantes, com características celulares de hipersensibilidade tardia (ANDRADE *et al.*, 1991b). Em cães tratados com ciclofosfamida em baixas doses foi observada a evolução da doença de Chagas de uma forma indeterminada para a forma crônica cardíaca.

### **1.6.1 Auto-imunidade na doença de Chagas**

A resposta imune contra antígenos próprios na doença de Chagas humana e experimental foi demonstrada por diversos autores. Anticorpos contra diversos

antígenos, incluindo antígenos cardíacos (MCCORNICK and ROWLAND 1989, CUNHA-NETO *et al.* 1995) e do tecido nervoso (RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.* 1979, VAN VOORHIS and EINSEN 1989) dentre outros, tem sido detectados durante a infecção pelo *T. cruzi*. (Revisado em KIERSZENBAUM 1999).

Entretanto, auto-anticorpos são freqüentemente encontrados depois de infecções com diferentes patógenos e nem sempre estão relacionados com qualquer patologia (ARGOV *et al.* 1989, DANIEL-RIBEIRO & ZANINI, 2000).

Existem evidencias que falam a favor do potencial patogênico da IgG presente no soro de pacientes chagásicos, contra receptores muscarínicos e adrenérgicos dos cardiomiócitos (BORDA *et al.* 1984, STERIN-BORDA *et al.* 1991). A produção de autoanticorpos contra os adreno-receptores beta-1 e beta-2 já foram correlacionados com anormalidades elétricas cardíacas primárias (CHIALE *et al.* 1995). COSTA *et al.* (2000) e KAPLAN *et al.* (1997) demonstraram que o soro proveniente de pacientes chagásicos interfere na atividade elétrica de células miocárdicas embrionárias *in vitro*. Além disso DE OLIVEIRA *et al.* (1997) viram que coelhos perfundidos com este soro sofrem de alterações na condução e na eletrogênese cardíaca. Estas alterações cardíacas parecem ser resultado da ligação de anticorpos com receptores  $\beta$ -adrenérgicos e M2-colinérgicos expressos sobre a superfície da célula (COSTA *et al.* 2000, DE OLIVEIRA *et al.* 1997, KAPLAN *et al.* 1997).

Células T específicas auto-reativas também já foram descritas contra tecidos cardíacos e tecidos nervosos em camundongos e humanos (RIZZO *et al.* 1989, CUNHA-NETO *et al.* 1996, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ *et al.* 1987). RIBEIRO-DOS-SANTOS *et al.* (1992) demonstraram que corações singeneicos de

camundongos recém-nascidos transplantados na orelha de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, eram rejeitados enquanto que o transplante era aceito em animais normais. Além disso, a transferência de células T CD4+ de camundongos infectados determinou rejeição de transplante dos camundongos normais. Por outro lado, TARLETON *et al* (1997), demonstraram que corações de animais neonatos quando transplantados em animais cronicamente infectados, não exibiam nenhum sinal de rejeição auto-imune, e nem mesmo qualquer tipo de resposta inflamatória significativa. Estes transplantes sobreviveram por mais de um ano e eram absolutamente livres de parasitos. Porém quando o transplante recebeu injeção de parasitos livres, houve uma dramática resposta inflamatória resultando em falência do órgão transplantado.

### **1.6.2 Hipersensibilidade tardia.**

A hipersensibilidade tardia (tipo IV) é uma forma de reação imune celular na qual a célula efetora final é o fagócito mononuclear (macrófago) ativado (ABBAS *et al*, 2000). Este tipo de imunidade celular faz parte do mecanismo de defesa primário contra patógenos intracelulares, incluindo o *Trypanosoma cruzi*. A resposta característica da hipersensibilidade tardia evolui durante 24 a 48h. As células T, mediadoras da resposta tardia, são especificamente sensibilizadas em um encontro prévio com o antígeno e atuam no recrutamento de outros tipos celulares para o local da reação (ITANO, 2003). A administração de antígenos na pele de animais previamente sensibilizados pode induzir uma resposta inflamatória

lenta no local da injeção. A reação de hipersensibilidade resulta da interação entre o antígeno injetado, células apresentadoras de antígeno (APC) e células T. Aproximadamente 4 horas depois da injeção de antígeno, os neutrófilos acumulam-se em torno das vênulas pós-capilares no local da injeção. O infiltrado de neutrófilos desaparece rapidamente e, mais ou menos após 12 horas, o local da injeção fica infiltrado por linfócitos T e monócitos do sangue, também organizados numa distribuição perivenular. O fibrinogênio escapa dos vasos sanguíneos para os tecidos circundantes, onde é convertido em fibrina (ABBAS *et al*, 2000). A deposição de fibrina e, em menor grau, o acúmulo de linfócitos T e monócitos no interior do espaço tecidual extravascular em torno do local da injeção, fazem com que o tecido fique edemaciado, com formação de nódulo. Esta endureção, marco da hipersensibilidade, é detectável por volta de 18 horas após injeção de antígeno e é máxima em 24 a 48 horas. O longo intervalo entre a inoculação do antígeno e o início da endureção palpável é a razão para chamar a resposta de “tipo tardio”.

### **1.6.3 Células dendríticas e apresentação antigênica: antígenos do *Trypanosoma cruzi* e hipersensibilidade tardia**

APCs residentes, como as células de *Langerhans* podem ser identificadas em pele infectada com parasitos como foi visto por BLANK *et al.*(1993) com *Leishmania major*. Tais células, assim como outros tipos de células apresentadoras de antígeno como as células dendríticas, carregam o antígeno do

local de sensibilização para os linfonodos de drenagem, e/ou órgãos linfóides onde é mais provável ocorrer o contato com linfócitos T antígeno específicos.

A ativação e recrutamento de células para a área da inflamação são passos cruciais no desenvolvimento de resposta de hipersensibilidade tardia, que é um processo imunologicamente similar à imunidade mediada por células, envolvendo células T e citocinas (KOBAYASHI *et al.*, 2001). Uma vez ativados pelo antígeno em tecido periférico, os linfócitos T que medeiam a hipersensibilidade tardia, o fazem por secreção de citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF. A liberação destas moléculas, como a IL-2, no sítio de infecção, promovem a reação (ITANO *et al.*, 2003)

As células dendríticas pertencem ao sistema fagocítico mononuclear mielóide e originalmente foram definidas pela sua eficácia em estimular células T virgens (STEINMAN & COHN, 1973). Esta característica funcional ainda continua sendo a principal característica distintiva entre estas células e os macrófagos. As células dendríticas são caracterizadas pela sua pronunciada mobilidade, permitindo-as carrear antígenos de tecidos periféricos para órgãos linfóides (BANCHEREAU & STEINMAN, 1998). Conforme revisto por STEINMAN (1999), estas desempenham um papel crucial na indução da resposta primária de células T, contra patógenos, tanto *in vivo* como *in vitro*. ANDRADE *et al.* (2000), em estudo realizado em cães infectados com as cepas 12SF ou 21SF do *Trypanosoma cruzi*, demonstraram que estas células são capazes de captar antígenos parasitários no miocárdio. Como estas células tem a capacidade de migrar para as zonas T do baço, podem estimular uma resposta contra antígenos

do *T. cruzi* e assim promover uma resposta inflamatória no tecido cardíaco. A constante sensibilização do hospedeiro por antígenos parasitários apresentados na superfície das células apresentadoras de antígeno ao sistema imune do indivíduo, seria responsável pelo desencadeamento de lesões de hipersensibilidade tardia.

Uma sub-população de células dendríticas (*Langerhans*) se localiza na epiderme e expressa importantes estruturas intracelulares que estão envolvidas no processo de endocitose. Eles recebem o nome de grânulos de Birbeck (TAKIGAWA *et al*, 1985) e são extremamente importantes na captura de antígenos que adentram via epiderme.

As células dendríticas podem ser subdivididas em imaturas e maduras, no primeiro caso são muito ativas na captura de antígeno porém, com pouca capacidade de estimular células T, isto por conta da abundante quantidade de moléculas de MHC classe II seqüestradas em compartimentos intracelulares. Quando estas células passam a expressar em sua superfície as moléculas do MHC e co-estimuladoras da superfamília B7, elas se tornam maduras, sendo agora células apresentadoras de antígeno profissionais e potentes estimuladoras de células T virgens.

Diversas infecções já foram descritas como tendo apresentação antigênica via células dendríticas. JUNG *et al* (2002) mostraram que estas células são necessárias para montar uma resposta citolítica contra a bactéria *Listeria monocytogenes*. Sabe-se que na fase crônica da doença de Chagas os parasitos são bem escassos porém podem ser vistas regiões do tecido com infiltrados inflamatórios ocorrendo na ausência do parasito. É provável que mesmo na

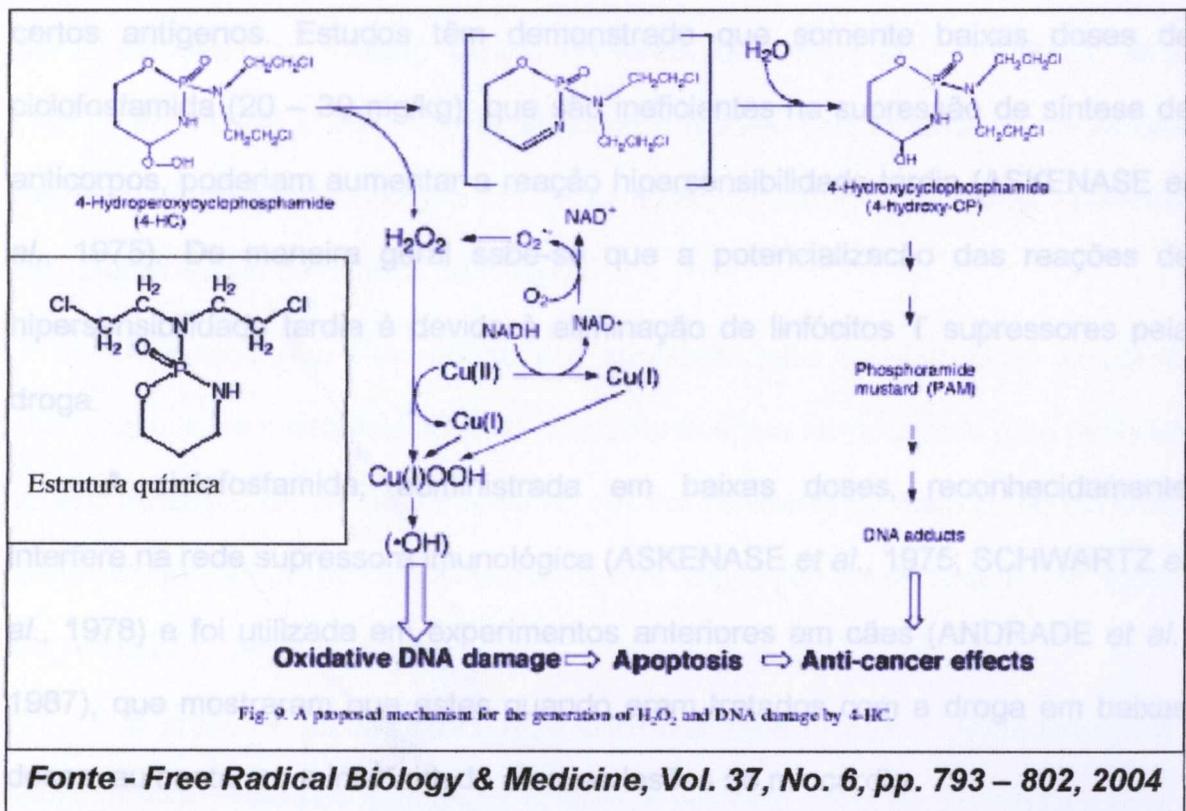
ausência do parasito naquele sítio inflamatório, possa estar havendo apresentação de antígenos parasitários. ANDRADE *et al* (2000) demonstraram através da técnica de imunohistoquímica, utilizando anticorpos monoclonais anti células dendríticas, que estas estão presentes no interstício do coração, sendo mais concentradas nos locais onde há infiltrado inflamatório. Este fato pode ser uma evidência que fala a favor do mecanismo de hipersensibilidade tardia como sendo responsável pelas lesões que ocorrem na doença de Chagas, uma vez que os antígenos do parasito não foram eliminados do organismo, podem estar sempre sensibilizando o sistema imune, resultando em lesão.

Por outro lado, sabe-se que a infecção é geralmente acompanhada por morte celular. Sendo os restos de células mortas processadas e apresentadas aos linfócitos T pelas células dendríticas juntamente com antígenos do parasito (HEATH & CARBONE, 2001). Como resultado deste mecanismo, existe apresentação simultânea de antígenos próprios com aqueles que não são, de maneira que é criado um ambiente potencial para desenvolvimento de auto-imunidade.

### **1.7 Ação da Ciclofosfamida na resposta imunológica na doença de Chagas**

A ciclofosfamida é uma droga alquilante com ação imunossupressora, seletiva para células linfóides e tem sido objeto de estudo desde 1958 (ARNOLD, BOURSEAUX & BROCK, 1958). A sua ação imunossupressora é devida à sua atividade de inibição da replicação do DNA nestas células imunologicamente competentes, pois existem evidências para a sua ação alquilante e a atividade

citotóxica envolvidas neste processo (BARDOS, CHMIELEWICZ & HEBBORN, 1969). Conforme revisto por MURATA *et al.* (2004) a ciclofosfamida é uma droga que tem sido bastante utilizada como antineoplásico para tratamento contra linfoma, mieloma, leucemia e outras doenças malignas. Seu mecanismo de ação esta representado esquematicamente na figura abaixo.



A atividade imunossupressora da ciclofosfamida é dose dependente, como foi visto na supressão de resposta imune humoral e celular. Um potente efeito imunossupressor da ciclofosfamida sobre anticorpos é também evidente em camundongos no que diz respeito a resposta antigênica timo-independente (SHAND, 1979)

Na sensibilização por contato tem sido visto que a ciclofosfamida administrada dois a três dias após a sensibilização, aumentou a reação na pele de animais experimentais (MAGUIRE & ETTORE, 1967 TURK *et al.*, 1972). Estas observações tem sido confirmadas em um número de modelos alternativos e por isso têm sido utilizada para induzir reações de hipersensibilidade tardia para certos antígenos. Estudos têm demonstrado que somente baixas doses de ciclofosfamida (20 – 30 mg/kg), que são ineficientes na supressão de síntese de anticorpos, poderiam aumentar a reação hipersensibilidade tardia (ASKENASE *et al.*, 1975). De maneira geral sabe-se que a potencialização das reações de hipersensibilidade tardia é devida à eliminação de linfócitos T supressores pela droga.

A ciclofosfamida, administrada em baixas doses, reconhecidamente interfere na rede supressora imunológica (ASKENASE *et al.*, 1975; SCHWARTZ *et al.*, 1978) e foi utilizada em experimentos anteriores em cães (ANDRADE *et al.*, 1987), que mostraram que estes quando eram tratados com a droga em baixas doses, aumentaram a intensidade de suas lesões no miocárdio.

A ação da ciclofosfamida na doença de Chagas foi estudada com protocolos experimentais diferentes no que diz respeito ao esquema de tratamento. CALABRESE *et al.* (1996) viram que a depender do tempo de administração e da dosagem dada ao animal experimentalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*, a droga pode atuar aumentando a intensidade das lesões inflamatórias. Foi visto também que em baixas doses a quantidade de monócitos circulantes pode sofrer alteração. Por outro lado, a quantidade de linfócitos sofreu

alteração, com desenvolvimento de linfocitose nos animais tratados com baixas doses da droga.

O cão é um modelo experimental que desenvolve as diversas formas clinico-patológicas da doença de Chagas, como são vistas no homem. Tanto a fase aguda quanto a fase crônica, incluindo nesta a forma indeterminada, podem ser observadas no modelo canino conforme demonstrado, ANDRADE et al (1981), ANDRADE (1984). Por este motivo o modelo canino torna-se um modelo de extrema importância para o estudo completo de todos os aspectos referentes às características da doença de Chagas.

O camundongo é um animal que apresenta suas características biológicas conhecidas e bem estabelecidas. O uso de anticorpos monoclonais para pesquisa e caracterização de diferentes tipos de células inflamatórias, bem como daquelas participantes na apresentação antigênica e na regulação do sistema imune podem ser realizadas neste modelo.

No presente estudo procura-se contribuir para o melhor entendimento da forma indeterminada da doença de Chagas e avaliar o papel da ciclofosfamida em baixas doses na supressão do processo de hipersensibilidade tardia, responsável pelo desenvolvimento das lesões fibróticas inflamatórias características da cardiopatia crônica chagásica. Procura-se, deste modo, explicar os mecanismos de transição entre a forma indeterminada e a forma crônica cardíaca da doença de Chagas.

## 2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

O esclarecimento da patogenia da forma indeterminada da doença de Chagas e do papel de fatores supressores na manutenção desta forma, bem como a compreensão dos mecanismos que levam à ruptura do equilíbrio hospedeiro/parasito levando ao desencadeamento das lesões da forma crônica cardíaca pode-se constituir em uma contribuição importante para o entendimento desta forma da doença de Chagas.

Tendo o conhecimento acerca dos mecanismos que contribuem para a este equilíbrio vimos a possibilidade de interferir nestes fatores dando uma contribuição no sentido de evitar que o indivíduo evolua para uma forma grave da doença, como a cardiopatia crônica chagásica.

### 3. HIPÓTESE

A ciclofosfamida em baixas doses (20 a 20mg/kg) interfere na rede supressora da resposta de hipersensibilidade tardia, mecanismo responsável pelas lesões na fase crônica da doença de Chagas, permitindo que os animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* apresentem uma intensificação das lesões inflamatórias.

## **4. OBJETIVOS**

### **4.1 Objetivo geral**

Este trabalho tem como objetivo o estudo da fase crônica da doença de Chagas e a interferência da ciclofosfamida em baixas doses na evolução da doença. Será feito um estudo das lesões enfocando o miocárdio e reação da pata, frente à injeção de antígeno de *T. cruzi*. Além disso serão investigadas as células inflamatórias envolvidas no processo, bem como o papel das células T regulatórias na manutenção das lesões.

### **4.2 Objetivos específicos**

- 1 – Comparar a parasitemia e mortalidade entre os diferentes grupos experimentais de camundongos infectados pelo *T. cruzi*.
- 2 - Avaliar a resposta de hipersensibilidade tardia através do teste cutâneo da pata em animais infectados.
- 3 - Avaliar o papel da ciclofosfamida em baixas doses sobre a intensidade dos infiltrados inflamatórios em miocárdio e músculo esquelético
- 4 – Caracterizar imunologicamente as células presentes nos infiltrados inflamatórios através de reação de imuno-histoquímica, com anticorpos anti- CD4, CD8, e anti-CD25.
- 5 – Detectar a presença de antígenos nos tecidos tanto de miocárdio quanto de músculo esquelético com anticorpos policlonais anti-*T. cruzi*.

6 – Avaliar o efeito da ciclofosfamida em baixas doses no sangue periférico (leucograma) e na produção de anticorpos anti-*T. cruzi*.

## 5. MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Animais experimentais e inóculo:

Foram utilizados, cem (100) camundongos Balb/c, isogênicos, de ambos os sexos, pesando 15 a 20 g (20 dias), fornecidos pelo Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz. Estes animais foram infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, protótipo do biodema tipo III, que vem sendo mantida em laboratório por passagens sucessivas em camundongos. Os animais foram infectados intraperitonealmente com inóculo de  $1 \times 10^5$  formas tripomastigotas sanguícolas obtido do sangue de camundongos doadores, retirado do plexo axilar, após a anestesia dos mesmos pela inalação do anestésico Halothano, usando como anticoagulante citrato de sódio a 3,8%. Em seguida estes animais foram eutanasiados. Trinta animais foram deixados sem infecção para servir de controle. Estes animais foram acompanhados até o 180º dia de infecção quando então, na fase crônica, foram divididos em dois grupos, sendo um deles submetidos ao tratamento com ciclofosfamida em baixas doses por um período de um mês, em três doses semanais dadas em dias alternados.

## **5.2 Acompanhamento**

### **5.2.1 Parasitemia**

Os camundongos infectados foram acompanhados desde a fase aguda (7 dias após infecção) pela avaliação diária da parasitemia (média obtida em 10 camundongos, pelo exame microscópico em 50 campos de 400X, de sangue periférico no volume de 10 $\mu$ L retirado por secção da cauda).

### **5.2.2 Mortalidade**

A mortalidade cumulativa foi avaliada até o 180º dia de infecção. Até este período, os animais ainda compunham um único grupo experimental. A partir deste ponto eles foram divididos em dois grupos, a serem submetidos a protocolos experimentais diferentes para comparação.

Os sobreviventes aos 180 dias pós-infecção (60 animais), foram divididos ao acaso em dois grupos, e acompanhados quanto à mortalidade. Neste caso observou-se também a diferença da mortalidade entre os dois grupos.

## **5.3 Grupos experimentais:**

*Grupo I* – Este se refere aos animais Balb/c cronicamente infectados tratados com ciclofosfamida em baixas doses (20mg/kg) – 30 animais

*Grupo II* – Este se refere aos camundongos cronicamente infectados não tratados – 30 animais

*Grupo III* – Este foi constituído por camundongos controles intactos do mesmo lote inicial – 30 animais

Observação – Todos os animais foram obtidos no mesmo período e, portanto, possuíam idades aproximadas.

#### **5.4 Tratamento com ciclofosfamida**

Foi utilizada a droga ciclofosfamida, com nome comercial Genuxal, do lote OM 105 fabricado pela ASTA Médica AG- Frankfurt, Alemanha.

O primeiro grupo de animais infectados foi submetido ao tratamento com ciclofosfamida em baixas doses (30mg/kg) por um período de um mês. A droga foi administrada intraperitonealmente em dias alternados até o final do período de tratamento. Um grupo de animais não infectados também foi submetido ao tratamento para servir de controle.

##### **5.4.1 Dose**

A dose utilizada foi de 20mg/kg de peso corporal do animal. A droga foi injetada intraperitonealmente no volume de 0,1ml por dia. O tratamento foi iniciado após 180º dias de infecção e durou quatro semanas, sendo as injeções feitas três vezes por semana.

## 5.5 Teste cutâneo

Após o período de tratamento com ciclofosfamida em baixas doses no grupo experimental I, os dois grupos experimentais foram submetidos à injeção intradérmica na pata traseira direita de antígeno de formas epimastigotas de *T. cruzi* obtidas de meio cultura.

## 5.6 Preparo do antígeno

Formas epimastigotas de cultura mantidas em meio WARREN foram concentradas após centrifugação de várias alíquotas. Os sedimentos foram reunidos num único tubo de ensaio e lavados sucessivamente em solução salina fosfatada (PBS) com pH fisiológico que variou de 7,2 a 7,4. Seguido a essas sucessivas lavagens fez-se uma última centrifugação do material re-suspendido em PBS, colhendo-se em seguida o sedimento e descartando o sobrenadante.

O sedimento colhido foi então submetido a dez ciclos de congelamento súbito em nitrogênio (N<sub>2</sub>) líquido (-196°C) seguido de descongelamento em banho-maria a 37°C. Com este procedimento obteve-se a lise da membrana plasmática do *T. cruzi*, permitindo que o conteúdo protéico fosse liberado.

O conteúdo final foi centrifugado, sendo o extrato antigênico, representado pelo sobrenadante, coletado para uso. Este conteúdo foi filtrado em filtro milipore 0,22 µm dentro de um fluxo laminar para evitar contaminação.

### **5.6.1 Dosagem protéica do conteúdo antigênico obtido**

A dosagem foi realizada através da reação das proteínas do extrato antigênico do *T. cruzi* com o ácido bicinconínico (BCA), Utilizando-se o “BCA Protein Assay Kit” da PIERCE (catálogo número 2161297A). A amostra obtida foi submetida a esta técnica e a concentração protéica foi ajustada para 2mg/ml.

### **5.7 Injeção intradérmica no coxim da pata traseira direita**

Vinte quatro horas após o término do tratamento do grupo I (infectado e tratado com ciclofosfamida), quinze animais dos dois grupos experimentais receberam o antígeno preparado na concentração de 2mg/ml. A pata traseira direita recebeu um volume de 25 $\mu$ L (50 $\mu$ g de proteínas) do antígeno enquanto a pata contra-lateral recebeu o mesmo volume de solução salina fosfatada (PBS). Num outro grupo de animais restante foi feita uma injeção 15 dias após o término do tratamento.

### **5.8 Medição da espessura da pata**

Utilizando um paquímetro (FISHERBRAND DIGITAL CALIPERS, TRACEABLE<sup>®</sup>, FISHER SCIENTIFIC) os animais tiveram suas patas medidas em períodos estabelecidos de 24, 48, e 72h após o término do tratamento. Num outro grupo de animais foi feita uma injeção de antígeno de *T. cruzi* após 15 dias de

finalização do tratamento. Após esta nova injeção, nós repetimos as medições das patas nos períodos anteriormente citados (24, 48, e 72h após injeção do antígeno). A unidade de medida utilizada foi o milímetro (mm).

### **5.9 Eutanásia dos animais:**

Os animais foram eutanasiados em diferentes etapas após o término do tratamento, por exsanguinação, após anestesia pelo pentobarbital sódico.

A cada momento de medição das patas com o paquímetro, três animais de cada grupo foram eutanasiados, para retirada dos tecidos e órgãos para estudo histopatológico. As patas traseiras também foram retiradas para estudo das lesões desenvolvidas após a injeção de antígeno do *T. cruzi*. O sangue do plexo axilar foi coletado para os testes sorológicos.

### **5.10 Estudo histopatológico**

Foram realizadas necrópsias completas, com retirada do coração, fígado, baço e músculo esquelético. Secções dos diversos órgãos foram fixadas em solução de formaldeído tamponado, pH7.2. Outra parte foi criopreservada em nitrogênio líquido para estudo imunohistoquímico após embebição em matriz de congelamento de tecido (Tissue Teck<sup>®</sup>, O.C.T. Compound, Sakura Finetechnical Co., Ltd., Tokyo, Japan).

### **5.11 Coleta de material para histopatologia do teste cutâneo:**

Em dez animais as patas foram seccionadas longitudinalmente, fixadas em formol neutro e a seguir descalcificadas em EDTA 5% por um período que variou de 2 a 4 semanas, até se obter a consistência que permitiu o corte. Depois estas foram incluídas em parafina para obtenção de cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina (HE). Em outra parte dos animais, o coxim das patas foram retirados, criopreservados em Tissue Teck, para obtenção de cortes em criostato, para imunohistoquímica.

### **5.12 Imuno-histoquímica.**

Em secções de criostato, foi feita a imunomarcagem *in situ*, dos componentes celulares do infiltrado inflamatório presente no miocárdio, em músculo esquelético e baço através da técnica de imuno-histoquímica. Foram utilizados os anticorpos monoclonais (mAbs) anti-CD25 (Clone 7D4, Rat IgM, catálogo número 550529) anti-CD8 e CD4 todos fabricados pela BD Biosciences Pharmigen. Como anticorpo secundário foi usado IgG<sub>2c</sub> de rato conjugado à biotina (clone A92-1 anti-rat. BD, Biosciences, catálogo número 553909). Para ligação ao anticorpo secundário biotilado foi acrescida Streptavidina peroxidase pré-diluída (Sav-HRP, Streptavidin-Horseradish Peroxidase, catálogo número 550946).

### **5.12.1 Imunomarcacão com - anti-CD4, CD8, CD25 em Tecidos criopreservados.**

Foram obtidas secções de 5µm em criostato e montados sobre lâminas com polímeros de lisina (poli-lisina). Após esta montagem os tecidos foram fixados em acetona gelada por 5 a 10 minutos. Seguindo a isso eles foram conservados no freezer (-20°C) No momento do uso foram deixadas à temperatura ambiente por cerca de 10 minutos quando então foram submetidas à três lavagens em PBS pH 7,4 para remoção da matriz de congelamento do tecido. Após isso foi feito o bloqueio de peroxidases endógenas por imersão destes em solução de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)-Metanol 3%. Foram deixados incubando por dez minutos a temperatura ambiente. Após foram lavados duas vezes em PBS, cada lavagem durando 2 minutos. Seguindo a isso os anticorpos específicos (anti-CD4, CD8, CD25 e anti-*T.cruzi*) diluídos (solução de PBS-BSA) na concentração padronizada foram colocados sobre as lâminas e deixadas incubar por uma hora a temperatura ambiente, quando então foram novamente lavadas em PBS por 3 vezes, para então aplicar o anticorpo biotilado secundário. Deixando incubar por trinta minutos, lavando-se nas mesmas condições para aplicação da Streptavidina peroxidase. Fez-se mais um ciclo de lavagem em PBS para então aplicar a solução reveladora DAB, deixando sobre as lâminas até que estas adquirissem uma coloração desejada. O bloqueio da reação foi feito mergulhando as lâminas em água corrente deixando-as por dez minutos.

A contra coloração foi feita usando o verde metila durante 10 minutos, retirando o excesso com álcool absoluto. Em seguida as lâminas foram montadas em bálsamo para análise.

### **5.12.2 Imunomarcção com anti-*T.cruzi* em tecidos fixados em formol.**

Antes de começar a reação estes tecidos foram desparafinizados com xilol, e a seguir tratados com acetona, álcool absoluto, álcool 70%, 50% e 30%. Em seguida foram banhados em PBS e mergulhados em peróxido de hidrogênio-metanol 3% para bloqueio das peroxidases endógenas. Foi feita recuperação antigênica através de microondas de calor em forno nos tempos de 5, 3 e 2 minutos com potência de 8, 10, e 12 (Watts) respectivamente. Para isso as lâminas foram mergulhadas em solução de citrato de Sódio com pH 6,0. Terminado esse processo, as lâminas foram então lavadas em PBS para aplicação do anticorpo primário (isotipo rato anti-camundongo) e deixadas “*overnight*” a 4°C. No dia seguinte foram retiradas da geladeira e igualadas à temperatura ambiente por uma hora para então serem lavadas e receberem o anticorpo secundário (anti-rato) ligado à peroxidase na diluição de 1:300. Fez-se outro ciclo de lavagens para revelar com DAB, corar e montar para análise.

### **5.13 Teste sorológico de imunofluorescência indireta.**

O sangue dos animais do estudo foi coletado do plexo axilar e colocados em tubos *Eppendorff*. Estes foram submetidos à centrifugação em alta velocidade

(10000 rpm) por 2 minutos, cerca de uma hora após terem sido coletados de cada animal. O sobrenadante contendo o soro foi congelado até o momento de realização da técnica de imunofluorescência com anticorpo anti- *T. cruzi*.

## **5.14 Análise histopatológica dos tecidos coletados**

### **5.14.1 Descrição das lesões**

A análise foi feita através de microscopia ótica fazendo-se uma descrição do perfil de lesões encontradas no coração e no músculo esquelético dos animais dos diferentes grupos experimentais. Após a descrição do perfil de lesões foi feita uma análise semi-quantitativa expressa em (+), (++) e (+++); (+) correspondendo a escasso e difuso infiltrado mononuclear e/ou pequenos focos de infiltração mononuclear; (++) correspondendo a difuso infiltrado mononuclear mais acentuado do que o grau anterior, com focos localizados; (+++) correspondendo a denso infiltrado difuso e/ou infiltrados focais confluentes com necrose de miócitos.

### **5.14.2 Análise quantitativa**

#### **5.14.2.1 Morfometria**

Foi realizada através de exame ao microscópio ótico usando o programa Axion Vision, para contagem das células dos infiltrados inflamatórios. Os valores quantificados foram plotados num gráfico para comparação. A morfometria foi feita tanto para os cortes corados com hematoxilina e eosina quanto para aqueles que foram marcados com anticorpo anti-CD4, CD8 e anti-CD25 (imuno-histoquímica).

Para todas as análises foram feitos testes estatísticos para verificar a significância das diferenças encontradas.

### **5.15 Relação do peso do baço dividido pelo peso corporal**

O baço de todos os animais do estudo foi pesado e dividido pelo peso corporal. O valor obtido foi plotado num gráfico e analisado estatisticamente.

### **5.16 Teste estatístico utilizado**

O teste escolhido foi o Mann-Whitney, uma vez que todos os dados utilizados no trabalho são não paramétricos. Foram consideradas estatisticamente significantes, as amostras que mostraram um valor de  $p < 0,05$ .

Foi utilizado o mesmo teste para comparação da espessura das patas entre os diferentes grupos e também para a morfometria das lesões histopatológicas de tecidos do miocárdio e do músculo esquelético.

### **5.17 Leucograma**

Amostras de sangue dos animais dos diferentes grupos experimentais foram coletadas para quantificação das células sanguíneas. Estas foram acondicionadas em tubos Eppendorf com citrato de sódio a 3,8%, a uma diluição de 1:1. Em seguida as amostras foram colocadas a uma temperatura de 4°C até o momento da leitura (até 2 horas). O aparelho utilizado para quantificação das

células foi o analisador hematológico STKS Couter (EUA) e o *software* utilizado para a geração dos gráficos, números absolutos e relativos foi o STKS Couter.

## 6. RESULTADOS

### 6.1 PARASITEMIAS

Foi avaliada a evolução da parasitemia nos seguintes grupos experimentais: 1) camundongos cronicamente infectados e tratados com ciclofosfamida em baixas doses (20mg/kg de peso corporal), 2) camundongos crônicos não tratados.

A **Figura 1** mostra o perfil parasitêmico dos animais infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* com uma parasitemia progressiva com pico no 29º dia de infecção. Após este período os animais mostraram uma queda continuada da curva parasitêmica, a qual se tornou negativa por volta do 43º dia (início da fase crônica), se mantendo assim até a fase crônica (a partir de 60 dias de infecção) quando então foi iniciado o tratamento. Antes do início deste, foi feita uma nova parasitemia por duas semanas. Foi visto, que nenhum dos grupos estudados apresentou parasitemia positiva e esta permaneceu negativa durante e após tratamento.

### 6.2 MORTALIDADE

A mortalidade dos animais foi acompanhada desde o início da infecção, até o 182º dia. Neste período os animais compunham um único grupo experimental de animais infectados cronicamente. A mortalidade dos animais até este ponto foi de 40%, sobrevivendo 60 animais de um total de 100 que haviam sido infectados com

a cepa Colombiana do *T. cruzi* (**Figura 2**). Aleatoriamente, estes animais foram subdivididos em dois grupos experimentais cada qual contendo trinta animais.

A partir de então, os grupos foram submetidos a protocolos experimentais diferentes. Um dos grupos foi tratado com ciclofosfamida em baixas doses (20mg/kg de peso corporal) e o outro foi deixado como controle infectado. A mortalidade dos grupos foi acompanhada paralelamente até o final do experimento. O grupo tratado com ciclofosfamida em baixas doses apresentou um índice de mortalidade superior, morrendo 14 animais de um total de trinta, perfazendo um percentual de 46,6% de mortalidade. No grupo experimental de animais infectados não tratados, o índice de mortalidade foi de 33% (**Figura 3**).

Vale salientar que estes índices de mortalidade foram obtidos no período logo após o último dia de tratamento, ou seja após 210 dias de infecção.

### 6.3 TESTE SOROLÓGICO DE IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA.

Para o estudo da resposta humoral foi feita a determinação dos títulos de anticorpos totais presentes no soro dos animais cronicamente infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*.

Os soros dos animais cronicamente infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* de ambos os grupos tratados e não tratados, mostraram títulos que variaram de 80 até 1280 (**Figura 4**). Comparando estes números foi visto que não houve diferença estatística significativa entre os grupos, apesar de o grupo não

tratado mostrar uma média superior quando comparado àquele grupo que foi tratado. O valor de p achado para o teste estatístico utilizado foi de 0,50.

#### **6.4 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA PELA ESPESSURA DA PATA.**

Um dos critérios utilizados para se avaliar resposta de hipersensibilidade tardia em camundongos é através do teste cutâneo na pata, pela medida da espessura da mesma após injeção de antígeno em um animal anteriormente exposto.

Todas as patas que receberam somente solução salina não apresentaram espessamento nos períodos estudados, tanto para o primeiro momento de medição (logo após o término do tratamento) quanto para o segundo momento (15 dias após término do tratamento)(**Tabelas 5 e 6**) Por outro lado, aquelas que receberam antígeno apresentaram-se inchadas, fato comprovado pelo espessamento da mesma. Mais uma vez os dois momentos de medição da pata mostraram diferença.

O espessamento da pata observado apresentou o seu pico com 24 horas em ambos os grupos. Depois deste período este diminuiu e a pata praticamente retornou ao normal após 72 horas de injeção do antígeno.

Quando se comparou a espessura das patas entre o grupo de animais infectados e tratados com ciclofosfamida em baixas doses com aquele somente infectado, vimos que este foi sempre maior no grupo infectado e tratado, em todos os períodos de medição (24, 48 e 72 horas após injeção do antígeno). Quando

fizemos comparação estatística utilizando-se o teste não paramétrico de Mann-Whitney pudemos observar que o único período em que a diferença do edema mostrou significância foi 24 horas após a injeção do antígeno (**Figura 5**). O valor de p achado para este momento foi de 0,0049. O resultado se repetiu quando fizemos a medição das patas 15 dias após término do tratamento, seguido de uma nova injeção de antígeno. Vimos mais uma vez que 24 horas após a injeção deste, houve uma diferença estatística significativa com um valor de p de 0,0117(**Figura 6**). Os animais que foram tratados sempre mostraram maior espessamento da pata.

#### **6.5 ESTUDO HISTOSTOPATOLOGICO DO TESTE CUTÂNEO (COM ANTÍGENO PARASITÁRIO) EM CAMUNDONGOS CRONICAMENTE INFECTADOS PELO *T. CRUZI*: CONTROLES E TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA EM BAIXAS DOSES.**

No grupo de animais com infecção crônica observou-se com 24 horas após injeção do antígeno, intensa miosite com infiltrados de polimorfonucleares (+++) e de linfócitos (++) que se estendem ao tecido conjuntivo subdérmico com envolvimento de pequenos vasos e arteríolas (**Figura 7 A, B**). Na derme observou-se infiltrado perivascular envolvendo os pequenos vasos e discreto infiltrado mononuclear difuso (**FIGURA 8 A, B**). Com 48 horas havia discreta a moderada miosite e moderado infiltrado mononuclear no conjuntivo subdérmico. Na derme, foram vistos infiltrados mononucleares em torno de pequenos vasos. No grupo de animais cronicamente infectados e tratados com ciclofosfamida

**(FIGURA 8 C, D, E, F)**, observou-se igualmente ao grupo anterior, que as lesões foram mais intensas após 24 horas de injeção do antígeno, havendo uma regressão destas após 48 horas. Foi vista intensa miosite (+++) com infiltrado de polimorfonucleares (+++) e linfócitos (++) envolvendo vasos e nervos. Estas lesões se propagavam ao tecido conjuntivo subdérmico onde se observou difuso infiltrado mononuclear que se adensa em torno de pequenos vasos e anexos cutâneos **(Figura 8 D, E, F)**. Houve em alguns casos isolados, a presença de focos de necrose do tecido dérmico com infiltrado mononuclear **(Figura 8 C)**. O exame, com 48 horas de injeção do antígeno, mostrou lesões musculares semelhantes, porém com menor intensidade quando comparado ao período de 24 horas após injeção. Na derme foram vistas lesões de arteriolite e perivasculite **(Figura 8 E)**, caracterizadas pela vacuolização e tumefação endotelial da parede de arteriolas e capilares com infiltrados inflamatórios perivasculares envolvendo as paredes destes vasos.

O grupo controle composto de animais não infectados mostrou discreto infiltrado mononuclear perivascular e discreto infiltrado do tecido conjuntivo subdérmico. Não foram vistas lesões inflamatórias na derme. Além disso, não foi visto neste grupo a presença de infiltrados de polimorfonucleares.

## **6.6 HISTOPATOLOGIA DO TECIDO CARDÍACO**

### *1 – Camundongos cronicamente infectados, não tratados*

O exame do miocárdio mostrou na maioria dos casos estudados (8/15), uma discreta (+) miocardite difusa representada por escasso infiltrado intersticial

mononuclear (**Figura 8A**), sem comprometer a estrutura do órgão e na ausência de lesões focais necrótico-inflamatórias do miocárdio. As lesões eram predominantes no miocárdio atrial. Em 6/15 casos as lesões inflamatórias intersticiais difusas eram moderadas (++) observando-se focos de fibrose intersticial subendocárdicos (**Figura 8B**) ou em torno dos vasos da base e em um dos casos havia raros focos isolados de necrose de miócitos cardíacos, com infiltrados focais mononucleares. Em 1/15 casos havia um infiltrado intenso (+++), difuso, relacionado com a propagação de processo inflamatório no conjuntivo da base do coração.

2 – *Camundongos cronicamente infectados, tratados com ciclofosfamida (baixas doses)*

Em 4/16 camundongos o exame do miocárdio mostrou lesões inflamatórias discretas (**Figura 10 B**) (+) caracterizada por infiltrado intersticial difuso, não se observando lesões focais necrótico-inflamatórias do miocárdio. Em 10/16 casos observou-se moderada (++) (**Figura 10 D**) infiltração difusa intersticial, com predominância na região subepicárdica, estendendo-se ao miocárdio onde se vêem áreas de fibrose e infiltrado mononuclear. Em 3/16 casos, foram observadas lesões intensas do miocárdio (+++) (**Figura 11 D**) com a presença de infiltrado inflamatório intersticial difuso moderado a intenso ao lado de lesões focais necrótico-inflamatórias com destruição de miócitos cardíacos e infiltrado de macrófagos. Foram vistas também lesões de arterite e peri-arterite com infiltrados linfocitários peri-arteriolares

3 - *Conclusão* – Comparando-se os dois grupos, verifica-se uma acentuação das lesões nos animais submetidos ao tratamento com ciclofosfamida em baixas

doses, com acentuação neste grupo, do processo inflamatório intersticial difuso e a presença de destruição de miócitos cardíacos em áreas focais, com presença de infiltrado de macrófagos e linfócitos.

## 6.7 MORFOMETRIA DO TECIDO CARDÍACO

Com o objetivo de quantificar as células dos infiltrados inflamatórios presentes no miocárdio, realizamos a morfometria das secções histológicas deste órgão. Foram avaliados cinco campos microscópicos do coração de cada animal, de um total de dez. Ao analisar os resultados vimos que a quantidade de células inflamatórias presentes nos infiltrados inflamatórios dos animais pertencentes ao grupo tratado com ciclofosfamida em baixas doses foi sempre maior do que aquele somente infectado (**Figura 12 e 13**). Na **tabela 3 e 4** fizemos o agrupamento em classes de todos os 50 campos microscópicos analisados. Pudemos observar que no grupo somente infectado as classes apresentam valores menores, o que significa menor número de células em uma determinada quantidade de campos microscópicos. Por outro lado podemos observar que aquele grupo infectado e tratado apresenta classes com números maiores e, além disso, possui 26% de casos situados nas classes com maior número, contra apenas 8% dos animais do grupo somente infectado, considerando ainda que as maiores classes deste grupo ainda são menores que no grupo infectado e tratado. Estatisticamente, estes grupos mostraram uma diferença significativa. Foi feito o teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney considerando cada campo microscópico isoladamente, totalizado 50 campos por grupo. Repetimos a análise

considerando as médias destes campos, neste caso totalizando 10 amostras, referentes aos dez animais. Tanto no primeiro caso quanto no segundo vimos que a diferença estatística foi significativa com valores de p menores do que 0,05. Tal diferença mostrou um valor de  $p = 0,0191$ .

## **6.8 HISTOPATOLOGIA E MORFOMETRIA DO TECIDO MUSCULAR**

Semelhante ao miocárdio, o tecido muscular esquelético mostrou um grau variado de lesões inflamatórias. Podemos observar desde regiões com poucos infiltrados inflamatórios até zonas com intensa destruição de fibras musculares. Várias áreas com muita necrose e fibrose. Alguns casos mostraram calcificação distrófica.

A análise semi-quantitativa mostrou maior intensidade naqueles animais infectados e tratados (**Figura 14**). Este fato foi corroborado com a utilização da morfometria. Mais uma vez podemos observar que o grupo tratado com ciclofosfamida em baixas doses foi o que apresentou maior número de células inflamatórias nos infiltrados, fato comprovado pela análise estatística demonstrando um valor de  $p = 0,0149$ .

## **6.9 RELAÇÃO PESO DO BAÇO X PESO CORPORAL**

Com o objetivo de avaliar o estado reacional do baço, na infecção crônica pelo T. cruzi em camundongos tratados e não tratados, foi avaliada a relação do

peso do baço pelo peso corporal. Fizemos tal procedimento dividindo-se a primeira variável pela segunda. Notamos que no grupo tratado com ciclofosfamida em baixas doses essa relação aumentou (**Figura 14**). Esta diferença foi estatisticamente significativa com um p bastante baixo ( $p=0,0072$ )

## **6.10 IMUNOHISTOQUÍMICA - CD25, CD 4, CD8 ANTI- T. CRUZI.**

### **6.10.1 Densidade de células T CD25 no baço (marcador de ativação inicial ou recente)**

A imunomarcção de marcador de ativação recente de células CD25+, usando o anticorpo monoclonal anti-CD25 mostrou tanto o grupo infectado e tratado quanto aquele somente infectado marcações positivas. Quando realizamos a comparação da quantidade de células presentes nos centros germinativos positivos para CD25 vimos que o grupo infectado e tratado apresentou uma marcação mais evidente quando comparado ao grupo somente infectado (**Figura 16**). Tal comparação foi feita através de morfometria e o número de células encontradas nos diferentes casos foi submetido ao teste estatístico não paramétrico de Mann-Whitney (**Figura 17**). O valor de p encontrado foi de 0,0066 o que demonstra que a diferença foi estatisticamente significativa pois o p é menor que 0,05.

### **6.10.2 Densidade de células T CD4 e CD8 no miocárdio**

A marcação realizada utilizando os anticorpos monoclonais anti-CD 4 e CD8 no miocárdio mostrou marcação positiva para ambos os grupos experimentais. O miocárdio apresentou células marcadas no interstício e também em regiões localizadas em torno de vasos (**Figura 18**). Foi visto que a quantidade de células T predominantes com marcação positiva eram CD8 tanto no grupo tratado como no grupo somente infectado (**Figura 19 A e B**). Vimos que esta diferença foi aumentada quando os animais foram submetidos ao tratamento com ciclofosfamida em baixas doses e que esta diferença foi estatisticamente significativa (**Figura 19D**). Em relação às células CD4 vimos que o tratamento com ciclofosfamida em baixas doses aumentou a sua quantidade porém esta diferença não foi estatisticamente significativa (**Figura 19C**).

### **6.10.3 Imunomarcação com anticorpo policlonal anti-*T. cruzi***

Foi demonstrada, no miocárdio, a presença de ninhos parasitários com marcação positiva em apenas 3 casos estudados no miocárdio (**Figura 19**).

## **6.11 – LEUCOGRAMA**

A quantificação e classificação das células sanguíneas nos grupos experimentais não mostrou alterações evidentes em nenhum dos períodos

estudados (24 horas, 15 dias, ou 30 dias após o término do tratamento. Os valores encontrados estão representados na **Tabela 5**.

## 7. DISCUSSÃO

Os resultados do presente trabalho permitiram demonstrar a influência da ciclofosfamida em baixas doses na exacerbação das lesões na fase crônica da doença de Chagas, confirmando os achados de ANDRADE *et al* (1987) que demonstraram pela primeira vez esta atuação no modelo canino. No modelo murino utilizado no presente estudo, os animais estariam numa forma indeterminada, onde as lesões são discretas ou moderadas e quando sob ação da ciclofosfamida mostraram nítida exacerbação das lesões necrótico - inflamatórias no miocárdio, o que poderia significar numa evolução para uma forma crônica cardíaca progressiva.

Nos grupos experimentais estudados os animais cronicamente infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* mostraram um índice de mortalidade intermediária, compatível com o que geralmente se observa para esta cepa. O tratamento com ciclofosfamida em baixas doses determinou aumento da mortalidade, quando comparado ao grupo controle porém, esta diferença não foi estatisticamente significativa.

Por ser uma droga imunossupressora para linfócitos T, quando administrada em altas doses, resolvemos verificar se os animais estavam apresentando algum sinal de imunossupressão mesmo com doses baixas. Por esta razão resolvemos também investigar a sua ação sobre a carga parasitária no animal. Sabemos que os animais na fase crônica apresentam uma parasitemia sub-patente ou escassa. O efeito da ciclofosfamida poderia atuar no sentido de reativar a parasitemia fazendo com que o número de parasitos circulantes

pudesse aumentar e, desta forma, distorcer os nossos resultados. Neste caso, a explicação para a reativação das lesões poderia ser exclusivamente devida ao aumento do número de parasitos circulantes e nos tecidos. No entanto, observamos que o tratamento com baixas doses não aumentou a parasitemia nos animais da fase crônica, a mesma estava sub-patente e continuou assim até 30 dias depois de finalizado o tratamento. Quanto ao parasitismo dos tecidos foi visto que também não houve aumento na quantidade de ninhos parasitários, fato revelado pela análise histopatológica e por imuno-histoquímica.

No que diz respeito à quantidade de anticorpos totais presentes no soro dos animais, verificamos que a ciclofosfamida em baixas doses não alterou a resposta humoral, concordando com trabalhos anteriores (ASKENASE *et al*, 1975), onde foi visto que doses baixas de ciclofosfamida têm capacidade de aumentar reações de hipersensibilidade tardia sem interferir na resposta mediada por anticorpos.

A hipersensibilidade tardia tem sido demonstrada como sendo o mecanismo responsável pela patogenia das lesões da fase crônica da doença de Chagas (DOS REIS, 1997). Um dos métodos para se avaliar este tipo de resposta imunológica é através do teste cutâneo, pela injeção de antígeno do *T. cruzi*. Além da medida das patas injetadas com o antígeno específico, o estudo histopatológico pode fornecer mais um indício sobre a resposta inflamatória que ocorre. No nosso modelo experimental todos os animais mostraram positividade do teste cutâneo, tanto na avaliação da espessura da pata como no estudo histopatológico das mesmas. Esta associação também pode ser observada quando comparamos os grupos experimentais, correlacionando o maior espessamento das patas com aqueles que receberam o tratamento com

ciclofosfamida em baixas doses, os quais mostraram lesões mais intensas, que regrediram com 48 horas de injeção do antígeno. Em alguns casos foi vista uma intensa miosite aguda na camada muscular abaixo da derme. Esta reação continha denso infiltrado polimorfonuclear e supostamente decorreu da injeção profunda do antígeno, ultrapassando os limites da derme e estava presente apenas nos camundongos cronicamente infectados (tratados e não tratados) e ausente nos controles não infectados. O sucesso em se obter uma correlação entre o estudo histopatológico e a avaliação do espessamento da pata pode ajudar no entendimento do que ocorre com o teste cutâneo em animais submetidos ao tratamento com ciclofosfamida em baixas doses. SCOTT (1981) sugeriu a possibilidade de existência de fatores supressores da hipersensibilidade tardia na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*. Deste modo, nesta fase da doença esta reação seria ausente ou muito escassa. Entretanto nossos resultados mostram que existem lesões típicas que se enquadram neste perfil de resposta.

No presente trabalho podemos sugerir que a ciclofosfamida em baixas doses aumentou a intensidade das lesões nos camundongos. Os resultados indicam que não foi devido a uma imunossupressão das respostas celular e humoral. Além de testes cutâneos positivos, os títulos de anticorpos em ambos os grupos permaneceram normais e a contagem dos leucócitos circulantes não mostrou nenhuma alteração estatisticamente significativa. Também foi visto nos tecidos que a quantidade de parasitos marcados por imunohistoquímica não se alterou, permanecendo um escasso parasitismo com raros ninhos de amastigotas em miócitos cardíacos.

A reação imunológica foi evidenciada pela presença de células T CD4 e CD8 com predomínio das células CD8 em ambos os grupos. Nos animais tratados com ciclofosfamida foi visto nítido aumento dos linfócitos T CD8 em relação aos CD4. Não houve, entretanto, uma significativa alteração no número de células T CD4 entre os crônicos tratados e os não tratados.

Uma provável explicação para a exacerbação das lesões estaria nas modificações das populações celulares, tanto nos infiltrados inflamatórios quanto nos órgãos linfóides. Através do estudo imunohistoquímico pudemos observar que no baço, conforme dito anteriormente, as células em ativação recente estão aumentadas em número naquele grupo tratado com ciclofosfamida, e que esta diferença foi estatisticamente significativa. A quantificação dos linfócitos TCD4 e CD8 ajudou a esclarecer o perfil de resposta inflamatória uma vez que a modificação da razão destes dois marcadores pode interferir no processo patogênico que ocorre tanto no músculo esquelético quanto no miocárdio. Muitos autores investigaram o tipo de linfócitos envolvidos nas lesões tissulares na fase crônica da infecção. MINOPRIO *et al* (1987) e RIBEIRO DOS SANTOS (1990) mostraram que o principal tipo celular envolvido é a célula T CD4. Os nossos resultados demonstraram que a densidade de linfócitos presentes na fase crônica da infecção é predominantemente de linfócitos T CD8 tanto no grupo tratado com ciclofosfamida em baixas doses quanto naqueles não tratados. Tal resultado está de acordo com TARLETON (1995) que demonstrou que estas células predominam sobre as células CD4, perfazendo um total de aproximadamente 90%. Sabe-se que as células TCD8+ tem um papel citotóxico, atuando na lise de células e que a

sua população aumentada poderia explicar o aumento dos infiltrados inflamatórios nestes animais.

O presente trabalho permitiu demonstrar, no modelo do camundongo, uma evolução em curto prazo de lesões inflamatórias crônicas pela infecção com o *T. cruzi*, que eram na sua maioria discretas ou moderadas para lesões mais intensas, nos animais tratados com ciclofosfamida em baixas doses. Isto foi demonstrado quantitativamente pelo estudo morfométrico dos infiltrados inflamatórios e histopatologicamente, pela presença de lesões focais necrótico-inflamatórias mais freqüentes nos animais tratados. Além disto a evidencia de um mecanismo de resposta celular exacerbada ficou patente pela positividade do teste cutâneo da pata mensurado pela medida da reação e pela expressão da histopatologia das lesões focais infiltrativas, perivasculares, e intersticiais intradérmicas.

SCHWARTZ *et al* (1978), discutiram em seu artigo que as reações de hipersensibilidade tardia reconhecidamente envolvidas na patogenia da doença, são reguladas por sub-populações de células do sistema imune. Na ocasião esta regulação era atribuída à presença de células T supressoras que estariam ligadas à supressão da reação de hipersensibilidade tardia (SCOTT, 1981). Atualmente foram descritas as células T regulatórias (TREG) que expressam marcadores de superfície CD4+ CD25+ (SHEVACH, 2001). A atuação da ciclofosfamida em baixas doses, sobre este sistema experimental não está muito claro. É possível que as células T regulatórias sejam sensíveis às baixas doses havendo uma diminuição na sua quantidade, conforme visto por LUTSIK *et al* (2005), onde foi visto que uma única dose de 2mg/ml era capaz de induzir apoptose de células

regulatórias em camundongos. Desta forma a sua regulação sobre os mecanismos de hipersensibilidade tardia ficariam comprometidos.

O importante papel destas células pode ser evidenciado em outros modelos experimentais. SAKAGUCHI *et al* (1995), mostraram que as células T regulatórias têm a propriedade de promover a manutenção de tolerância a antígenos próprios e que a sua depleção esta relacionada com o aparecimento de doenças auto-imunes em modelos animais. O papel das células regulatórias também foi verificado no presente trabalho. Vimos que o tratamento com ciclofosfamida em baixas doses aumentou no baço a quantidade de células que expressavam CD25 em sua superfície, o que significa que a ativação de linfócitos esta aumentada neste grupo quando comparado ao controle infectado não tratado. O aumento da quantidade de células CD25 pode parecer um resultado paradoxal, uma vez que na hipótese inicial estas células estariam diminuídas nos animais tratados com ciclofosfamida em baixas doses. Por outro lado, quando o marcador CD25 é estudado sozinho, sem a co-expressão com CD4 não podemos avaliar sobre o seu papel regulador do sistema imune. Para esclarecer esta dúvida o estudo de uma co-expressão de CD4 com CD25 é fundamental para o presente trabalho. O marcador CD25 está presente tanto em células T CD4 como em T CD8. Na sub-população de linfócitos TCD4 estas células compõem aproximadamente 10%, o que mostra que as células CD4+CD25+ são uma sub-população minoritária dentro dos linfócitos CD4. O aumento de CD25 visto no nosso trabalho pode ser atribuído a um aumento dentro da subpopulação de linfócitos T CD8, já que vimos que estas células aumentaram em quantidade no nosso estudo.

O papel das células T regulatórias foi considerado no presente trabalho como importante fator na disrepressão da resposta imunológica, pois, foi constatado um aumento na quantidade de células em ativação inicial, que expressam marcadores de superfície CD25, no baço dos animais tratados com ciclofosfamida em baixas doses. Novos estudos poderão esclarecer melhor o papel destas células nas lesões tissulares do miocárdio, através da imunomarcação *in situ*, em correlação com as células CD4.

## 8. CONCLUSÕES

7.1 A ciclofosfamida em baixas doses determinou um agravamento das lesões necrótico-inflamatórias do miocárdio em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana do *T. cruzi*.

7.2 O tratamento com ciclofosfamida em baixas doses determinou significativo aumento das células inflamatórias do miocárdio, avaliadas pelo método morfométrico.

7.3 O infiltrado inflamatório no miocárdio dos camundongos cronicamente infectados apresenta linfócitos T CD4 e TCD8, com predomínio dos linfócitos TCD8.

7.4 O tratamento com ciclofosfamida em baixas doses determinou aumento significativo do número de células TCD8.

7.5 O tratamento com ciclofosfamida determinou aumento significativo do número de células T (CD25) no baço, indicando maior ativação inicial das mesmas.

7.6 Houve uma intensificação da reação de hipersensibilidade tardia evidenciada pelo teste cutâneo expressa pela medida da espessura da pata e pela análise histopatológica.

7.7 O tratamento com ciclofosfamida em baixas doses não alterou a resposta humoral, com manutenção dos títulos de anticorpos específicos em todos os grupos.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H.; POBER, J.S. **Imunologia Celular e Molecular**.

In: \_\_\_\_\_. **Mecanismos Efetores das Reações Imunes Mediadas por Células T**.  
3.ed. Rio de Janeiro. Revinter, 2002. cap. 3, p. 285-303.

ALVES, M.J. Members of the Tc-85 protein family from *Trypanosoma cruzi* are  
adhesion proteins. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, **29**: 831-3. 1996.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, V.; SADIGURSKY, M. Damage and healing in the  
conduction tissue of the heart (An experimental study in dogs infected with *T. cruzi*..  
**J. Pathol.**, **143**: 93-101. 1984.

ANDRADE, S.G.; SILVA, R.C.; SANTIAGO, C.M.G.; ANDRADE, Z.A. Acute  
invasive-destructive myositis in *Trypanosoma cruzi* infected mice subjected to  
intradermal test. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **86**: 219, 1991b. Suplemento I.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemes and Zimodemes of *Trypanosoma*  
*cruzi* strains; Correlations with clinical data and experimental Pathology. **Rev. Soc.**  
**Bras. Med.Trop.**, **30**: 27-35 , 1997.

ANDRADE, S.G.; PIMENTEL, A.R.; ANDRADE, Z.A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **63**: 64-70, 2000.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M.; MAGUIRE, J.H. Experimental Chagas' disease in dogs: A pathologic and ECG study of chronic indeterminate phase of the infection. **Arch. Pathol. Lab. Med.**, **105**:450-464, 1981.

ANDRADE, Z.A. The canine model of Chagas' disease. **Mem. Instituto Oswaldo Cruz.**, **79** : 77-83, 1984. Suplemento I.

ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic *T.cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of Cyclophosphamide. **Amer. J. Pathol.**, **127**: 467-473, 1987.

ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of Chagas' disease. **Res. Immunol.**, **142**: 126-129, 1991.

ANDRADE, Z.A, SILVA, H.R. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, **90**: 521. 1995.

ANDRADE, Z.A.; Yu, Z.X, ANDRADE, S.G.; TAKEDA, K.; ZHANG, J.; SADIGURSKY, M.; FERRANS, V.J . Apoptosis in a canine model of acute chagasic myocarditis. **J. Mol. Cardiol.**, **31**: 581-596, 1999.

ARDAVIN, C.; MARTINEZ DEL HOYO, G.; MARTIN, P.; ANJUERE, F.; ARIAS, C.F.; MARIN, A.R.; RUIZ, S.; PARRILLAS, V.; HERNANDEZ, H. Origin and differentiation of dendritic cells. **Trends Immunol.**, **22**: 691-700, 2001.

ARGOV, S, JAFFE, C.L.; KRUPP, M.; SLOR, H.; SHOENFELD, Y. Autoantibody production by patients infected with *Leishmania*. **Clin. Exp. Immunol.** **76**:190-7, 1989.

ARNOLD, H.; BOURSEAUX, F.; BROCK, N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat. **Nature.**, 181:931, 1958.

ASKENASE, P.W.; HAYDEN, B.J.; GERSON, R.K. 1975. Augmentation of delayed type hypersensitivity by doses of Cyclophosphamide wich does not affect antibody response. **J. Exp. Med.** **141**: 697-702.

BANCHEREAU, J.; STEINMAN, R.M. Dendritic cells and the control of immunity. **Nature.** **392** : 245-52, 1998.

BARDOS, T.J.; CHMIELEWICZ, Z.F.; HEBBORN, P. Structure-activity relationships of alkylating agents in cancer chemotherapy. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, **163**, 1006-1025, 1969.

BLANK, C.; FUCHS, H.; RAPPERSBERGER, K.; ROLLINGHOFF, M.; MOLL, H. Parasitism of epidermal Langerhans cells in experimental cutaneous leishmaniasis with *Leishmania major*. **J. Infect. Dis.** **167**: 418-25, 1993.

BORDA, E.P.; COSSIO, P.; VEJA, M.V.; ARANA, R.; STERIN-BORDA, L. A circulating IgG in Chagas disease which binds to  $\beta$ -adrenoreceptors of myocardium and modulates their activity. **Clin. Exp. Immunol.** **57**: 679-686, 1984.

BOSCHETTI, M.A.; PIRAS, M.M.; HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R. The interaction of a *Trypanosoma cruzi* surface protein with Vero cells and its relationship with parasite adhesion. **Mol. Biochem. Parasitol.** ;**24**: 175-84. 1987.

BRIONES, M.R.; SOUTO, R.P.; STOLF, B.S.; ZINGALES, B. The evolution of two *Trypanosoma cruzi* subgroups inferred from rRNA genes can be correlated with the interchange of American mammalian faunas in the Cenozoic and has implications to pathogenicity and host specificity. **Mol. Biochem. Parasitol.** **104**: 219-32. 1999.

CABRINE-SANTOS, M.; DOS SANTOS, V.M.; DE LIMA, M.A.; DE ABREU, M.E, LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E. Genitourinary changes in hamsters infected and reinfected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **98:** 523-8, 2003.

CEDERBOM, L.; HALL, H.; IVARS, F. CD4+CD25+ regulatory T cells down-regulate co-stimulatory molecules on antigen-presenting cells. **Eur. J. Immunol.** **30:**1538-43, 2000.

COSTA, P.C.; FORTES, F.S.; MACHADO, A.B.; ALMEIDA, N.A.; OLIVARES, E.L.; CABRAL, P.R.; PEDROSA, R.C.; GOLDENBERG, R.C.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A.C.; MASUDA, M.O. Sera from chronic chagasic patients depress cardiac electrogenesis and conduction. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **33:** 439-446, 2000.

CRISPIN, J.C.; VARGAS M.I.; ALCOCER-VARELA A. Immunoregulatory T cells in autoimmunity. **Autoimmunity Reviews** **3:** 45-51, 2004.

CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **92:**3541-5,995.

CUNHA-NETO, E.; COELHO, V.; GUILHERME, L.; FIORELLI, A.; STOLF, N.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J. Clin. Invest.** **98**:1709-12, 1996.

DANIEL-RIBEIRO, C.T.; ZANINI G. Autoimmunity and malaria: what are they doing together? **Acta Trop.** **76**: 205-221, 2000.

DE OLIVEIRA, S.F.; PEDROSA, R.C.; NASCIMENTO, J.H.; CAMPOS, CARVALHO, A.C.; MASUDA, M.O. Sera from chronic chagasic patients with complex cardiac arrhythmias depress electrogenesis and conduction in isolated rabbit hearts. **Circulation.** **96**: 2031-7, 1997.

DIAS, J.C.P.; COURA, J.R. Epidemiologia. In: DIAS, J.C.P.; COURA, J.R (org.) Clínica e Terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem prática para o clínico geral. **FIOCRUZ**, 1997. p. 33-66.

ENGMAN, D.M.; LEON, J.S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Trop.** **81**: 123-32. 2002.

HAAG, J.; O'HUIGIN, C.; OVERATH, P. The molecular phylogeny of trypanosomes: evidence for an early divergence of the Salivaria. **Mol. Biochem. Parasitol.** **91**: 37-49. 1998.

HEATH, W.R.; CARBONE, F.R. Cross-presentation in viral immunity and self-tolerance. **Nat. Rev. Immunol.** **1**:126-34, 2001.

HIGUCHI, M. L. Endomyocardial biopsy in Chagas' heart disease: pathogenetic contributions. **Rev. Paul. Med.** **113**: 821-825, 1995.

HOARE, C.A. **The Trypanosomes of mammals**. Blackwell, Oxford. 1972.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. SAID, G.; MILON, G.; MARCHAL, G.; EISEN, H. L3T4+ T cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. **Eur. J. Immunol.** **17**: 1027-33, 1987.

HONTEBEYRIE – JOSKOWICZ, M. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role of Th2 cells in the immunopathology of chronic infection. **Res. Immunol.** **142**: 141-143, 1991.

ITANO, A.A.; MCSORLEY, S.J.; REINHARDT, R.L.; EHST, B.D.; INGULLI, E.; RUDENSKY, A.Y.; MARC, K.J. Distinct Dendritic Cell Populations Sequentially

Present Antigen to CD4 T Cells and Stimulate Different Aspects of Cell-Mediated Immunity. **Immunity** **19**: 47-57, 2003.

JOHANSON, D.C.; TAIEB, M. Plio--Pleistocene hominid discoveries in Hadar, Ethiopia. **Nature** **260**: 293-7. 1976.

JUNG, S.; UNUTMAZ, D.; WONG, P.; SANO, G.; DE LOS SANTOS, K.; SPARWASSER, T.; W.U.S.; VUTHOORI, S.; KO K.; ZAVALA, F.; PAMER, E.G.; LITTMAN, D.R.; LANG, R.A. In vivo depletion of CD11c(+) dendritic cells abrogates priming of CD8(+) T cells by exogenous cell-associated antigens. **Immunity** **17**: 211-20, 2002.

KAPLAN, D.; FERRARI, I.; BERGAMI, P.L.; MAHLER, E.; LEVITUS, G.; CHIALE, P.; HOEBEKE, J.; VAN REGENMORTEL, M.H.; LEVIN, M. J. Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. **Proc. Natl. Acad. Sci.** **94**: 10301-6, 1997.

KIERSZENBAUM, F. Chagas disease and the autoimmunity hypothesis. **Clin. Microbiol. Rev.** **210**: 23, 1999.

KOBAYASHI, K.; KANEDA, K.; KASAMA, T. Immunopathogenesis of delayed-type hypersensitivity. **Microsc. Res. Tech.** **53**: 241-5, 2001.

KOBERLE, F. Cardiopatia chagásica. **Hospital 53**: 311-346, 1958.

LARANJA, F.S. Clinical aspects of Chagas' disease. **Rev. Bras. Med.10**: 482-91, 1953.

LENZI, H.L.; CASTELO-BRANCO, M.T.; PELAJO-MACHADO, M. OLIVEIRA, D.N.; GATTASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: compromise of reproductive system in acute murine infection. **Acta Trop. 71**: 117-29. 1998.

LEON, J. S.; ENGMAN, D.M. Autoimmunity in Chagas heart disease. **Int. J. Parasitol. 31**: 554-560, 2001.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; ALMEIDA, H.O.; ROCHA, A. Contribuição ao estudo da anatomia patológica dos corações de chagásicos falecidos subitamente. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop 9**: 269-282, 1975.

LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E.; ANDRADE, Z.A. Anatomia patológica do coração em chagásicos assintomáticos falecidos de modo violento. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 76**:189-197, 1981.

LUTSIK, M.E.; SEMNANI, R.T.; DE PASCALIS R.; KASHMIRI, S.V.; SCHLOM, J. SABZEVARI, H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. **Blood. 105**: 2862-8, 2005.

MADY, C.; PEREIRA-BARRETTO, A.C.; LANNI, B.M.; LOPES, E.A.; PILEGGI, F.  
Right ventricular endomyocardial biopsy in undetermined form of Chagas disease.  
**Angiology** **35**: 755-759. 1984.

MAGUIRE, H.C. Jr.; ETTORE, V.L. Enhancement of dinitrochlorobenzene (DNCB)  
contact sensitization by cyclophosphamide in the guinea pig. **J Invest**  
**Dermatol.**; **48**: 39-43, 1967

MAZZA, S.; FREIRE, R.; URCELAY, G.; MIYARA, S.; BASSO, G.; BASSO, R.  
CONTE D. Chagomas. **Publicaciones MEPRA**. **46**, 1940.

MCCORMICK , T.S.; ROWLAND, E.C. *Trypanosoma cruzi*: cross-reactive anti-  
heart autoantibodies produced during infection in mice. **Exp. Parasitol.** **69**: 393-  
401, 1989.

MINOPRIO, P.; EISEN, H.; JOSKOWICZ, M.; PEREIRA, P.; COUTINHO, A.  
Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* infected mice  
be treatment with anti-L3T4 antibodies. **J. Immunol.** **139**: 545-550, 1987.

MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S.; COUTINHO, A.  
1989. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the p[redominance of

parasite-monoespecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol. Rev.** **112**: 183-207.

MURATA, M.; SUZUKI, T.; MIDORIKAWA, K.; SHINJI, OIKAWA.; SHOSUKE KAWANISHI. Oxidative DNA damage induced by a hydroperoxide derivative of cyclophosphamide. **Free Radical Biology & Medicine**, **37**: 793 - 802, 2004.

RASSI, A.; RASSI, Jr. A.; RASSI, G.G. *Trypanosoma cruzi e a Doença de Chagas*. In: Bener, Andrade.; Barral-Netto. Fase aguda. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000.

ROMAÑA, C. Acerca de um sintoma inicial de valor para el diagnostico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanófica unilateral (Hipotesis sobre la puerta de entrada conjuntival de la enfermedad). **Publicaciones MEPRA 22**: 16-28. 1935.

ROMANHA, C.; TERRACINI, E. Compartimiento de las infecciones de lauchas por *S. cruzi*, según la concentración de parasitos inoculados. (infecciones crónicas iniciales). **An. Inst. Med. Reg. 1**: 141-164, 1945.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R; LAUS, JI; MENGEL, JO & SAVINO, W. Chronic chagasic cardiopathy: role of CD4 T cells in the anti-heart autoreactivity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **85**: 367-369, 1990.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MENGEL, J. O.; POSTOL, E. ; SOARES, R. A. O. ; FERREIRA, E. F. ; SOARES, M. B. P. ; PONTES-DE-CARVALHO, L. C. . A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Paras. Immun.**, **23**: 93-101, 2001.

RIZZO, L.V.; CUNHA-NETO, E.; TEIXEIRA, A.R. Autoimmunity in Chagas' disease: specific inhibition of reactivity of CD4+ T cells against myosin in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** **57**: 2640-4, 1989.

ROTHHAMMER, F.; ALLISON, M.J.; NUNEZ, L.; STANDEN, V.; ARRIAZA, B. Chagas' disease in pre-Columbian South America. **Am. J. Phys. Anthropol.** **68**: 495-8. 1985

SADIGURSKY, M.; ACOSTA, A.M.; SANTOS, BUCH C.A. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **31**: 934-941. 1982.

SAKAGUCHI, S. N.; SAKAGUCHI, M.; ASANO, M.; ITOH, M. TODA. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. **J. Immunol.** **155**:1151-1164, 1995.

SANTOS, R. R.; MARQUEZ, J.O.; VON GAL, FURTADO, C.C.; RAMOS DE OLIVEIRA, J.C.; MARTINS, A.R.; KÖBERLE, F. . Antibodies against neurons in chronic Chagas'disease. **Tropmed. Parasit.**, **30**: 19-23, 1979.

SCHWARTZ, A.; ASKENASE, P.W.; GERSHON, R.K. Regulation of delayed type hypersensitivity reactions by Cyclophosphamide-sensitive T cells. **J. Immunol.** **121**: 1573-1577, 1978.

SHAND, F.L. The immunopharmacology of cyclophosphamide. **Int J Immunopharmacol.**, **1**:165-71, 1979.

SHEVACH, E.M. Certified professionals: CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> suppressor T cells. **J. Exp. Med.**, **193**: F41–F46, 2001.

SOARES, M.B.P.; PONTES-DE-CARVALHO, L.C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. de Ciênc.**, 2001.

STEINMAN, R.M.; COHN, Z.A. Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution. **J. Exp. Med.** **1**: 1142-62 , 1973.

STEINMAN, R.M. Dendritic cells. In: Paul, W.E. (ed.). **Fundamental Immunology**, 4.ed. Lippincott-Raven, 1999. p. 547-573.

STERIN-BORDA, L.; GORELIK, G.; BORDA, E.S. Chagasic IgG binding with cardiac muscarinic cholinergic receptors modifies cholinergic-mediated cellular transmembrane signals. **Clin. Immunol. Immunopathol.** **61**: 387-397, 1991.

STEVENS, J.R.; NOYES, H.A.; DOVER, G.A.; GIBSON, W.C. The ancient and divergent origins of the human pathogenic trypanosomes, *Trypanosoma brucei* and *T. cruzi*. **Parasitology**, **118**: 1999.

TAFURI, W.L. Immunopathology of Chagas disease – A historical Overview. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**: 247-248, 1999. Suplemento I.

TAKIGAWA, M.; IWATSUKI, K.; YAMADA, M.; OKAMOTO, H.; IMAMURA, S. The Langerhans cell granule is an adsorptive endocytic organelle. **J. Invest. Dermatol.** **85**: 12-5, 1985.

TARLETON, R.L. The role of T cell subpopulations in experimental Chagas' disease. **Res. Immunol.** **142**: 130-133, 1991.

TARLETON, R. I. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol. Today.** **11**: 7-9, 1995.

TURK, J.L.; PARKER, D.; POULTER, L.W. Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. **Immunology.** **23**: 493-501, 1972.

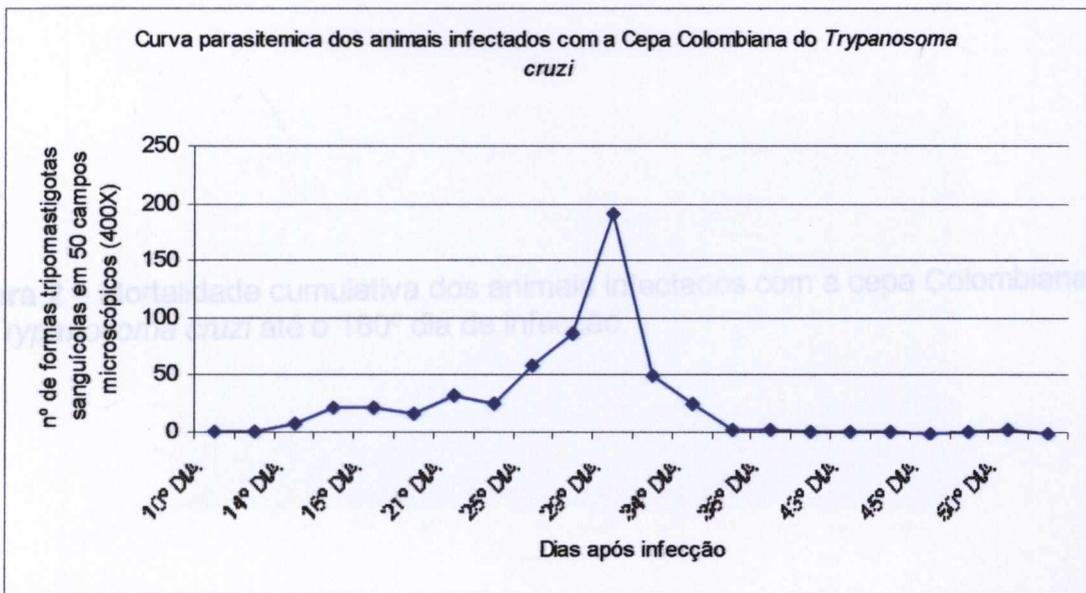
VAN VOORHIS, W.C.; EISEN, H. FI-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. **J. Exp. Med.** **169**: 641-52, 1989.

VILLELA, E. Elementos do sistema nervoso central parasitados *pele Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**

# **Figuras e tabelas**

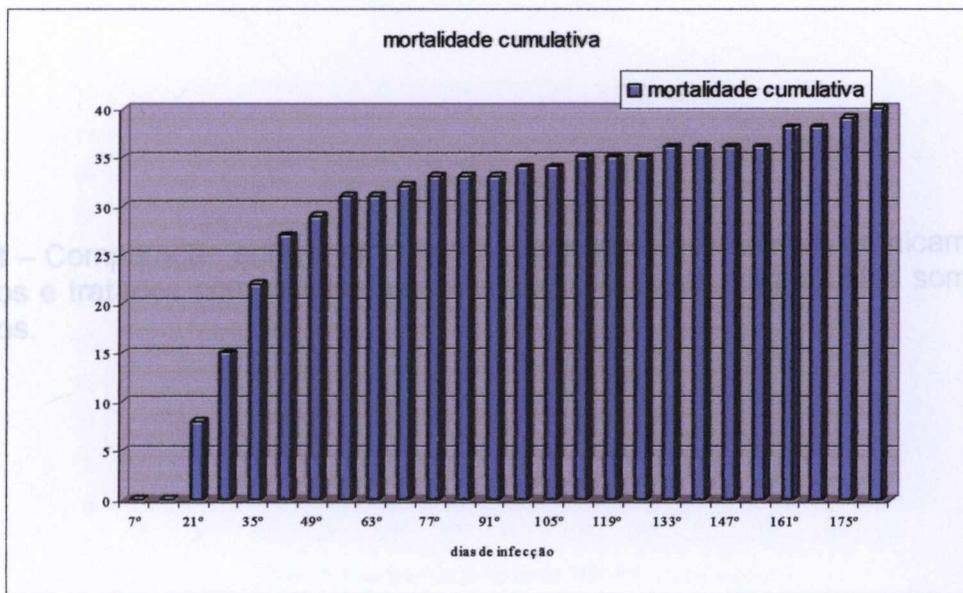
**Figura 1** – Curva parasitêmica da fase aguda da infecção pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*.

FIGURA 1



**Figura 2** – Mortalidade cumulativa dos animais infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* até o 180º dia de infecção.

FIGURA 2



**Figura 3** – Comparação entre a mortalidade cumulativa dos animais cronicamente infectados e tratados com ciclofosfamida em baixas doses com aqueles somente infectados.

**FIGURA 3**

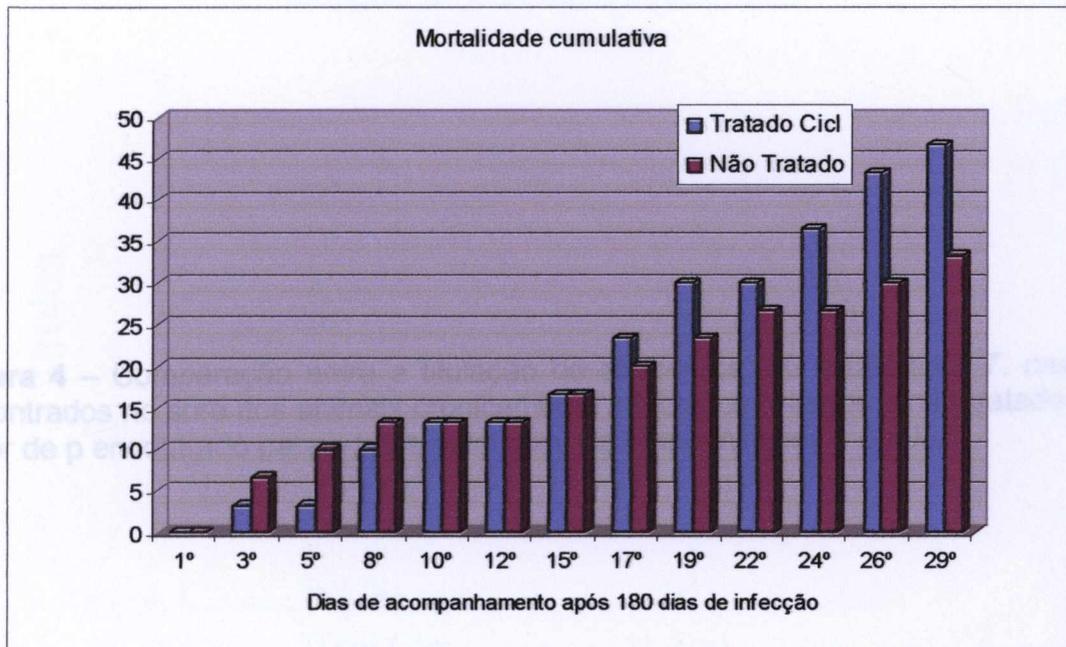
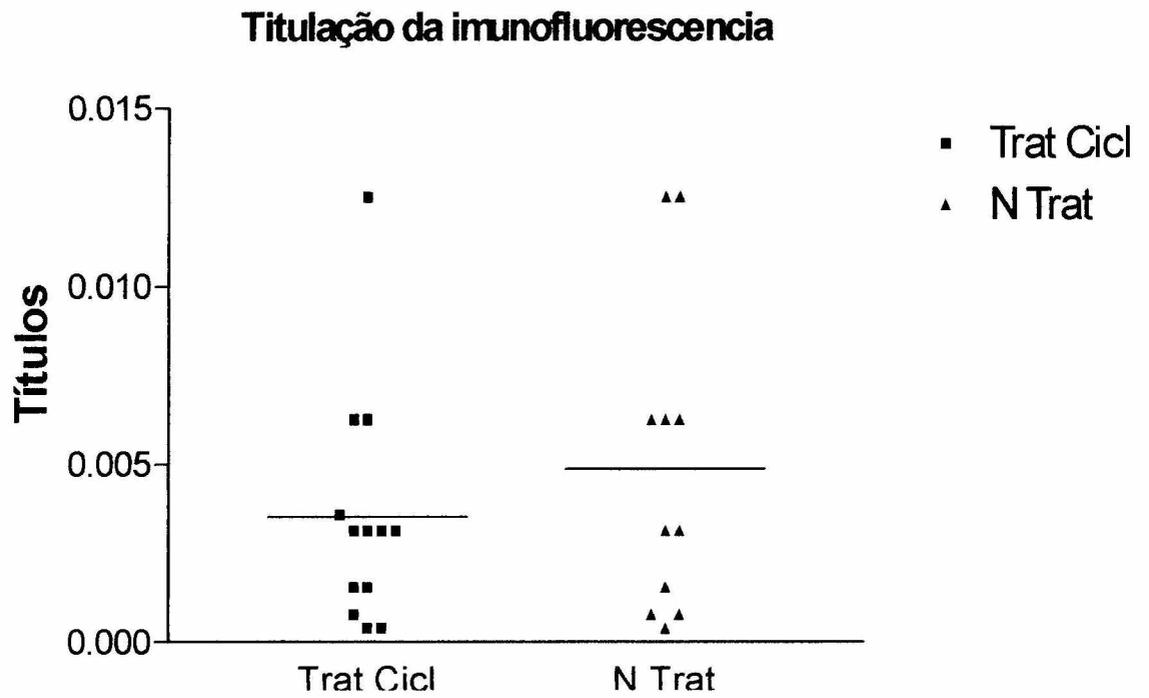


Figura 4 –  
encontrados  
Valor de p e

**Figura 4** – Comparação entre a titulação de anticorpos IgG totais anti- *T. cruzi* encontrados no soro dos animais cronicamente infectados tratados e não tratados. Valor de p encontrado para o teste estatístico de Mann-Whitney = 0,5052

FIGURA 4



**Figura 5** – Comparação entre a média da espessura da pata injetada com antígeno de *T. cruzi* 24 horas após finalização do tratamento. São comparados os grupos cronicamente infectados e tratados com ciclofosfamida em baixas doses com aqueles somente infectados

**Figura 6** – Comparação entre a média da espessura da pata injetada com antígeno de *T. cruzi* 15 dias após finalização do tratamento. São comparados os grupos cronicamente infectados e tratados com ciclofosfamida em baixas doses com aqueles somente infectados

FIGURA 5 – Comparação das médias de espessura das patas de animais cronicamente infectados logo após término do tratamento.

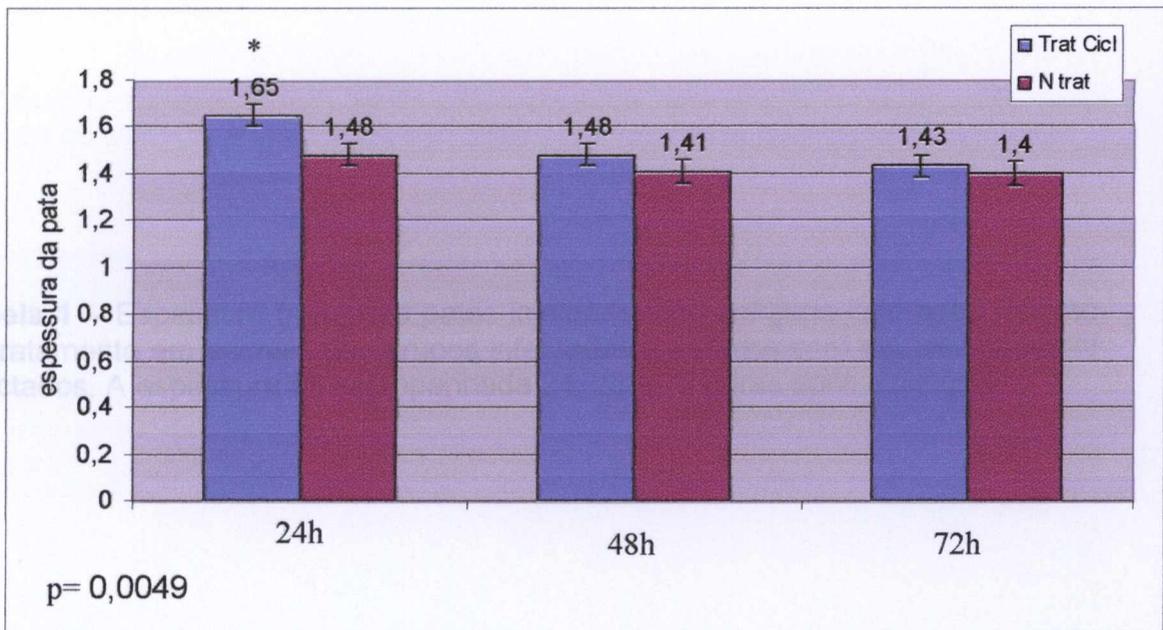
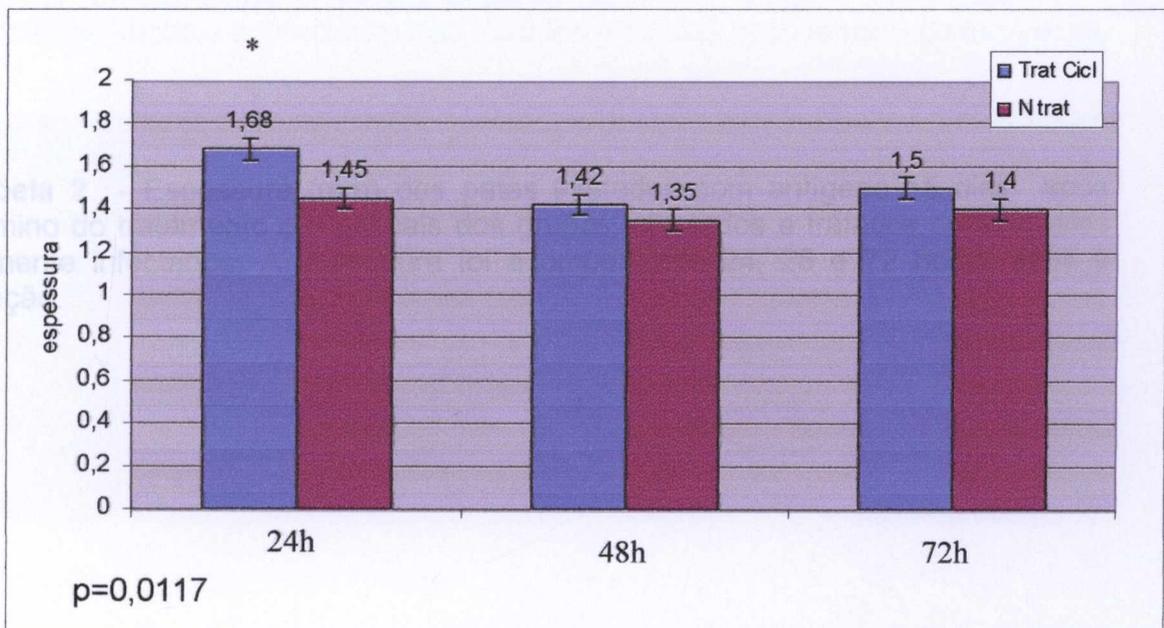


FIGURA 6 - Comparação das médias de espessura das patas de animais cronicamente infectados 15 dias após término do tratamento



**Tabela 1** - Espessura (mm) das patas injetadas com antígeno logo após término do tratamento em animais dos grupos infectados e tratados com aqueles somente infectados. A espessura foi acompanhada 24, 28 e 72 horas após a injeção.

**Tabela 2** - Espessura (mm) das patas injetadas com antígeno 15 dias após término do tratamento em animais dos grupos infectados e tratados com aqueles somente infectados. A espessura foi acompanhada 24, 28 e 72 horas após a injeção.

TABELA 1 - Comparação entre as patas injetadas com antígeno nos grupos infectados tratados e infectados não tratados – logo após término do tratamento

Comparação entre as patas injetadas com antígeno (mm) nos grupos infectados tratados e infectados não tratados – logo após término do tratamento						
	24 horas		48horas		72horas	
	PD trat	PD n Trat	PD trat	PD n Trat	PD trat	PD n Trat
<b>1</b>	1,9	1,6	1,7	1,5	1,6	1,5
<b>2</b>	1,9	1,5	1,5	1,4	1,4	1,4
<b>3</b>	1,6	1,5	1,6	1,45	1,5	1,3
<b>4</b>	1,6	1,45	1,4	1,4		
<b>5</b>	1,7	1,45	1,4	1,3		
<b>6</b>	1,6	1,4				
<b>7</b>	1,6	1,7				
<b>8</b>	1,6	1,3				
<b>Média</b>	1,65	1,48	1,48	1,41	1,43	1,4

A – Controle não tratado, aspecto geral mostrando a derme com infiltrados mononucleares perivasculares; na camada muscular sub-dérmica observa-se

TABELA 2 - Comparação entre as patas injetadas com antígeno nos grupos infectados tratados e infectados não tratados – 15 dias após término do tratamento

Comparação entre as patas injetadas com antígeno (mm) nos grupos infectados tratados e infectados não tratados – 15 dias após término do tratamento						
	24 horas		48horas		72horas	
	PD trat	PD n Trat	PD trat	PD n Trat	PD trat	PD n Trat
<b>1</b>	1,7	1,4	1,6	1,3	1,6	1,6
<b>2</b>	1,9	1,5	1,3	1,4	1,5	1,4
<b>3</b>	1,8	1,5	1,4	1,4	1,4	1,5
<b>4</b>	1,7	1,5	1,4	1,3		
<b>5</b>	1,6	1,4				
<b>6</b>	1,6	1,4				
<b>7</b>	1,5	1,5				
<b>Média</b>	1,68	1,45	1,42	1,35	1,5	1,4

**FIGURA 7** – Aspectos do músculo esquelético da pata , em teste cutâneo pela injeção intradérmica de antígeno do *T. cruzi*, em camundongos com infecção crônica pelo *T. cruzi* (não tratado com ciclofosfamida).

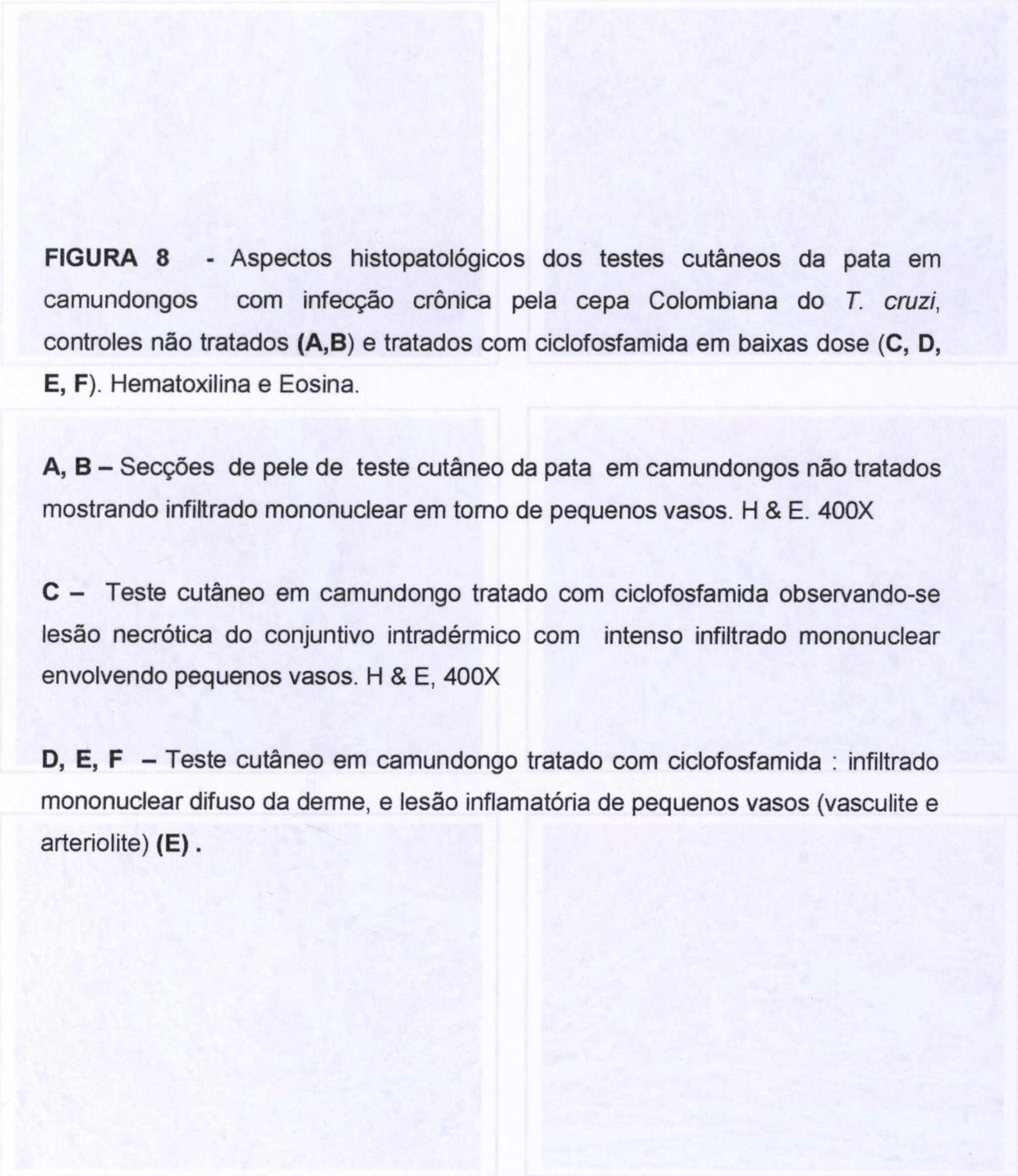
**A** – Controle não tratado , aspecto geral mostrando a derme com infiltrados mononucleares perivasculares; na camada muscular sub-dérmica observa-se intensa miosite, com acúmulo de polimorfonucleares neutrófilos envolvendo o conjuntivo adiposo. H & E, 100X.

**B** - Controle não tratado – Músculo esquelético com o aspecto descrito acima de miosite aguda . H & E, 400X.

**FIGURA 7**



FIGURA 8



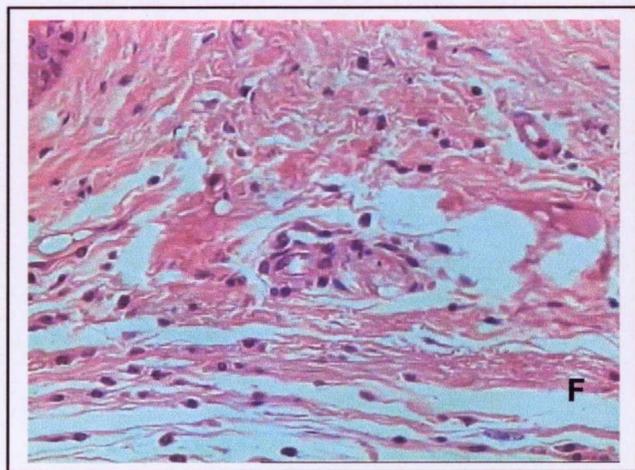
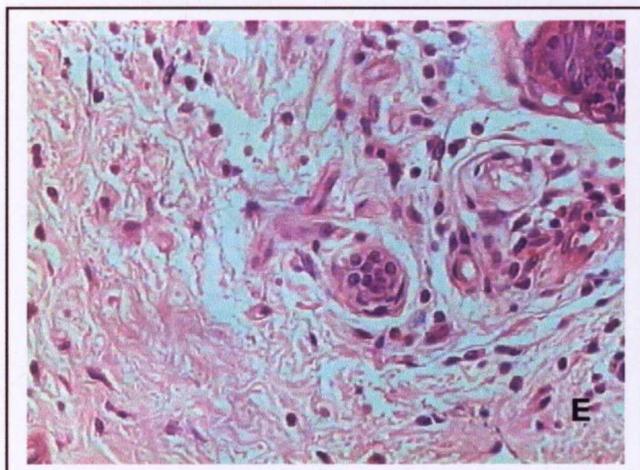
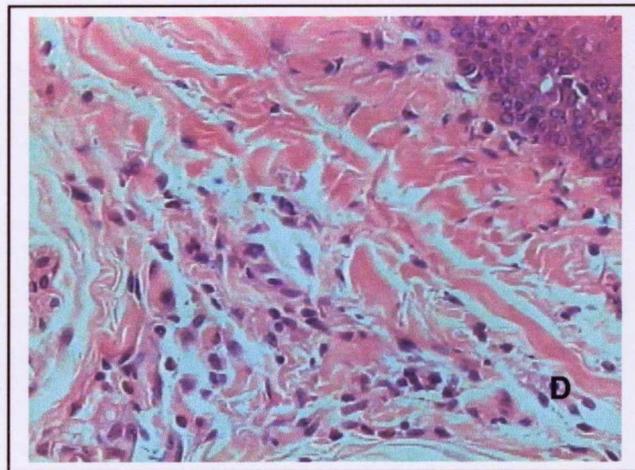
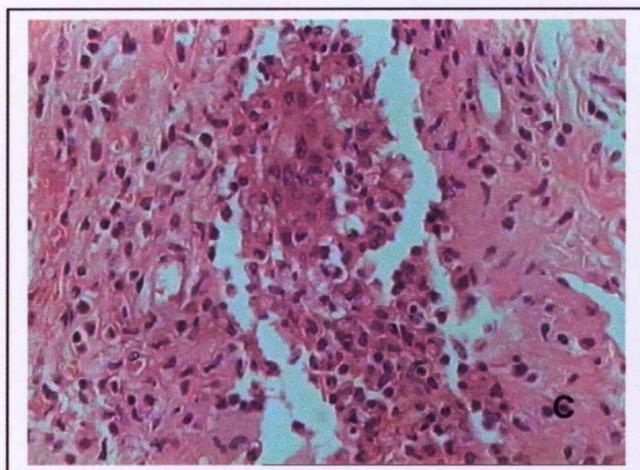
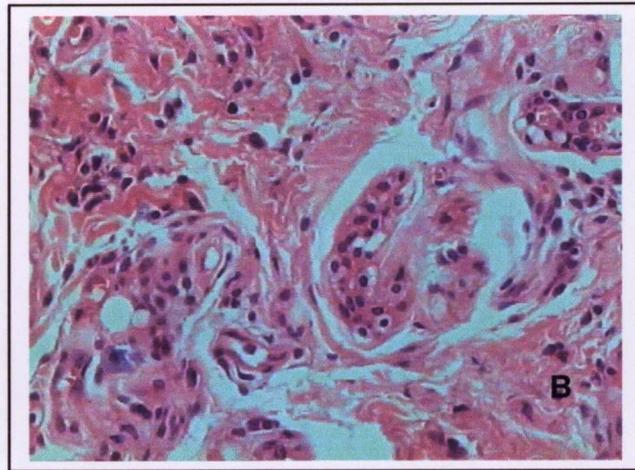
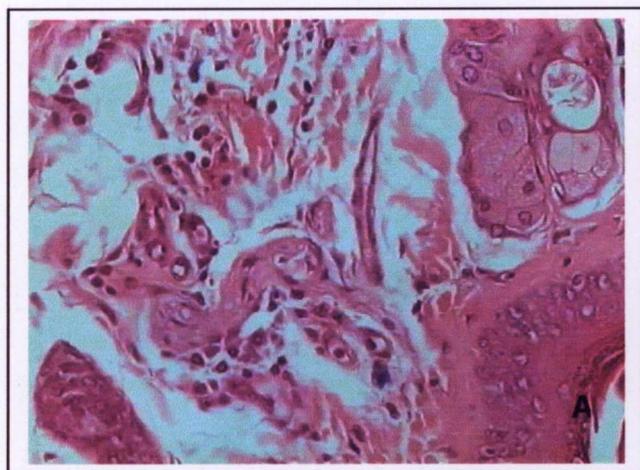
**FIGURA 8** - Aspectos histopatológicos dos testes cutâneos da pata em camundongos com infecção crônica pela cepa Colombiana do *T. cruzi*, controles não tratados (**A,B**) e tratados com ciclofosfamida em baixas dose (**C, D, E, F**). Hematoxilina e Eosina.

**A, B** – Secções de pele de teste cutâneo da pata em camundongos não tratados mostrando infiltrado mononuclear em torno de pequenos vasos. H & E. 400X

**C** – Teste cutâneo em camundongo tratado com ciclofosfamida observando-se lesão necrótica do conjuntivo intradérmico com intenso infiltrado mononuclear envolvendo pequenos vasos. H & E, 400X

**D, E, F** – Teste cutâneo em camundongo tratado com ciclofosfamida : infiltrado mononuclear difuso da derme, e lesão inflamatória de pequenos vasos (vasculite e arteriolite) (**E**) .

**FIGURA 8**



**FIGURA 9** – Lesões do miocárdio em camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*. Controles não tratados.

**A** – Discreta miocardite crônica difusa, com infiltrado mononuclear intersticial com área focal de destruição de miocélulas cardíacas. H & E, 400X.

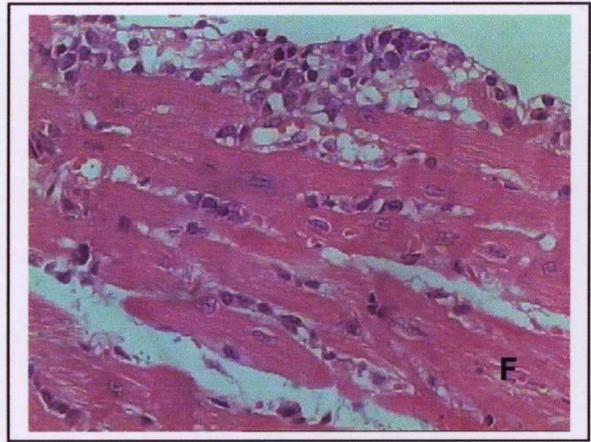
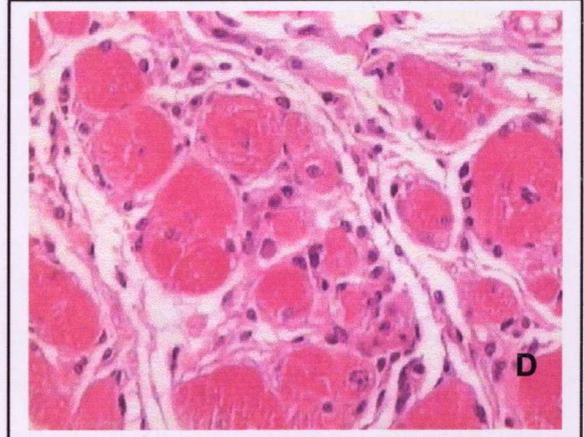
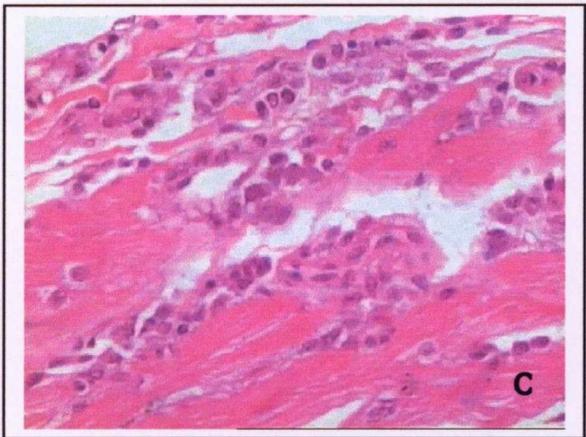
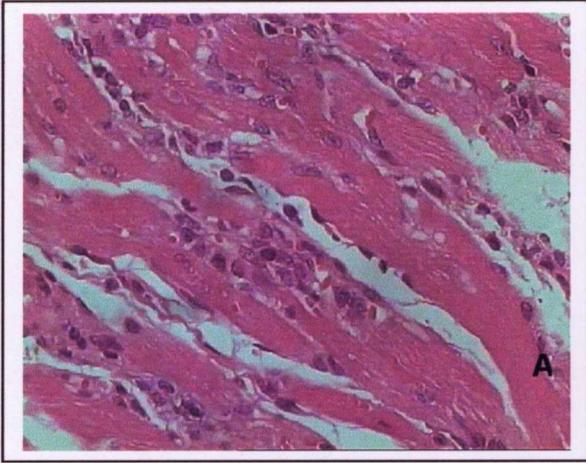
**B, C** – Moderado infiltrado mononuclear subepicárdico com propagação para o miocárdio. Espessamento fibroso discreto da matriz intersticial. H & E, 400X.

**D** – Fibrose intersticial e difuso infiltrado mononuclear do miocárdio . H & E. 400X.

**E** – Necrose focal de miocélulas cardíacas, com infiltração de linfócitos e macrófagos. H & E. 400X.

**F** – Moderado infiltrado mononuclear em epicárdio e no miocárdio, com dissociação das miocélulas cardíacas. H & E. 400X

**FIGURA 9**



**FIGURA 10** – Aspectos histopatológicos do miocárdio de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* tratados com ciclofosfamida em baixas doses.

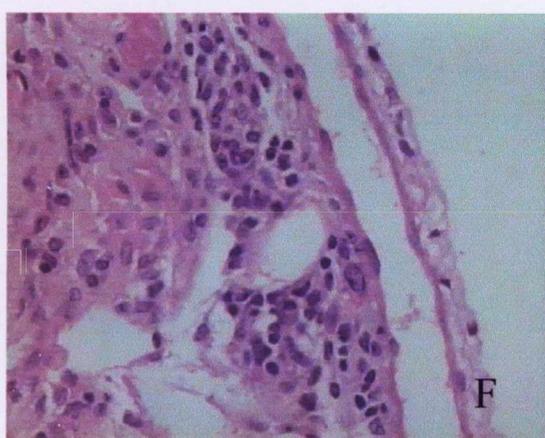
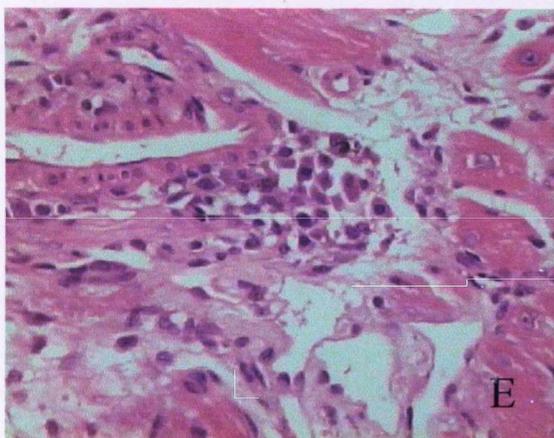
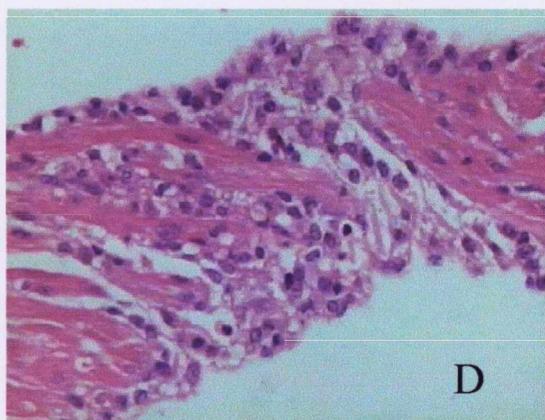
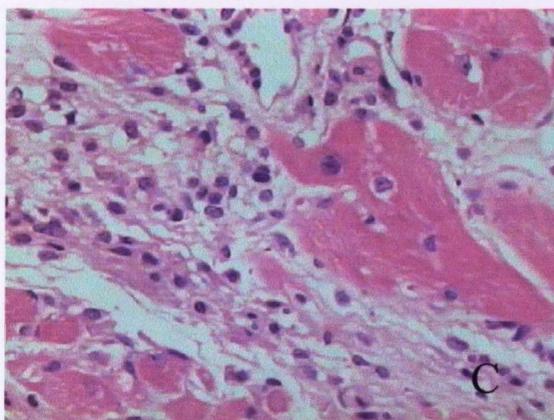
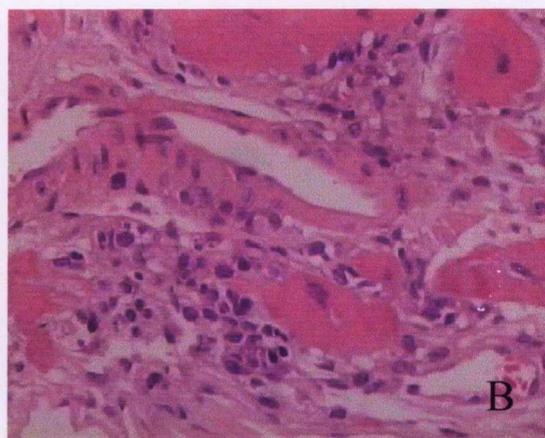
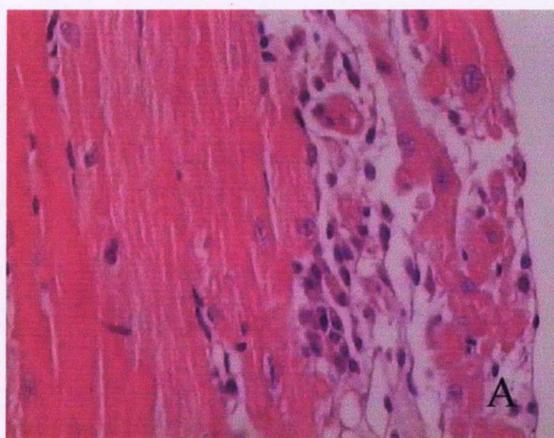
**A, B** –Destruição focal de miócitos e lesões inflamatórias de moderada intensidade no miocárdio, constituídas por infiltrados mononucleares perivascularares e subepicárdicos, com extensão para o miocárdio e fibrose intersticial. H & E. 400X.

**C** - Secções do miocárdio ventricular com extensas áreas de destruição das miocélulas cardíacas com substituição por infiltrados inflamatórios mononucleares e depósito matricial pouco espesso. H & E. 400X.

**D** – Secção de parede atrial com áreas de destruição de miocélulas cardíacas e infiltrados mononucleares focais. H & E. 400X.

**E, F** – Densos infiltrados linfocitários focais no miocárdio, em torno de pequenos vasos e na região sub-epicárdica. H & E. 400X.

FIGURA 10



**Tabela 3:** Distribuição em classes do número de células inflamatórias em cada campo microscópico de tecidos de animais do grupo **crônico tratado com ciclofosfamida** em baixas doses

**Tabela 4:** Distribuição em classes do número de células inflamatórias em cada campo microscópico de tecidos de animais do grupo **crônico não tratado**

TABELA 3 - Distribuição em classes da quantidade de células inflamatórias em 50 campos microscópicos em animais cronicamente infectados tratados com cislofosfamida em baixas doses

Classes	$X_i$	$F_i$	Percentual (%)
44  — 75	59.6	8	16 %
75  — 106	90.7	12	24 %
106  — 137	121.9	9	18 %
137  — 169	153.0	8	16 %
169  — 200	184.1	7	14 %
200  — 231	215.3	5	10 %
231  — 262	246.4	1	2 %
<b>TOTAL</b>		<b>50</b>	<b>100 %</b>

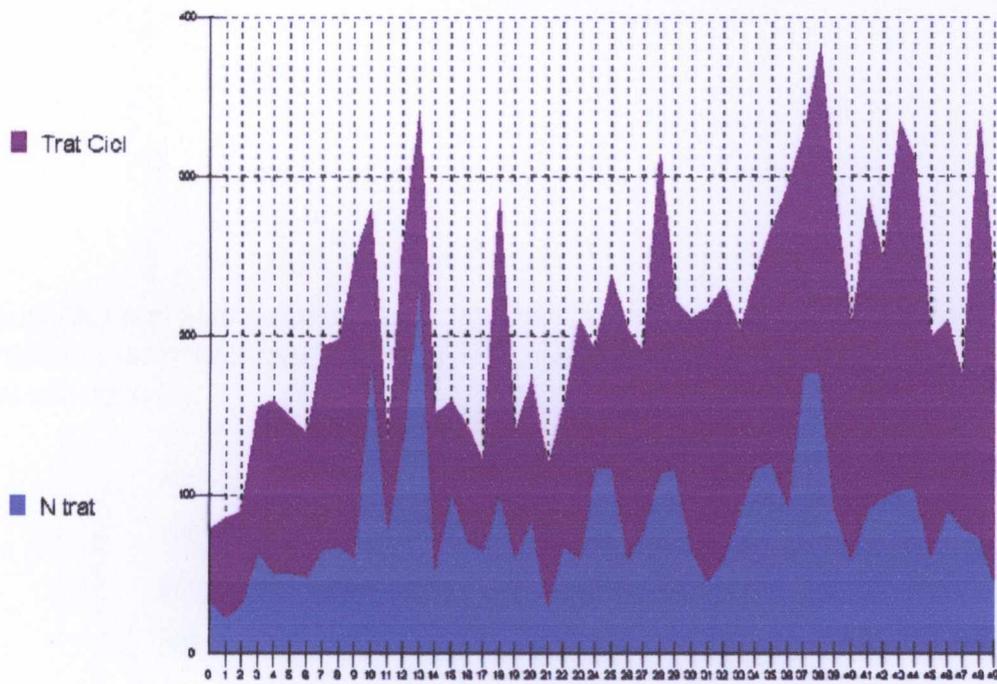
TABELA 4 - Distribuição em classes da quantidade de células inflamatórias em 50 campos microscópicos em animais cronicamente infectados tratados com cislofosfamida em baixas doses

Classes	$X_i$	$F_i$	Percentual (%)
22  — 53	37.4	10	20 %
53  — 83	68.1	18	36 %
83  — 114	98.8	12	24 %
145  — 176	129.5	6	12 %
176  — 206	190.9	3	3 %
206  — 237	221.6	1	2 %
<b>Total</b>		<b>50</b>	<b>100 %</b>

Figura 11 – Morfometria dos 50 campos microscópicos analisados dos animais cronicamente infectados tratados com ciclofosfamida em baixas doses comparados àqueles somente infectados.

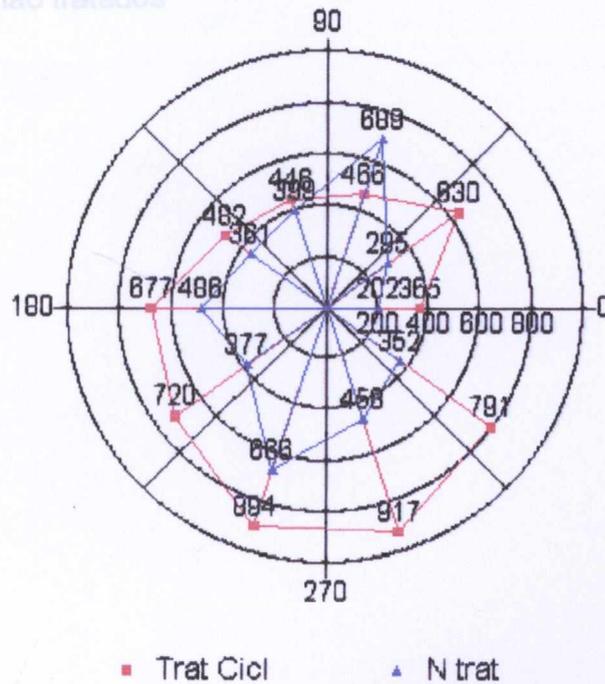
Figura 12 – Média da morfometria dos 50 campos microscópicos analisados dos animais cronicamente infectados tratados com ciclofosfamida em baixas doses comparados àqueles somente infectados.

**FIGURA 11 - Morfometria**



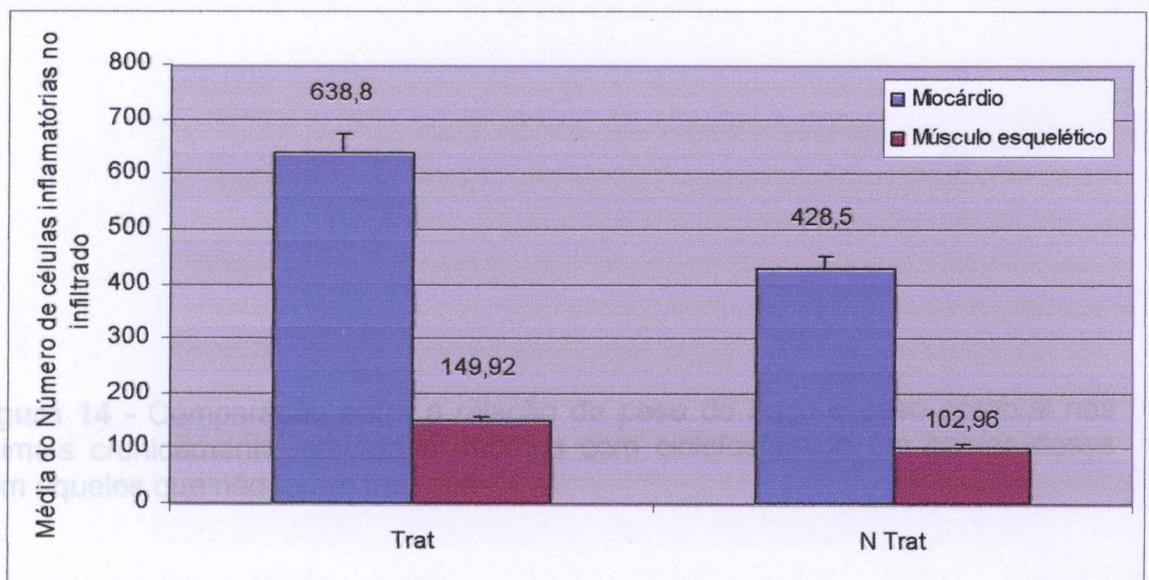
**FIGURA 12 - Morfometria**

Figura 13- Média da morfometria dos infiltrados inflamatórios do miocárdio e músculo esquelético de animais cirurgicamente infectados tratados com ciclofosfamida e não tratados



**Figura 13-** Média da morfometria dos infiltrados inflamatórios do miocárdio e músculo esquelético de animais cronicamente infectados tratados com ciclofosfamida e não tratados

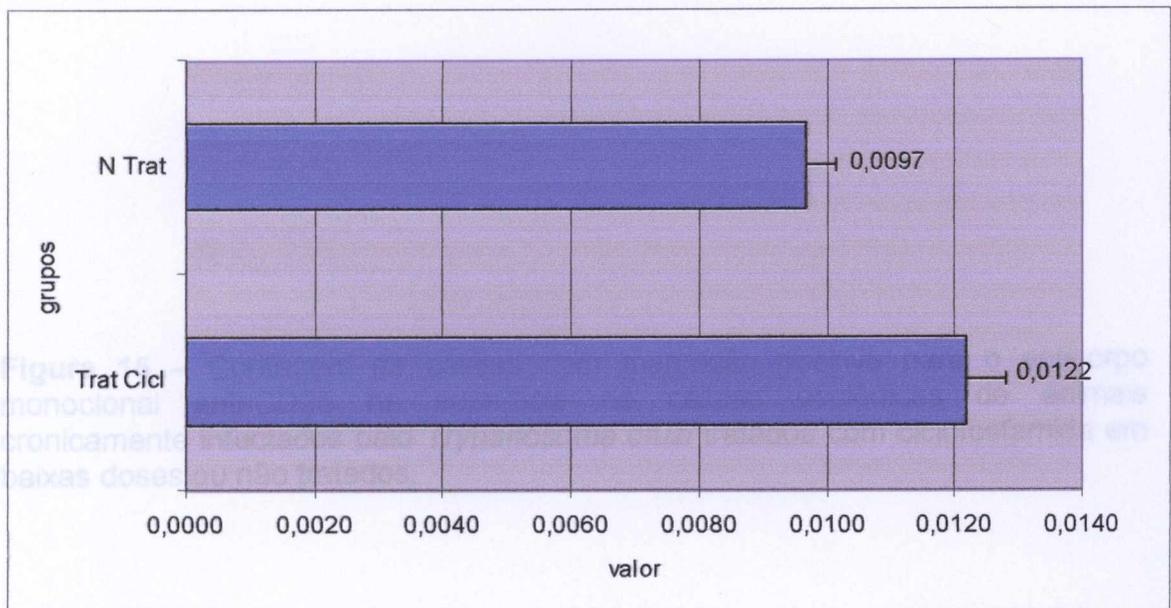
Comparação entre as médias morfométricas dos infiltrados inflamatórios de miocárdio e músculo esquelético de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi* tratados ou não com ciclofosfamida em baixas doses.



**Figura 14** - Comparação entre a relação de peso do baço e peso corporal nos animais cronicamente infectados tratados com ciclofosfamida em baixas doses com aqueles que não foram tratados

## FIGURA 14

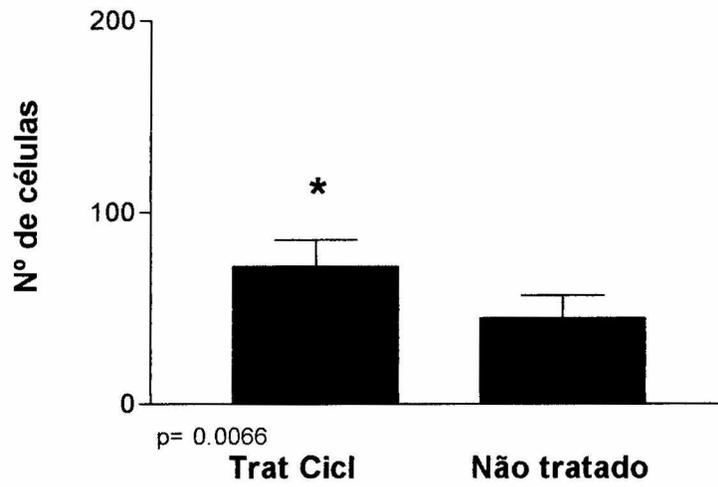
Figura 14 – Comparação entre a média da relação  $\text{baço} \times \text{peso corporal}$  em animais cronicamente infectados tratados ou não com ciclofosfamida em baixas doses.



**Figura 15** – Contagem de células com marcação positiva para o anticorpo monoclonal anti-CD25 na superfície de células esplênicas de animais cronicamente infectados pelo *Trypanosoma cruzi* tratados com ciclofosfamida em baixas doses ou não tratados.

**FIGURA 15**

**Contagem de células CD25+ no baço de animais tratados com ciclofosfamida em baixas doses.**



**FIGURA 16** – Imunomarcacão de com anticorpo monoclonal anti CD25 , em secoes de baço de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* : controles não tratados e tratados com ciclofosfamida em baixas doses.

**A** – Secoo controle, sem o anticorpo primário;

**B** – Secoo de baço de camundongo cronicamente infectado, não tratado, mostrando folículo linfóide do baço com centro germinal hiperplásico e a presença de células com marcaoo positiva para CD25.

**C, D** – Secoo de baço de camundongo cronicamente infectado pelo *T. cruzi*, tratado com ciclofosfamida em baixa dose, tratado com anticorpo monoclonal anti CD25, mostrando a presença de células com marcaoo positiva, aparentemente em maior número do que no grupo não tratado. Todas as fotos com aumento de 400X.

**E** – Mesma secoo do baço da **figura D** mostrando as células TCD25 com imunomarcacoo positiva. 1000X.

FIGURA 16

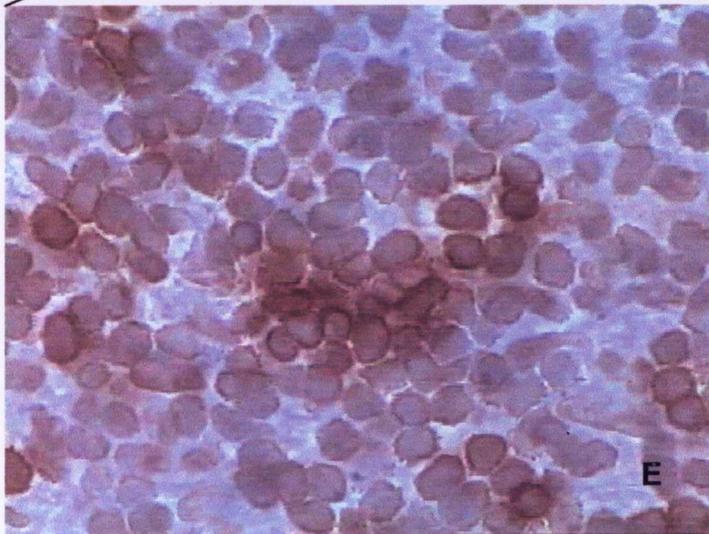
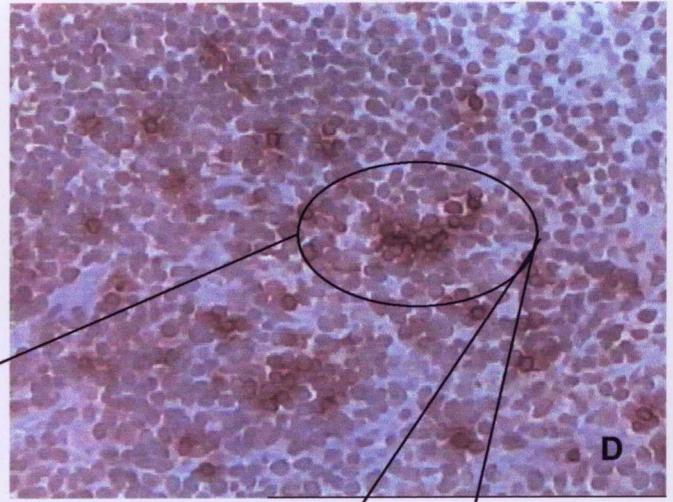
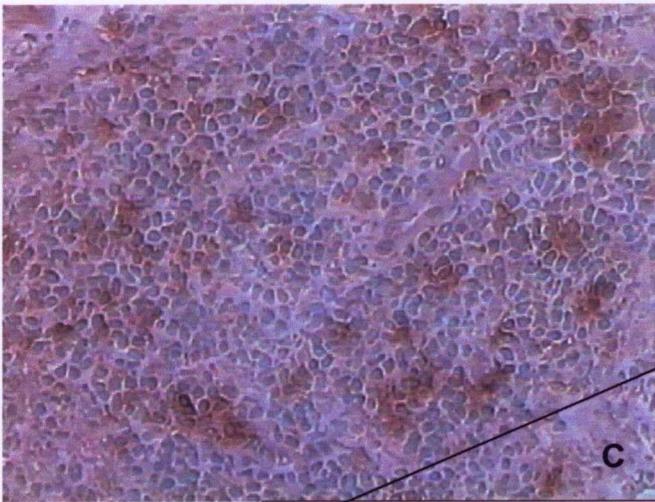
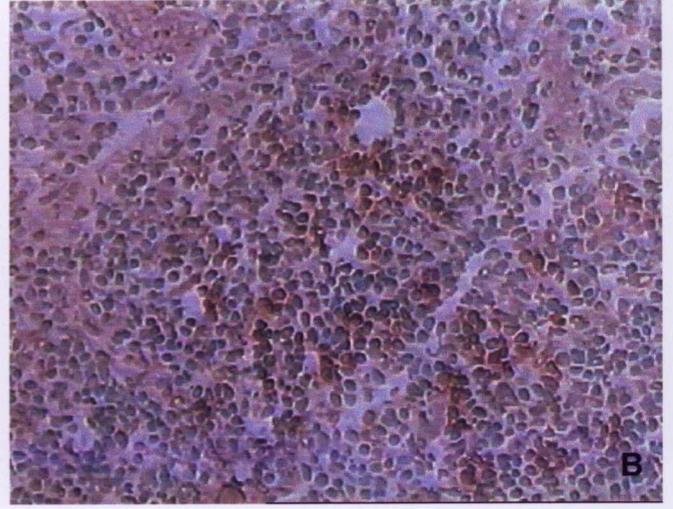
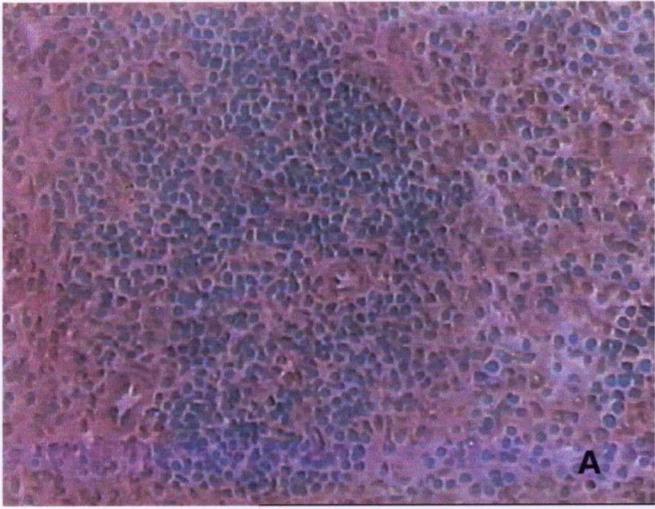


FIGURA 17 – Imunomarcção de tecido muscular cardíaco com anticorpo monoclonal anti-CD4 e CD8.

Fig A Infiltrado mononuclear de células CD8 no miocárdio. (400X)

Fig B Mesmo campo microscópico da figura A agora em maior aumento (1000X)

Fig C Infiltrado inflamatório de células positivas para antiCD4 no interstício do músculo cardíaco (400X).

Fig D Detalhe do infiltrado do infiltrado inflamatório de células CD4 positivas aos (1000X)

Fig E Tabela representativa da quantidade de células por mm<sup>2</sup> em animais dois grupos experimentais

FIGURA 17

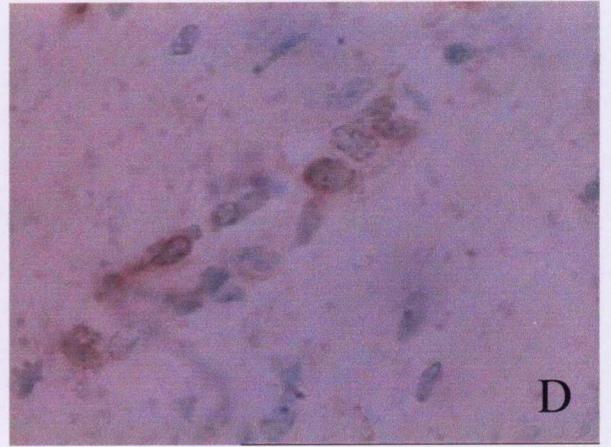
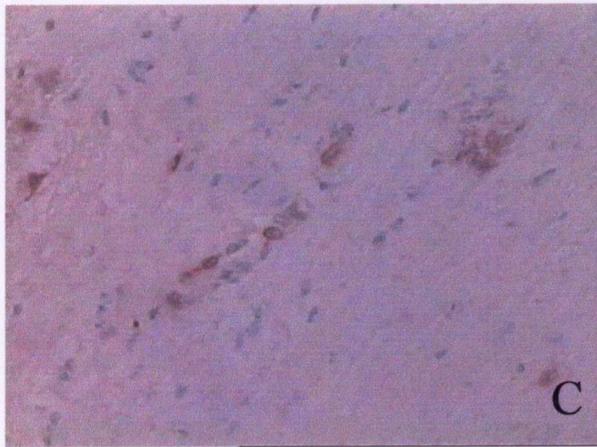
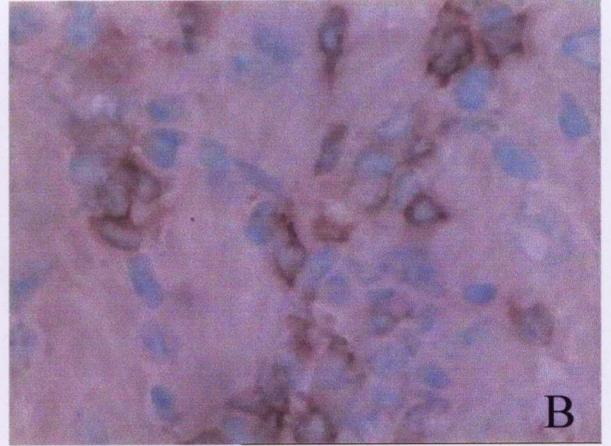
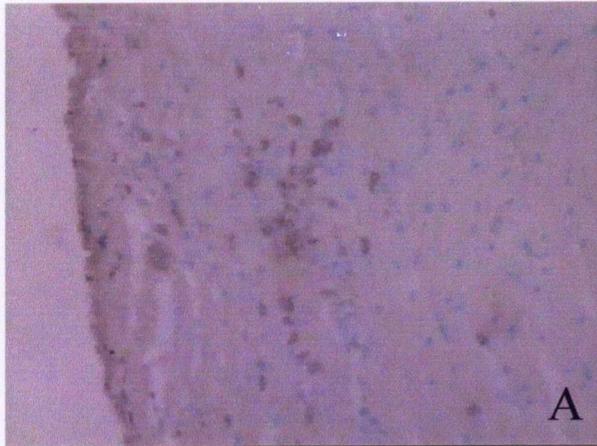


Figura 18 – Quantificação do número de células CD4 e CD8 no tecido cardíaco de animais cronicamente infectados pelo *T. cruzi*

Fig A – Relação entre a população de células marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 no grupo cronicamente infectado.

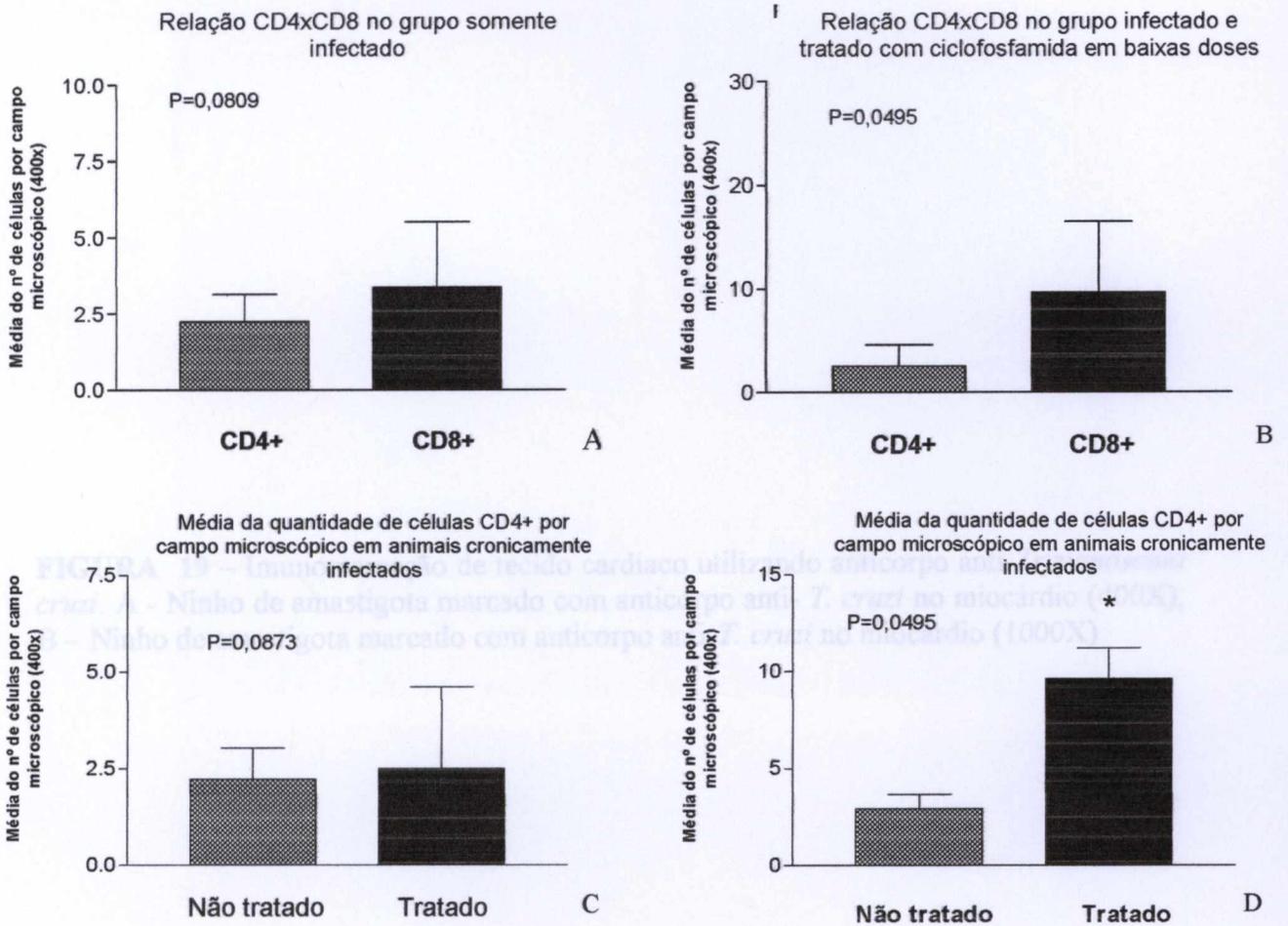
Fig B – Relação entre a população de células marcadas com anticorpos monoclonais anti-CD4 e anti-CD8 no grupo cronicamente infectado e tratado com ciclofosfamida em baixas doses.

Fig C – Média do número de células T CD4 encontradas em cada campo microscópico em animais cronicamente infectados tratados com ciclofosfamida em baixas doses ou não.

Fig D – Média do número de células T CD8 encontradas em cada campo microscópico em animais cronicamente infectados tratados com ciclofosfamida em baixas doses ou não.

Fig E – Número de células positivas para anticorpos monoclonais anti-CD4 e CD8 nos grupos experimentais cronicamente infectados tratados ou não.

**FIGURA 18**



Quantidade de células CD4 e CD8 por milímetro quadrado no tecido cardíaco de animais cronicamente infectados tratados ou não com ciclofosfamida em baixas doses

Grupos experimentais	Tipo celular por mm <sup>2</sup>	
	CD4	CD8
Grupo cronicamente infectado	18,14	69,8
Grupo cronicamente infectado e tratado com ciclofosfamida em baixas doses	16,2	24,12

**E**

**FIGURA 19** – Imunomarcção de tecido cardíaco utilizando anticorpo anti-*Trypanosoma cruzi*. A - Ninho de amastigota marcado com anticorpo anti- *T. cruzi* no miocárdio (400X);  
B – Ninho de amastigota marcado com anticorpo anti-*T. cruzi* no miocárdio (1000X)

FIGURA 19

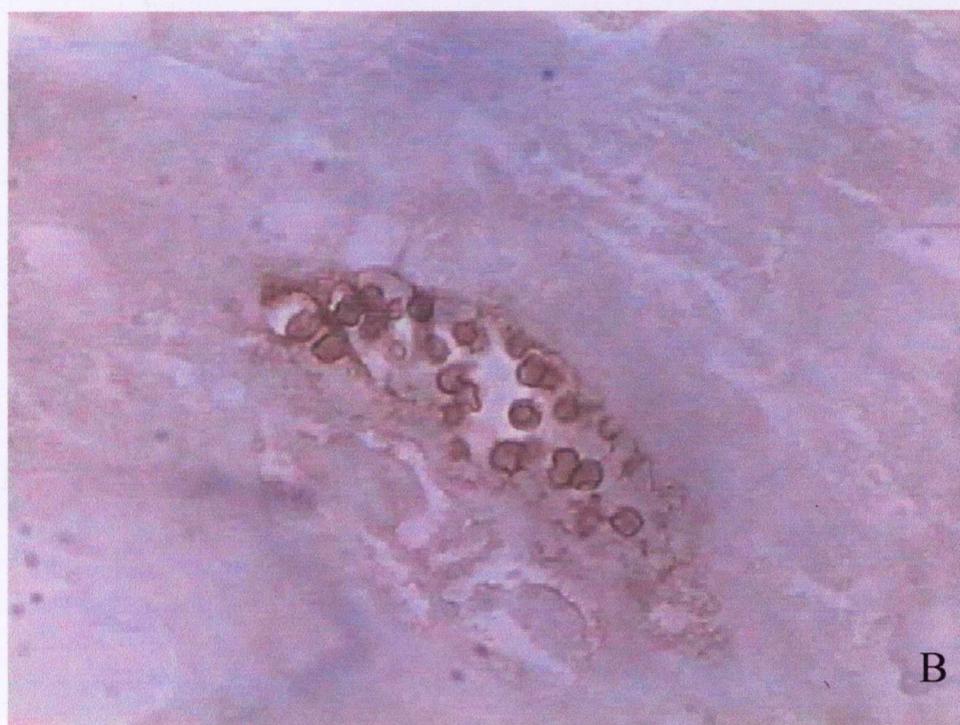
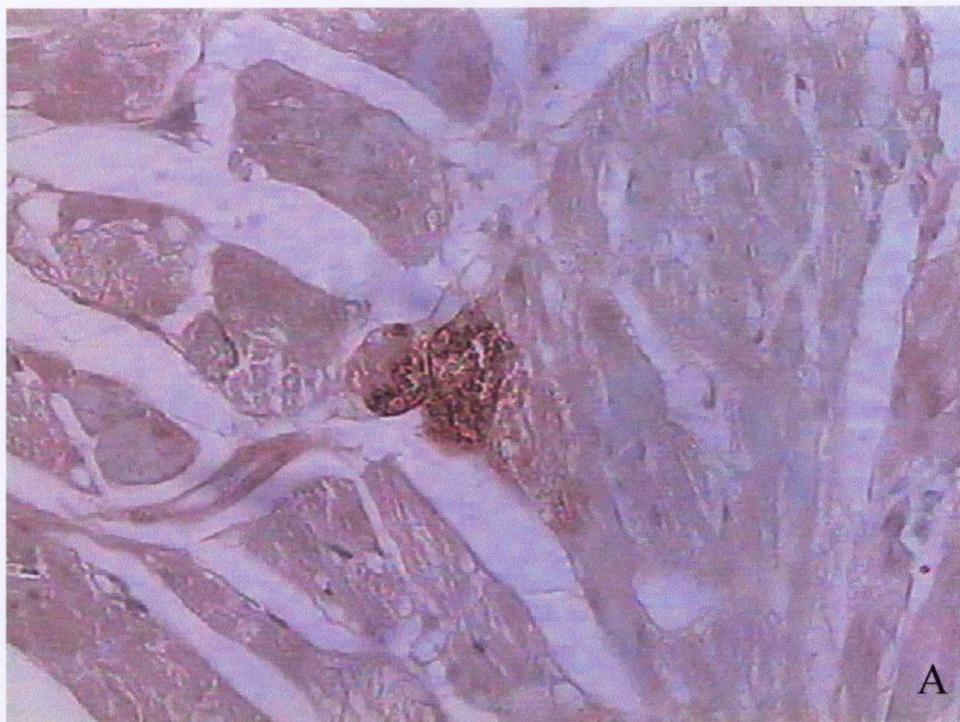


Tabela 5 – Comparação entre o leucograma feito em diferentes períodos durante a infecção crônica pelo *Trypanosoma cruzi* e durante o tratamento com ciclofosfamida em baixas doses.

**TABELA 5**

Leucograma realizado em animais cronicamente infectados tratados ou não com ciclofosfamida em baixas doses

Célula	24 horas após trat.			15 dias após trat.		30 dias após trat.	
	Controle	Trat	N trat	Trat	N trat	Trat	N trat
Neutr.	5,7	27,4	21,8	20,5	7,3	14	6,2
Linf.	93,8	71,3	76,7	75,9	87,2	83,2	60,4
Monoc.	0,1	0,8	1,3	3,3	4,6	0,7	3,3
Eosin.	0,4	0,5	0,2	0,3	0,4	2,1	0,1
Basof.	0	0	0	0	0,5	0	30
Nº absoluto	5,2(10 <sup>3</sup> )	5,1(10 <sup>3</sup> )	6,3(10 <sup>3</sup> )	9,1(10 <sup>3</sup> )	5(10 <sup>3</sup> )	5,2(10 <sup>3</sup> )	14,1(10 <sup>3</sup> )