



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

**INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL DOS ANTÍGENOS
PARASITÁRIOS NA PATOGENIA DA MIOCARDITE CRÔNICA,
EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*:
A IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INTERSTICIAIS
DO MIOCARDIO.**

RENATA SIQUEIRA PORTELLA

**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

**INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL DOS ANTÍGENOS
PARASITÁRIOS NA PATOGENIA DA MIOCARDITE CRÔNICA, EM
CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* : A
IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INTERSTICIAIS DO
MIOCARDIO .**

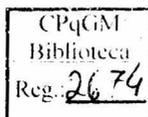
RENATA SIQUEIRA PORTELLA

Orientadora: Dra. 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.

P843i Portella, Renata Siqueira
Investigação sobre o papel dos antígenos parasitários na patogenia da
miocardite crônica, em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*: a
importância das células dendríticas intersticiais do miocárdio [manuscrito] /
Renata Siqueira Portella. - 2006.
119 f. : il. ; 30 cm.

Datilografado (fotocópia).

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal da Bahia. Centro de
Pesquisas Gonçalo Moniz, 2006.
Orientador: Prof. Dra. Sonia Gumes Andrade.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Miocardite. 3. Células dendríticas. 4.
Antígenos. I.Título.

CDU 593.161:599.323

011 2007
583

113 011

593.161:599.323
P843i

“Quando se viaja em direção a um objetivo é muito importante prestar atenção no caminho. O caminho é que sempre nos ensina a melhor maneira de chegar e nos enriquece, enquanto o estamos cruzando”.

(Paulo Coelho)

AGRADECIMENTOS

- A Deus por me abençoar
- À minha orientadora Dra. Sonia G. Andrade, pessoa que tenho uma eterna gratidão e admiração como mãe, mulher e profissional, pelos ensinamentos, as chamadas de atenção, as oportunidades que foram me dadas, enfim por tudo que foi e é essencial para minha formação profissional e científica.
- O Dr. Zilton Andrade pelo exemplo de pesquisador e pela revisão de minha dissertação.
- A Dra Fabiola Cardilo por estar sempre prestativa em tirar duvidas.
- Aos meus colegas de laboratório e de pós-graduação, Torriceli Thé, Daniel Pessina, e Jorge Nihei pelas discussões científicas e ajudas.
- As minhas amigas de laboratório Karina Sobral e Dra. Isis Magalhães pela amizade, incentivo, ajudas, conselhos e por tudo que fizeram e fazem por mim nesta trajetória.
- Ao Biólogo Marcos Lázaro pelo auxílio nas tarefas e companheirismo.
- Aos estudantes Aroldo Junior, Rosanah Leite, Fernanda Lecticia, Ercy Tereza Costa e mestranda Inês Augusta Bandeira pelo companheirismo.

- As estudantes de Biologia Aline Rosado, Lorena dos Anjos pelas ajudas fundamentais nos experimentos.
- Ao Mestre Biólogo Juracy Magalhães pelos ensinamentos técnicos e a técnica Fátima Magalhães pela amizade e senso de organização impecável do laboratório.
- À técnica Dinalva França de Jesus pela amizade, carinho, por me socorrer sempre que precisei e pela dedicação em cuidar das culturas utilizadas neste trabalho.
- Às Biólogas Rita de Cássia pela orientação da técnica de imunofluorescência e Ariane Pimentel por toda ajuda na técnica de imunohistoquímica.
- À Dra. Rosália Campos e ao Dr. Edson Luis Camandaroba pelo coleguismo.
- Ao funcionário Preciano por ter cuidado dos animais utilizados nesse trabalho.
- À secretária Telma Campos por toda ajuda na compra dos materiais utilizados nessa dissertação e por sempre estar disponível nas horas em que precisei.
- À funcionária do MASP, Maria José dos Santos pela limpeza do ambiente de trabalho.
- A toda família do Laboratório de Doença de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular (LACEI) da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) - Centro de Pesquisa Gonçalo Muniz.

- A todos os meus amigos do LAPEX, em especial Liliane Cunha, Bárbara Assis, Carine Azevedo, Elisalgela Trindade por sempre estarem disponíveis em ajudar.
- A todos do biotério por serem sempre prestativos e cuidarem dos animais, em especial Dra. Fabiene Pititinga, Vitor Maffili, Jaqueline Vieira, Josilene Sousa, Marcio dos Santos e Alexandre Sobrinho.
- Ao pessoal do Laboratório de Histopatologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pelo processamento, corte e coloração dos fragmentos histopatológicos dos animais utilizados nesse trabalho.
- Ao pessoal da Biblioteca Eurídice Santana, em especial Ana Maria Fiscina pela correção da minha referencia Bibliográfica.
- A Hugo Vasconcelos do CVDC por toda ajuda nas fotografias e recurso visual.
- Ao pessoal da Pós-graduação, Rosalia Meire, Rosângela da Cruz Paixão, lumara Evangelista, Lana Abreu, Taise Caires pela organização, paciência e auxilio.
- A Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz (Fiocruz-CPqGM) por toda infra-estrutura fundamental para o desenvolvimento dessa dissertação.
- Aos meus pais Márcia e Hélio Portella por todo sentido de vida, amor, responsabilidade, paciência, compreensão enfim por serem responsáveis pela pessoa que hoje sou.

- Aos meus irmãos Horácio, Bruno e Claudia pelas alegrias, cumplicidade, amizade e amor.
- A Octaviano Menezes pelo carinho e por toda paciência e compreensão nos momentos em que estive ausente.

RESUMO

INVESTIGAÇÃO SOBRE O PAPEL DOS ANTÍGENOS PARASITÁRIOS NA PATOGENIA DA MIOCARDITE CRÔNICA, EM CAMUNDONGOS INFECTADOS PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* : A IMPORTÂNCIA DAS CÉLULAS DENDRÍTICAS INTERSTICIAIS DO MIOCÁRDIO. RENATA SIQUEIRA PORTELLA

A doença de Chagas, evolui em diferentes fases: aguda, com sintomas gerais e comprometimento cardíaco devido ao parasitismo pelo *T. cruzi*, das miocélulas cardíacas e sua rotura o que determina intensa miocardite, pela presença dos parasitos e por mecanismos imunes. Após a fase aguda, os pacientes passam a uma forma indeterminada com escassos parasitos e lesões miocárdicas focais e discretas. Os pacientes na forma indeterminada, em 40% dos casos, evoluem para uma forma crônica cardíaca. Nesta forma, os parasitos são raros nas miocélulas cardíacas, porém uma miocardite crônica difusa e fibrosante se instala, evoluindo para a insuficiência cardíaca e o óbito. A patogenia das lesões cardíacas é controversa, sendo atribuída ao parasito o papel de estimular a resposta imune ou a um mecanismo de autoimunidade. No presente trabalho, utilizando-se o modelo do camundongo, procura-se investigar o papel dos antígenos parasitários na manutenção das lesões da fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, pela pesquisa de parasitos e de antígenos parasitários em focos inflamatórios ou pela demonstração de antígenos seqüestrados e expressos na membrana de células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDIs), pela marcação *in situ*, por métodos imunohistoquímicos, utilizando anticorpo anti-*T. cruzi*. Em camundongos cronicamente infectados, tratados com quimioterápico específico, as lesões histopatológicas regredem, permanecendo, entretanto um processo inflamatório residual. Foi desenvolvida uma investigação, com o objetivo de esclarecer, em camundongos cronicamente infectados, tratados e não tratados com o Benzonidazol, a presença de parasitos ou de seus antígenos, em focos de destruição de miocélulas parasitadas ou capturadas por CDIs, e a sua relação com a persistência de infiltrados inflamatórios residuais no coração. Foram utilizados camundongos Suíços infectados com a cepa Colombiana (resistentes ao Benzonidazol) ou com um clone da 21SF (susceptível) tratados na fase crônica a partir de 90 e 120 dias de infecção durante 90 dias. O inóculo para ambos os Grupos experimentais foi de 10^4 formas saquícolas do *T. cruzi* por via intraperitoneal. Os camundongos tratados foram sacrificados 150 ou 200 dias após o tratamento, juntamente com os controles não tratados. Foram realizados os testes de cura (parasitemia, subinoculação em camundongos recém-nascidos, hemocultura, sorologia). Secções de coração e de músculo esquelético foram fixadas e processadas para estudo histopatológico em secções coradas pela Hematoxilina e Eosina ou pelo método do Picro-Sirius para colágeno e para imunohistoquímica com anticorpos anti-*T. cruzi* e anti-MAC. Os resultados mostraram na infecção crônica pela cepa Colombiana lesões inflamatórias, moderadas a intensas, com necrose de miocélulas cardíacas e infiltrados mononucleares e fibrose intersticial difusa e focal. Nos tratados, houve regressão parcial das lesões permanecendo infiltrados inflamatórios residuais que variaram de discretos a moderadas e sinais de regressão da fibrose. Na infecção crônica pelo clone 21SF C3 havia miocardite crônica difusa discreta ou moderada na maioria dos casos. Nos tratados, houve decréscimo das lesões inflamatórias, com sinais de regressão da fibrose. Testes imunohistoquímicos com anticorpos anti-*T. cruzi* revelaram detritos parasitários positivos em focos inflamatórios. As CDIs do miocárdio apresentaram em todos os casos, marcação positiva para antígeno do *T. cruzi*, comprovando o papel das células apresentadoras de antígenos na manutenção das lesões na fase crônica da infecção.

PALAVRAS-CHAVE: *Trypanosoma cruzi*, Miocardite crônica, Benzonidazol, Antígenos *in situ*, Células dendríticas intersticiais.

ABSTRACT

INVESTIGATION ON THE PARTICIPATION OF PARASITE ANTIGENS ON THE PATHOGENESIS OF CHRONIC MYOCARDITIS IN *Trypanosoma cruzi* INFECTED MICE: IMPORTANCE OF INTERSTITIAL DENDRITIC CELLS OF THE HEART.

RENATA SIQUEIRA PORTELLA

Chagas' disease evolves through different phases: an acute phase, with systemic symptoms and cardiac involvement, due to *Trypanosoma cruzi* invasion of mycardiocytes and their rupture, which result in intense myocarditis, amplified by immune mechanisms. Following the acute phase, patients enter into an indeterminate form of the disease, when parasites are scarce and myocarditis becomes mild and focal; about 40% of patients progress to a diffuse chronic myocarditis, with fibrosis and few parasites, cardiac failure and death. The pathogenesis of cardiac lesions is disputed, especially regarding the role of the parasite and its antigens as opposed to auto-immunity. In the present study the importance of parasite antigens in maintaining the cardiac lesions during chronic infection with *T. cruzi* is investigated using the mice model. Search of parasites or parasite antigens within inflammatory foci, as well as the demonstration of antigens captured by interstitial dendritic cells of the heart (IDCs) and expressed at their membrane as revealed by *in situ* antigen immunolabeling were performed by using anti-*T. cruzi* antibodies. In chronically infected mice, treated with specific chemotherapy, a regression of the histopathological lesions was observed, although a residual inflammatory infiltrate remained. An investigation was made in chronically infected mice, either treated or not with Benznidazole, with the aim at clarifying whether the inflammatory infiltrates were related to the presence of parasites or to their antigens, either in the tissues or at the IDCs membrane. Chronically infected Swiss mice, either with the Colombian strain (resistant to Benznidazole) or with the clone 21SF C3 (susceptible) were used. They were treated during the chronic phase (90 to 120 days of infection), for 90 days. Inocula for both groups were of 10^4 blood forms of *T. cruzi*, intraperitoneally injected. Treated mice were killed 150 or 200 days post-treatment, together with non-treated controls. Parasitemia, sub-inoculation into new-born mice, hemoculture, and serology were performed for cure tests. Fragments of the heart and skeletal muscles were fixed and processed for histopathological studies. The sections were stained with Hematoxylin and Eosin, Picro-Sirius-red method for collagen, and for immunohistochemistry with anti-*T. cruzi* and anti-MAC antibodies. Results revealed that Colombian-strain chronically infected mice presented inflammatory lesions varying from moderate to intense, with necrosis of cardiac myocells, mononuclear cells infiltration and diffuse and focal interstitial fibrosis. Treated mice showed partial regression of the inflammatory lesions, with the presence of focal or diffuse residual infiltrates, varying from mild to moderate, besides regression of fibrosis. Mild to moderate chronic diffuse myocarditis was present in most cases of the mice infected with the clone 21SF C3. Treated mice exhibited subsiding inflammatory lesions. Inflammatory lesions were residual and fibrosis showed signals of regression. Immunohistochemical tests with anti-*T. cruzi* antibodies revealed positively stained parasite debris inside the inflammatory foci. The IDCs of the heart presented in all cases positive immunolabeling for *T. cruzi* antigens, confirming the participation of antigen presenting cells in the maintenance of chronic phase lesions of Chagas' disease,

KEY WORDS: *Trypanosoma cruzi*, Chronic myocarditis, Benznidazole, *in situ* antigens, dendritic interstitial cells.

INDÍCE

| | |
|--|----|
| 1- INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1- Histórico..... | 13 |
| 1.2- O <i>Trypanosoma cruzi</i> | 14 |
| 1.2.1- Classificação das cepas..... | 15 |
| 1.2.1.1- Biodemas | 16 |
| 1.2.1.2- Zimodemas..... | 17 |
| 1.2.1.3- Taxa <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II..... | 18 |
| 1.3- A Doença de Chagas..... | 18 |
| 1.3.1. A Patologia da Doença de Chagas..... | 20 |
| 1.4- O papel do parasito e de seus antígenos | 22 |
| 1.5- Autoimunidade na Doença de Chagas..... | 26 |
| 1.4- Apresentação de antígenos pelas Células Dendríticas Intersticiais do Miocárdio..... | 30 |
| 1.5- Quimioterapia na Doença de Chagas..... | 33 |
| 2. HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO | 35 |
| 3- JUSTIFICATIVA | 36 |
| 4- OBJETIVO GERAL | 37 |
| 4.1 Objetivos específicos..... | 37 |
| 5- MATERIAL E MÉTODOS | 38 |
| 5.1 Animal experimental..... | 38 |
| 5.2 Cepas utilizadas..... | 38 |
| 5.3 Inóculo..... | 38 |

| | |
|--|-----------|
| 5.4 Grupos experimentais..... | 38 |
| 6- METODOLOGIA..... | 40 |
| 6.1- Parasitemia..... | 40 |
| 6.2- Mortalidade..... | 40 |
| 6.3- Tratamento..... | 41 |
| 6.4- Critérios de cura | 41 |
| 6.5- Testes de cura parasitológicos..... | 41 |
| 6.6- Sorologia..... | 42 |
| 6.7- Índice de cura dos camundongos tratados com Benzonidazol..... | 43 |
| 6.8- Eutanásia..... | 43 |
| 6.9- Criopreservação..... | 43 |
| 6.10- Histopatologia..... | 44 |
| 6.11- Estudo Imunohistoquímico | 44 |
| 6.11.1 - Pesquisa de antígenos parasitários do <i>T. cruzi</i> nas miocelas cardíacas e no interstício ou seqüestrados em células dendríticas intersticiais do miocárdio pela técnica da peroxidase..... | 45 |
| 6.11.2- Imunofluorescência <i>in situ</i> para antígenos do <i>T. cruzi</i> | 46 |
| 6.11.3 – Controle da presença de células dendríticas intersticiais do miocárdio pelo uso de anticorpo anti-MAC..... | 47 |
| 7 - RESULTADOS | 48 |
| 7 - I – INFECÇÃO CRÔNICA COM A CEPA COLOMBIANA..... | 48 |
| 7.1.1 Análise da Parasitemia..... | 48 |
| 7.1.2 Índice da Mortalidade cumulativa..... | 48 |

| | |
|---|-----------|
| 7.1.3 Resultado dos testes de cura parasitológicos..... | 48 |
| 7.1.4 Análise Histopatológica | 49 |
| 7.1.4.1 Subgrupo 1 - Camundongos sacrificados 150 dias após o termino do tratamento..... | 49 |
| 7.1.4.1.1 Controles não tratado..... | 49 |
| 7.1.4.1.2 Camundongos tratados com Benzonidazol..... | 50 |
| 7.1.4.2 Subgrupo 2 - Camundongos sacrificados 200 dias após o tratamento..... | 51 |
| 7.1.4.2.1 Controles não tratado..... | 51 |
| 7.1.4.2.2 Camundongos tratados com Benzonidazol..... | 51 |
| 7.1.4.3 Conclusão da analise histopatológica dos camundongos infectados com a cepa Colombiana | 52 |
| 7.1.5 Pesquisa de antígenos do <i>T. cruzi</i> no miocárdio de camundongos cronicamente infectados com a cepa Colombiana através as técnicas de imunoperoxidase e de imunofluorescência | 53 |
| 7.1.5.1 Parasitos íntegros ou detritos parasitários..... | 53 |
| 7.1.5.2 Células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDI)..... | 53 |
| 7.1.5.3 Controles da imunomarcção | 54 |
| 7.II- INFECÇÃO CRÔNICA COM O CLONE 21SFC3..... | 55 |
| 7.II.1 Analise da Parasitemia..... | 55 |
| 7.II.2 Índice da Mortalidade cumulativa..... | 55 |
| 7.II.3 Resultado dos testes de cura parasitológicos..... | 55 |
| 7.II.4 Análise Histopatológica..... | 56 |
| 7.II.4.1 Subgrupo 1 - Camundongos sacrificados 150 dias após o termino do tratamento | 56 |

| | |
|--|-----------|
| 7.II.4.1.1 Controles não tratado..... | 56 |
| 7.II.4.1.2 Camundongos tratados com Benzonidazol..... | 57 |
| 7.II.4.2 Subgrupo 2 - Camundongos sacrificados 200 dias após o tratamento..... | 58 |
| 7.II.4.2.1 Controles não tratado..... | 58 |
| 7.II.4.2.2 Camundongos tratados com Benzonidazol..... | 58 |
| 7-II.4.3 Conclusão da análise histopatológica do grupo infectado com o clone C23 da cepa 21SF..... | 59 |
| 7.II.5 Pesquisa de antígenos do <i>T. cruzi</i> no miocárdio de camundongos cronicamente infectados com clone -21SF-C3 através as técnicas de imunoperoxidase e de imunofluorescência..... | 60 |
| 7-II.5.1 Parasitos íntegros ou detritos parasitários..... | 60 |
| 7-II.5.2 Células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDI)..... | 60 |
| 7.II.5.3 Controles da imunomarcção..... | 60 |
| 8.0 DISCUSSÃO..... | 62 |
| 9.0 CONCLUSÕES..... | 70 |
| 10 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 71 |
| FIGURAS E TABELAS..... | 83 |

1- INTRODUÇÃO

1.1- Histórico

A história da descoberta da Doença de Chagas teve seu início quando Carlos Chagas, em 1907, foi solicitado por Oswaldo Cruz para controlar o surto de Malaria que grassava entre operários da estrada de ferro Central do Brasil na região Norte de Minas Gerais.

Alertado pela população da presença do “barbeiro”, inseto hematófago que habita os domicílios humanos, de hábito noturno, Chagas resolveu investigar se o inseto era capaz de transmitir algum tipo de doença ao homem. Examinando os “barbeiros”, ele encontra flagelados no intestino posterior de alguns exemplares colhidos no interior de domicílios, em Minas Gerais.

Ele envia os hematófagos para Oswaldo Cruz no Rio de Janeiro, para serem alimentados em *Callithrix penicillata* livres de infecção. Depois de algumas semanas, observou-se tripanosomas no sangue periférico de um dos animais, com sua morfologia inteiramente diferente de qualquer espécie conhecida do gênero *Trypanosoma*.

Iniciaram o estudo nos habitantes das casas infestadas pelos “barbeiros”, para verificar se o parasita poderia transmitir algum tipo de patologia para os humanos. Depois de repetidos exames negativos do sangue dos habitantes, encontraram um gato infectado e posteriormente uma criança febril, que apresentava formas do parasita na corrente sanguínea (CHAGAS; 1909).

Depois de diversos estudos, Chagas inicialmente classificou o protozoário como *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Posteriormente tendo observado em cobaias experimentalmente infectadas, a presença de formas esquizogônicas nos pulmões, interpretou-as com sendo formas de divisão sexuada do *T. cruzi*, por isso, resolveu classificá-lo em um novo gênero denominado *Schizotrypanum*, e a espécie *Schizotrypanum cruzi*, em homenagem ao Dr. Oswaldo Cruz (CHAGAS, 1911). Entretanto as formas esquizogônicas foram encontradas por outros autores no pulmão de coelhos, cobaias e ratos normais (CHAGAS, 1909) e classificada como pertencentes a uma nova espécie que foi designada como *Pneumocystis carini* por Delanoe, apud CHAGAS (1913).

1.2- O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário flagelado sanguíneo, pertencente ao reino Protista e sub-reino Protozoa. Incluídos no filo Sarcomastigophora, na classe Kinetoplastidea e ordem Kinetoplastida, por possuir uma única mitocôndria, apresentando o cinetoplasto, que é uma continuidade mitocôndrial, que contem as copias de DNA circular constituindo os minicirculos e os maxicirculos (kDNA). Pertencentes a família *Trypanosomatidae*, ao gênero *Trypanosoma* e ao subgênero *Schizotrypanum*, o parasita da espécie *Trypanozoma cruzi*, tem como hospedeiro invertebrado, numerosas espécies de hemíptera hematófagos da família Reduviidae (DE SOUZA, 2000)

A transmissão aos vertebrados ocorre no momento que o triatomíneo infectado faz o repasto sanguíneo, onde ele elimina formas tripomastigotas metacíclicas do parasita junto com as fezes. As formas tripomastigotas caem na corrente

sanguínea, onde penetram em células nucleadas, principalmente musculares e macrófagos. O parasita multiplica-se por divisão binária sob a forma amastigota intracelular.

O parasita apresenta formas tripomastigotas com morfologia variada e a depender da cepa, durante o curso da infecção, podem predominar formas delgadas, formas largas e às vezes muito largas (BRENER & CHIARI, 1963). As formas largas são mais resistentes ao mecanismo imunológico do hospedeiro e permanecem por mais tempo no sangue periférico, enquanto as formas delgadas penetram rapidamente nos tecidos e são mais susceptíveis (BRENER, 1969).

1.2.1- Classificação das cepas

Desde o início das investigações sobre a Doença de Chagas, amostras do *T. cruzi* foram obtidas de casos humanos, de animais silvestres naturalmente infectados ou dos insetos vetores, as quais são mantidas em laboratório, através de passagem em animais susceptíveis ou por meio de cultura axênica. Estes tripomastigotas isolados passaram a ser designado pelos pesquisadores como cepa.

As cepas do *T. cruzi* apresentam diferenças quanto ao grau de virulência, patogenicidade e tropismo para diferentes tecidos. De acordo com seus caracteres biológicos, bioquímicos e genéticos, diferentes pesquisadores resolveram classifica-las em tipos biológicos (ANDRADE; 1974), posteriormente designados como Biodemas (ANDRADE & MAGALHÃES,

1997), Zimodemas (MILES et al., 1986 & ROMANHA, 1982) e Esquizodemas (MOREL et al., 1980, 1986 & GONÇALVES et al., 1984).

1.2.1.1- Biodemas

Estudando as características biológicas de cepas isoladas de diferentes áreas geográficas, em camundongos Suíços, ANDRADE (1974) classificou as cepas de acordo com a parasitemia, morfologia das formas sanguícolas, virulência, patogenicidade e histotropismo, em tipos I, II, III e posteriormente designou os tipos como Biodemas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997).

As cepas do Biodema tipo I, se caracterizam pela rápida multiplicação parasitaria com piques muito elevados entre 9 e 10 dias de infecção; alta virulência e com mortalidade de 100% entre 10 e 12 dias; predominância de formas delgadas e acentuado reticulotropismo no início da infecção. Com o avanço da infecção, ocorre a predominância das formas largas e acentuado miotropismo. São também conhecidas como cepas macrofagotrópicas, pelo parasitismo predominantemente de macrófagos, sendo as cepas Y e Peruana as mais estudadas.

As cepas do Biodema tipo II, apresentam multiplicação lenta com piques irregulares entre 12 e 20 dias de infecção, virulência muito variável com mortalidade media entre 20 e 25 dias; pequeno número de formas delgadas e discreto reticulotropismo no início da infecção, predominando as formas largas e lesões miocardicas em todo o curso da infecção. As cepas representantes desse biodema são a 21SF e a 12SF.

O Biodema tipo III tem como característica a multiplicação parasitária muito lenta, atingindo piques parasitêmicos muito elevados entre 20 e 30 dias; baixa virulência com mortalidade nula até 50 dias. Predominância de formas largas e miotropismo em todo o curso da infecção. A cepa característica desse biodema é a Colombiana. Entretanto, a cepa Colombiana com o passar dos anos, foi se adaptando ao modelo do camundongo pelas diversas passagens sucessivas, aparecendo formas delgadas no início da infecção, aumentando sua virulência e apresentando elevado índice de mortalidade, a partir do 20º dia de infecção.

1.2.1.2- Zimodemas

Os zimodemas são os padrões isoenzimáticos que em conjunto caracterizam o fenótipo das cepas, pela análise genética da mobilidade eletroforética de enzimas multilocus em gel de amido. Sua classificação foi proposta por MILES et al. (1980, 1986) em 3 zimodemas Z1, Z2, Z3 e por ROMANHA (1982) em 4 zimodemas ZA, ZB, ZC, ZD.

ANDRADE et al. (1983) correlacionaram os padrões de isoenzimas, proposto por MILES et al. (1980) para as enzimas PGM, PGI, ASAT e ALAT aos biodemas, demonstrando que a caracterização biológica tem ligação com os perfis isoenzimático, mostrando que as cepas do biodema tipo II (12SF e 21SF), pertencem ao zimodema Z2 e as cepas do biodema tipo III (Colombiana), pertence ao zimodema Z1. Já as cepas do biodema tipo I foram enquadradas posteriormente ao zimodema Z2b

1.2.1.3- Taxa *T. cruzi* I e *T. cruzi* II

No Simpósio Internacional Sobre Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 Anos Após sua Descoberta (ANONYMOUS; 1999), pesquisadores de diversos grupos propuseram uma sistematização das diversas classificações para o *T. cruzi*, estabelecendo uma nova classificação em dois taxa, denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, que englobam classificações já citadas e aquelas baseadas em análises filogenéticas e no DNA ribossomal (SOUTO et al. 1996) e nos genes de mini-exon (FERNANDES et al., 1999).

As cepas do Biodema tipo II e Zimodema Z2 foram incluídas no taxa *T. cruzi* II e as cepas do Biodema tipo III e Zimodema Z1 foram incluídas no taxa *T. cruzi* I. O biodema tipo I (ANDRADE & MAGALHÃES, 1997) e o zimodema Z3 (MILES et al., 1980) não puderam ser agrupados de acordo com essa classificação.

1.3- A Doença de Chagas

A doença de Chagas é uma endemia no continente americano, particularmente nas regiões tropicais e sub-tropicais da América Latina sendo causada pelo protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi*. Essa enfermidade é um sério problema de saúde pública, estimando-se que cerca de 16 a 18 milhões de pessoas estejam infectadas em todo o continente americano, apresentando o Brasil aproximadamente 6 milhões de chagásicos (WHO, 1991). Com o programa de controle do vetor, através da aplicação de inseticidas ou melhoria

habitacional, resultou em uma significativa redução da transmissão da doença (DIAS et. al., 2002).

Essa doença pode apresentar uma fase aguda, caracterizada por sinais e sintomas como febre, cefaléia, mal-estar, hepatoesplenomegalia e o aparecimento do sinal de Romanã ou Chagoma de inoculação, sendo o parasito facilmente detectado no sangue periférico. A fase aguda pode ser muito grave levando ao óbito em cerca de 7 a 10% dos casos devido à miocardite aguda e a meningoencefalite (ANDRADE, 2000). Em alguns casos os sintomas são geralmente confundidos com os de outras patologias, com isso, a infecção aguda pode passar despercebida. Após a fase aguda o paciente entra em uma fase indeterminada e assintomática, podendo permanecer por muitos anos. Nesse estágio, os pacientes não apresentam alterações ao exame radiológico de coração e tubo digestivo e eletrocardiográfico e a doença só pode ser detectada através de exames sorológicos e do xenodiagnóstico. Com o passar dos anos, cerca de 10% dos indivíduos soro positivos irão desenvolver os megas do tubo digestivos (REZENDE, 2000) e 30% as alterações crônicas cardíacas, apresentando arritmias, bloqueio átrio ventriculares, bloqueio do feixe de Hiss, aumento da área cardíaca, ocasionando com isso, insuficiência cardíaca congestiva (LARANJA et. al. 1953 & MARIN-NETO et. al, 1999). Durante essa fase os parasitas são escassos e as lesões inflamatórias observadas, provavelmente estão relacionadas com o processo de hipersensibilidade tardia ou a persistência de antígenos parasitários.

1.3.1- A Patologia da Doença de Chagas

Na fase aguda da infecção aparece no miocárdio uma reação inflamatória difusa e densa, que pode ser bastante evidente na miocardite aguda do homem e de outros vertebrados como o cão (ANDRADE et al.; 1984). A severa inflamação é freqüentemente acompanhada de necrose de células parasitadas e não parasitadas, ocasionando complicações que podem ser monitoradas eletrocardiograficamente, podendo determinar arritmias, falência cardíaca e morte (ANDRADE; 1984).

ANDRADE et al. em 1994, observaram por microscopia eletrônica que a destruição celular se inicia nas áreas de adesão dos linfócitos e macrófagos as células musculares e endoteliais de capilares do miocárdio, resultando em uma microangiopatia.

Com o passar do tempo, o organismo sofre uma modulação imunológica, controlando a infecção, tornado escasso o parasitismo e as lesões inflamatórias assumem um caráter discreto e focal, e são compostas por células mononucleares (ANDRADE, 2000).

Com o surgimento da fase indeterminada, estabelece-se um estado de aparente equilíbrio entre o parasito e o hospedeiro, permanecendo sem manifestações clínicas por um longo período de tempo.

Histopatologicamente, a forma indeterminada revela pequenos focos de inflamação do miocárdio. Estudo ultraestrutural, realizado por ANDRADE et al. (1997), demonstrou que o infiltrado inflamatório é composto por linfócitos, plasmócitos, macrófagos e poucos polimorfonucleares. Essas células estão

localizadas em áreas focais do miocárdio, sem estabelecer um contato direto com os miocardiócitos o que evita a destruição tecidual, como ocorre na fase aguda.

A transição para a fase crônica da doença ocorre em 30% dos indivíduos, provavelmente através de uma supressão da modulação imunológica entre o parasita e o hospedeiro, reativando a inflamação (ANDRADE, 1999). A fase crônica é caracterizada por uma progressiva miocardite, que está associada com um intenso e difuso infiltrado inflamatório mononuclear, áreas de necrose de células cardíacas e formação da fibrose (ANDRADE et al., 1991, 1999, 2000). A inflamação é encontrada principalmente nas regiões perivasculares do miocárdio, sendo difícil a detecção do parasita. Esses danos ocorridos na fase crônica da doença são responsáveis pela hipertrofia do coração, insuficiência cardíaca, fenômenos tromboembólicos, arritmias variadas e morte súbita (ANDRADE; 2000).

ANDRADE et al. em 1987, reproduziram experimentalmente a transição da fase indeterminada para a intensa e progressiva miocardite encontrada na forma crônica no modelo com cão, com a administração de baixas doses de ciclofosfamida. Todos os animais tratados desenvolveram uma intensa e difusa miocardite. Células mononucleares foram vistas na periferia e no interior de miocardiócitos em desintegração, semelhantes ao encontrados na infecção humana.

Essa reação inflamatória tardia, progressiva e destrutiva só é encontrada no tecido cardíaco (ANDRADE, 1999). Alguns focos inflamatórios também podem ser encontrados em outros órgãos, como no sistema digestivo. Nesse local as lesões apresentam um aspecto cicatricial ou residual. Por isso tem sido

sugerido que a perda de neurônios no sistema nervoso autônomo ocorre, predominantemente, durante a fase aguda da infecção. Essa perda de neurônios posteriormente desencadeia a hipertrofia da camada muscular do esôfago e do cólon, ocasionando o aparecimento dos megas do aparelho digestivo na fase crônica da doença (KOBBERLE; 1958, 1958).

O aparecimento da intensa inflamação que só ocorre no coração na fase crônica da doença tem sido discutido por diversos autores, tornando-se um assunto muito debatido. A falta de relação entre a gravidade das lesões e intensidade do parasitismo sugere que, a patogenia da doença de Chagas seja relacionada por um mecanismo de autoimunidade. Contudo a presença de antígenos parasitários detectados nas lesões cardíacas através de técnicas mais sensíveis (JONES et al. 1993; HIGUCHI et al.1993; YOUNÈS-CHENNOUFI et al; 1998), fala a favor da importância do parasito e de seus antígenos na determinação das lesões da fase crônica.

1.4- O papel do parasito e de seus antígenos

O início da doença de Chagas ocorre com a invasão do *T. cruzi* no organismo do hospedeiro vertebrado, dando origem a uma inflamação, com a presença dos parasitos nos tecidos, sendo posteriormente a infecção aguda controlada por uma resposta imune do hospedeiro.

A hipótese da autoimunidade para explicar as lesões da doença de Chagas, surgiu pelo fato dos parasitas serem dificilmente detectados nos locais de maior destruição tecidual, no hospedeiro cronicamente infectado. Análises histopatológicas de tecidos de hospedeiros cronicamente infectados com o

T. cruzi apresentaram células inflamatórias e fibrose, com poucos relatos de parasitas, nos locais de intensa inflamação (ANDRADE, 1999). Essas observações têm sido usadas como um forte argumento a favor da hipótese autoimune para justificar os danos teciduais na fase crônica da doença. Entretanto quando são usadas técnicas mais sensíveis, os parasitas podem ser facilmente detectados e correlacionados com a destruição tecidual. JONES et al. (1993) através da técnica de reação em cadeia de polimerase (PCR), detectaram a presença do DNA do *T. cruzi* em tecido cardíaco de pacientes com historia de cardiopatia chagásica crônica, mas não observaram em pacientes com sorologia positiva, sem evidência de inflamação cardíaca. YOUNÈS-CHENNOUFI et al (1998) obtiveram resultados semelhantes utilizando a técnica de imunofluorescência, onde evidenciaram a presença de antígenos do *T. cruzi*, através da marcação dos antígenos de superfície do parasita, demonstrando a presença destes nos tecidos durante a fase crônica da infecção experimental.

Demonstrando que a estimulação antigênica persiste na fase crônica da doença, mesmo sem a detecção morfológica do parasita, HIGUCHI et al. (1993) analisando 6 diferentes regiões do coração humano, constataram a presença de antígenos do *T. cruzi* em 7 dos 8 corações mapeados através da técnica de imunohistoquímica, observando uma correlação entre a presença do antígeno do *T. cruzi* com moderado ou severo infiltrado inflamatório, conseqüentemente com as lesões ocorridas na fase crônica da doença.

A presença de antígenos específicos do parasita também foi detectada em células dendríticas intersticiais do miocárdio, na miocardite aguda e crônica

de cães infectados pelo *T. cruzi*, sugerindo que as mesmas são responsáveis pela estimulação antigênica de linfócitos CD4⁺ (ANDRADE, 2000), e manutenção da miocardite na doença de Chagas.

A relação entre a persistência do parasito em órgãos específicos e a severidade das lesões ocasionadas nesses órgãos, foi observada em pacientes com a doença de Chagas crônica (HIGUCHI et al; 1993).

Nos estudos de VAGO et al. (1996), pôde ser detectada a presença do DNA do parasita em tecido esofágico de pacientes soropositivos, com relato de megaesôfago ou lesões inflamatórias no esôfago, mas não no esôfago de pacientes que morreram com cardiopatia chagásica, sem evidencia dos megas. A detecção do DNA do parasita, no coração, também pode ser identificada em indivíduos com a doença cardíaca, mas não foi observado quando analisado o tecido esofágico (JONES et al. ;1993).

A carga parasitaria no tecido é dependente da eficácia da resposta imune do hospedeiro na eliminação ou limitação da replicação do parasita (ZHANG et. al.; 1999). Quando o controle imune não é eficiente, a carga parasitaria e a inflamação, aumentam o potencial para os danos teciduais (TARLETON; 2003). A supressão da resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi*, resulta em um significativo aumento da carga parasitária na fase aguda ou reativação da doença na fase crônica. Essa reativação em humanos é mais freqüente em indivíduos transplantados, que utilizam drogas imunossupressoras (ALMEIDA et al., 1996), ou em pacientes portadores do vírus da imunodeficiência adquirida – HIV, que possuem o sistema imunológico debilitado, ocasionando uma severa meningoencefalite

com áreas de necrose associada com o parasitismo tecidual e a exacerbação da miocardite (ROCHA et al., 1994 & SARTORI et al., 1995).

Um dado importante a favor da relação entre a persistência do parasito com a severidade da doença, é a evidencia em casos humanos e em modelos experimentais, de que a reinfecção ou a contínua exposição, devido à permanência nas áreas endêmicas, aumenta a severidade da doença (STORINO et al. 2002 & BUSTAMANTE et al. 2003). Estudo experimental em camundongos com tríplice infecção demonstrou uma significativa exacerbação das lesões inflamatórias no miocárdio e músculo esquelético pelas sucessivas reinoculações (ANDRADE et al., 2006).

Uma outra forma de investigar o efeito da carga parasitaria sobre os níveis das lesões histopatologicas, é através do uso de drogas antiparasitárias na fase cônica da doença experimental. O tratamento especifico, é capaz de reduzir a carga parasitaria e consequentemente a severidade das lesões em animais experimentais (ANDRADE et al.; 1976, 1989) e em humanos (VIOTTI et al. ;1994).

Se a doença de Chagas fosse uma doença autoimune, que não dependesse da contínua presença do parasita, porque a severidade da mesma aumentaria, quando o individuo sofre reinfecções? (MACEDO et. al, 1976) Como explicar o decréscimo da morbidade em grupos de pacientes que fizeram tratamento quimioterapico com drogas antiparasitárias? (VIOTTI et. al., 1994) Por que os pacientes que soro negativaram, com o passar do tempo, após o tratamento especifico não desenvolvem a doença autoimune? Como explicar a regressão das lesões fibrotico-inflamatório em camundongos tratados? (ANDRADE et. al., 1991) Essas são perguntas que

fortalecem a hipótese da persistência do parasito para o desenvolvimento das severas lesões encontradas na doença de Chagas crônica.

A doença de Chagas não apresenta a maioria dos principais critérios para ser considerada como uma doença autoimune (BENOIST & MATHIS, 2001). A grande variação das idades dos pacientes no começo das manifestações clínicas, a falta de períodos de exacerbação e remissão, a ausência típica de um elevado e constante nível de auto-anticorpos e a falta de envolvimento de outros órgãos, diferenciam a doença de Chagas de um processo autoimune (ANDRADE, 1999).

Embora ainda não exista um tratamento eficaz, é válido incentivar o tratamento quimioterápico capaz de reduzir a carga parasitária e com isso, a progressão da doença, como indicam os dados experimentais (ANDRADE et. al., 1991).

1.5- Autoimunidade na Doença de Chagas

Apesar de muitos estudos, o mecanismo de desenvolvimento das lesões na doença de Chagas ainda permanece em constante debate. A difícil detecção dos parasitas nos locais de maior destruição tecidual, sugere que a resposta patogênica na forma cardíaca da doença de Chagas, não seja apenas contra antígenos do parasita, mas também contra antígenos próprios, que podem contribuir para estimulação das células T, que são requisitadas na formação das lesões teciduais. GIRONES et al. (2001, 2003) transferiram células T purificadas do baço de camundongos cronicamente infectados para animais normais, induzindo inflamação no

miocárdio dos camundongos receptores, provocando, com isso, a produção de lesão na ausência do parasita. Esses achados indicam que as células T autoreativas ativadas durante a infecção são suficientes para induzir miocardite no camundongo.

Sugerindo que a autoimunidade está diretamente envolvida na rejeição de transplantes cardíacos em animais cronicamente infectados, RIBEIRO-DOS-SANTOS et al. (1992), investigaram a autoreatividade contra o coração de camundongos recém-nascidos transplantado na orelha de camundongos singênicos cronicamente infectados com *T. cruzi*, demonstrando a rejeição do órgão transplantado. Não ocorreu rejeição quando o transplante foi feito em animais livres de infecção, porém a transferência de células CD4 de camundongos cronicamente infectados determina rejeição nos camundongos normais. Os resultados indicam que a rejeição do transplante em animais cronicamente infectados é mediada por células T CD4⁺ e o estado de tolerância pode ser restabelecido se os animais forem tratados, antes do transplante, com anticorpos anti-CD4. Em contradição, TARLETON et al. (1997) verificaram em diferentes linhagens de camundongos, que a rejeição do transplante singênico não ocorre em camundongos cronicamente infectados, e que essa rejeição só foi observada, quando o transplante foi feito em animais na fase aguda da infecção, onde se detectaram parasitas no coração transplantado ou, quando o parasita foi injetado diretamente no tecido transplantado, concluindo que a resposta imune contra o *T. cruzi* foi a responsável por essa rejeição.

A resposta imune contra antígenos próprios na doença humana e experimental tem sido bastante estudada. As lesões teciduais causados pela infecção com *T. cruzi* têm ocasionado o aparecimento de autoanticorpos com habilidade de induzir alterações patológicas características da doença de Chagas crônica. Entretanto a presença desses autoanticorpos não tem sido claramente mostrada como a causa ou como consequência da doença.

A respeito da autoimunidade como a principal causa para a doença de Chagas, supõe-se que exista uma reação cruzada entre as respostas imunes contra antígenos próprios e antígenos do parasita. Há uma possibilidade de que, a autoimunidade seja induzida pelo compartilhamento de epitópos entre o parasita e o hospedeiro (mimetismo molecular). As lesões teciduais são inicialmente causadas pela infecção, ocasionando a destruição do miocárdio e com isso, a liberação da miosina que apresenta epítópos com seqüências de aminoácidos semelhantes aos epítópos B13 do *Trypanossoma cruzi* (CUNHA-NETO et al., 1995). Células mononucleares sanguíneas de pacientes com cardiopatia chagásica produziram IFN- γ , mas exibiram um decréscimo nos níveis de IL-4 após estimulação *in vitro* com miosina cardíaca B13. Esses resultados indicam um padrão para produção de citocinas do tipo Th1, sugerindo que a destruição cardíaca pode ser modulada por citocinas inflamatórias provocadas pela miosina cardíaca B13 (CUNHA-NETO et al., 2001).

Existem estudos relatando que a indução de tolerância imunológica para antígenos cardíacos, pode reduzir as lesões teciduais após a infecção com o *T. cruzi*. A respeito desse assunto, PONTES-DE-CARVALHO et al. (2002)

utilizaram camundongos BALB/c que foram tolerizados com a administração de anticorpos monoclonais anti-CD4 e frações ricas em miosina antes da infecção com a cepa Colombiana, demonstrando que os corações que foram tolerizados, não apresentaram ou tiveram uma discreta miocardite em oito meses após a infecção, entretanto, os animais não tolerizados tiveram uma intensa inflamação. Segundo os autores, esses resultados demonstram o papel da autoimunidade na cardiopatia chagásica crônica, sugerindo que a prevenção ou inibição pode ser feita através da indução da tolerância a antígenos cardíacos.

O papel da miosina tem sido evidenciado em outras miocardiopatias onde se detectou autoimunidade. DONERMEYER et al. (1995) e ROSE et al. (1996) investigaram a miocardite causada pelo vírus Coxsackie B3. Após a infecção viral em camundongos, o RNA do vírus pode ser detectado nos miocitos, transformando posteriormente a miosina em um autoantígeno capaz de provocar as lesões teciduais. Camundongos da linhagem A/J, que são utilizadas para estudos com autoimunidade em resposta à imunização com miosina ou infecção com o vírus Coxsackie B3, são também usadas na infecção com o *T. cruzi*. LEON et al. (2003) estudaram a contribuição da miosina, na inflamação e destruição do tecido cardíaco na fase aguda da doença, concluindo que a tolerização com a miosina não afeta a miocardite nos animais infectados, mas reduz a inflamação e a fibrose nos camundongos que foram imunizados com miosina. Em contraste, a tolerização com *T. cruzi* induziu a diminuição da inflamação cardíaca, mas aumentou a carga parasitária, sendo esta, a responsável pela elevada mortalidade dos animais. Esses resultados indicam que a miosina não

contribui significativamente para as lesões cardíacas, e a resposta imune específica para o parasita é importante no controle da carga parasitária e da inflamação, na infecção aguda com o *T. cruzi*.

Apesar da possível influência dos mecanismos de autoimunidade, nas lesões teciduais na doença de Chagas, o papel do parasita deve ser melhor estudado, principalmente se considerarmos que o tratamento curativo, poderá proporcionar a regressão das lesões (ANDRADE et al., 1991) e uma melhora no quadro clínico dos pacientes chagásicos.

1.6- Apresentação de antígenos pelas Células Dendríticas Intersticiais do Miocárdio (CDI)

As células dendríticas são uma população de células heterogêneas originadas da medula óssea, que após sua maturação podem residir tanto nos tecidos linfóides como nos não linfóides (HART & McKENZIE, 1990). As células dendríticas são encontradas nos tecidos num estágio imaturo e respondem a vários quimiotáticos no local da inflamação. Uma vez ativada pelos microorganismos e estímulos inflamatórios, elas capturam e processam antígenos, migrando para os linfonodos ou para o baço, onde irão ativar as células T *naïves* antígeno – específica. Durante a migração, as células dendríticas, aumentam a expressão das moléculas de MHC classe II, moléculas costimulatórias (CD40, CD80, CD86) e de adesão (LFA, ICAM), fortalecendo a ligação com a célula T e induzindo a produção de citocinas no local (HART & McKENZIE, 1990).

As células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDI) são células alongadas, uniformemente distribuídas no interstício cardíaco, possuem o citoplasma compacto e geralmente com dois ou três prolongamentos delgados (ANDRADE et al., 2000). Elas são capazes de capturar antígenos e migrar para a zona T do baço, onde ativam linfócitos T antígenos específicos.

A persistência das lesões inflamatórias na fase crônica da doença pode estar correlacionada com a apresentação de antígenos do *T. cruzi* capturados pelas células dendríticas intersticiais do miocárdio e expressos na membrana associados as moléculas de MHC classe II. ANDRADE et al. (2000) utilizando o modelo experimental do cão, detectaram através de imunohistoquímica, a presença de antígenos parasitários na membranas de CDIs e um significativo aumento na concentração dessas células nas áreas cardíacas de infiltrado inflamatório e nas proximidades de células parasitadas, em animais na fase aguda e crônica da doença de Chagas, sugerindo uma direta relação entre o número de células dendríticas intersticiais e a intensidade da inflamação. A fibrose e as lesões inflamatórias vistas na miocardite chagásica crônica, provavelmente envolvem estímulos constantes da imunidade celular pela apresentação de antígenos do parasito pelas células dendríticas aos linfócitos T.

VAN OVERTVELT et al. (1999) mostraram que as células dendríticas podem ser infectadas pelo *T. cruzi*, ocasionando uma diminuição na produção de IL-12 e TNF- α e a redução da expressão das moléculas de HLA-DR e das moléculas costimulatorias CD40, sugerindo que a inibição dessas moléculas de superfícies pelo *T. cruzi* é uma estratégia de escape, do sistema imunológico para a sobrevivência e permanência do parasito no hospedeiro.

Investigando a influência de duas cepas do *T. cruzi*, que diferem no grau de virulência e patogenicidade, sobre as células dendríticas, e a expressão do complexo MHC classe II e das moléculas coestimulatórias na capacidade de estimular os linfócitos T, SOTO et al. (2003) demonstraram que a modulação da expressão da molécula de MHC classe II pelas células dendríticas intersticiais depende da virulência da cepa. Cepas mais virulentas inibem ou reduzem a expressão da molécula de MHC classe II na superfície da célula apresentadora de antígeno (APC), enquanto cepas menos virulentas preservam a maturação das células dendríticas, permitindo que o hospedeiro possa melhor controlar a carga parasitaria e sobreviver na fase aguda. Esses resultados sugerem que a infecção pelo *T. cruzi* pode modular a função da APC.

As células dendríticas foliculares do baço diferem das células dendríticas intersticiais do coração. Estas células estão nos centros germinativos dos folículos linfóides e apresentam antígenos do *T. cruzi* às células B ou células de memória. Estudos experimentais associados com o tratamento quimioterápico na doença de Chagas, não têm estabelecido uma correlação entre a cura parasitológica e a negatização da sorologia. O tratamento de camundongos na fase aguda e crônica da infecção com o Nifurtimox ou o Benzonidazol, resultou em uma grande proporção de cura parasitológica, dependendo da cepa do *T. cruzi* utilizada. Entretanto, a sorologia desses animais permaneceu positiva por seis meses após o término do tratamento (ANDRADE et al. 1985, 1989). Com isso em 1991, ANDRADE et al. detectaram em camundongos cronicamente infectados, através da técnica de imunoeletronmicroscopia, a presença de antígenos parasitários do *T. cruzi*,

expressos na membrana de células dendríticas foliculares do baço. A persistência desses antígenos associados às células dendríticas foliculares, em camundongos parasitologicamente curados pelo uso de quimioterápicos, foi considerado o responsável pela permanência de sorologia positiva, através da sensibilização de linfócitos B, que são responsáveis pela memória imunológica.

1.7- Quimioterapia na Doença de Chagas

A obtenção de cura para a doença de Chagas permanece um problema em aberto porque ainda não existe no mercado uma droga eficaz na eliminação total dos parasitas. Atualmente, o tratamento da doença de Chagas está restrito a duas drogas nitro-heterocíclicas: o nifurtimox (3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4 tiazina-1,1-dióxido) introduzido na clínica em 1965, e que teve sua produção descontinuada no Brasil, e o Benzonidazol (N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) introduzida na década seguinte (LUQUETTI, 1997).

Nifurtimox e Benzonidazol são ativas na fase aguda da doença de Chagas, porém as tentativas de tratamento em humanos na fase crônica têm resultados controversos. Estudos experimentais mostraram diferenças de suscetibilidade de diferentes cepas aos quimioterápicos, registrando cepas de alta, média e baixa suscetibilidade (ANDRADE et al., 1976, 1977, 1985). As cepas do Biodema tipo III mostraram alta resistência ao Nifurtimox e ao Benzonidazol (ANDRADE et al.; 1975, 1977), enquanto a cepa 21SF do tipo II e seus clones mostraram alta susceptibilidade ao tratamento quimioterápico com o Benzonidazol, chegando os clones 21SFC3 e C4 apresentarem 100% de cura

parasitológica (CAMPOS et al.; 2005). Também FILARDI e BRENER (1987) registraram diferenças de suscetibilidade e resistência entre cepas ao tratamento quimioterápico.

Na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* existe uma resposta aos quimioterápicos de reconhecida ação anti-parasitária, ocorrendo uma diminuição do parasitismo e conseqüentemente das lesões inflamatórias no miocárdio e músculo esquelético em camundongos tratados com essas drogas (ANDRADE et al.; 1976, 1989).

Analisando pacientes que foram submetidos ao tratamento específico com o Benzonidazol ou o Nifurtimox, e comparando com os que não receberam a droga, FABBRO de SUASNÁBAR (2000), observaram uma melhora clínica desses pacientes, com diminuição dos títulos sorológicos.

Estudos patológicos sobre a reversão da fibrose em camundongos cronicamente infectados com o *T. cruzi*, ANDRADE (1991), demonstraram através de estudos ultra-estruturais, a relação da fibrose com o processo inflamatório, indicando a diminuição das lesões pelo tratamento específico. Essas observações podem ser relevantes para o tratamento de indivíduos assintomáticos e cronicamente infectados.

O Nifurtimox e o Benzonidazol apresentam sérios efeitos colaterais, com danos principalmente no sistema nervoso central e no trato gastrointestinal, causando inapetência, náuseas, vômitos, perda de peso, dermatopatia e polineuropatias, por isso em alguns casos humanos o tratamento é temporariamente suspenso ou mesmo abandonado (CASTRO; 2000).

1- HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO

Dados da literatura comprovam que o tratamento etiológico curativo na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, em camundongos experimentalmente infectados determina a regressão das lesões fibróticas inflamatórias do miocárdio e de músculo esquelético (ANDRADE et. al., 1991). Este fato foi atribuído à eliminação do agente etiológico nos camundongos curados. Entretanto foi verificada em uma percentagem dos animais tratados, a persistência de lesões inflamatórias focais, residuais, em miocárdio, mesmo nos casos em que os testes de cura parasitológicos deram resultados negativos. Nos camundongos tratados e não curados, há também nítida diminuição das lesões, o que é atribuído à diminuição da carga parasitária, sendo escasso ou ausente o parasitismo do coração ao exame histopatológico, porém focos inflamatórios estão freqüentemente presentes.

Baseados nestes fatos, elaboramos as seguintes hipóteses:

1) Nos animais com testes de cura negativos, a persistência de lesões residuais, especialmente no miocárdio, estaria relacionada à presença de antígenos parasitários sequestrados em células dendríticas intersticiais do miocárdio, as quais, pela sua capacidade migratória, são capazes de estimular as células TCD4 do baço, determinando lesões resultantes do mecanismo de hipersensibilidade tardia no miocárdio (ANDRADE ET AL. 2000)

2) Nos camundongos não curados, com diminuição da carga parasitária, parasitos remanescente podem se multiplicar e determinar lesões focais decorrentes de destruição intracelular, com presença de antígenos particulados em focos de inflamação do miocárdio.

3- JUSTIFICATIVA

Afim de contribuir para esclarecer o papel dos antígenos parasitários na patogenia da forma crônica da doença de Chagas, foi elaborado o presente trabalho experimental. Para isto uma das possibilidades de estudo seria a de eliminar os parasitos do animal experimental e verificar a influência desta eliminação nas lesões tissulares. A presença de lesões inflamatórias residuais em camundongos experimentalmente tratados e curados, sugeriu a hipótese de que antígenos parasitários poderiam estar envolvidos na manutenção destas lesões. Levando em conta as diferenças de suscetibilidade das cepas do *T. cruzi*, ao tratamento quimioterápico, utilizamos no presente trabalho a cepa Colombiana (Biodema Tipo III) de baixa suscetibilidade ao Benzonidazol e um clone da cepa 21 SF (Tipo II) clone 21SF- C3, altamente suscetível. Levando em conta, que há uma percentagem de camundongos que não são curados pelo tratamento, justifica-se investigar, no presente trabalho a presença de antígenos parasitários no miocárdio, não só nos animais curados, nas células dendríticas intersticiais do miocárdio, como nos camundongos não curados, em focos inflamatórios, sob a forma de antígenos particulados resultantes de desintegração de parasitos intracelulares remanescentes após o tratamento. Afim de comprovar a cura nos animais tratados, diferentes testes parasitológicos convencionais foram feitos. Deste modo, a comprovação de antígenos no coração, poderá contribuir para o esclarecimento sobre a patogenia das lesões residuais após o tratamento quimioterápico específico, permitindo correlacioná-las com os testes de cura parasitológicos e a resposta sorológica específica.

4- OBJETIVO GERAL

Investigar a presença de antígenos parasitários nos tecidos de camundongos infectados com duas diferentes cepas do *T. cruzi*, tratados e não tratados com Benzonidazol e correlacionar a sua presença com o processo inflamatório e com a positividade da sorologia.

4.1 Objetivos específicos

1- Comparar o processo de evolução e regressão das lesões teciduais em coração e músculo esquelético de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, tratados e não tratados com Benzonidazol.

2 – Investigar se a presença de antígenos do *T. cruzi* está relacionada com a persistência de lesões inflamatórias residuais do miocárdio.

3- Demonstrar que células dendríticas intersticiais do miocárdio estão relacionadas com apresentação de antígenos parasitários, favorecendo a manutenção das lesões teciduais.

4 – Avaliar os títulos sorológicos de anticorpos específicos anti- *T. cruzi* pós-tratamento dos animais tratados e dos controles não tratados.

5- MATERIAL E MÉTODOS

5.1 Animal experimental:

O presente estudo foi realizado em camundongos Suíços com idade de 30 dias, pesando entre 15 a 20g.

5.2 Cepas utilizadas:

Os animais foram infectados com a cepa Colombiana (Biodema Tipo III , *T. cruzi* I) caracterizada como resistente ao tratamento com Benzonidazol ou com o clone 21SF-C3 da cepa 21SF (Biodema Tipo II, *T. cruzi* II), susceptível ao tratamento.

5.3 Inóculo:

O inóculo foi de 10^4 formas tripomastigotas sangüícolas, obtidas de camundongos previamente infectados, administrado por via intraperitoneal.

5.4 Grupos experimentais:

Para o desenvolvimento desse trabalho, os animais infectados foram divididos em dois grupos independentes. O Grupo A foi composto pelos camundongos infectados com a cepa Colombiana e o Grupo B pelos camundongos infectados com o clone 21SF-C3.

No Grupo A, foram inoculados 177 camundongos, sendo que 42 chegaram ao estágio crônico.

O Grupo B foi constituído por 102 camundongos Suíços, infectados com o Clone 21SF-C3. Destes, 58 camundongos sobreviveram até a fase crônica.

Os camundongos cronicamente infectados dos Grupos A e B foram divididos respectivamente em dois subgrupos (Subgrupos 1 e 2). O Subgrupo 1, formado pelos camundongos infectados e sacrificados com 150 dias pós-término do tratamento e o Subgrupo 2, formado pelos camundongos infectados e sacrificados com 200 dias pós-término do tratamento. Para controle, foram utilizados camundongos normais não infectados.

6- METODOLOGIA

Os animais foram diariamente acompanhados através da contagem dos parasitas sanguíneos e pelo registro da mortalidade cumulativa, durante 50 dias.

6.1- Parasitemia:

A parasitemia na fase aguda da infecção foi avaliada pela contagem do número de formas tripomastigotas no sangue periférico obtido pela secção da cauda do animal infectado, examinado entre lâmina e lamínula em 50 campos microscópicos de grande aumento (400X). Os resultados foram avaliados pela média obtida ao exame de 5 camundongos em cada grupo.

Com o intuito de diminuir a carga parasitária e controlar a mortalidade, todos os camundongos infectados com a cepa Colombiana foram tratados do 20º ao 23º dia e os infectados com o clone 21SFC3 , foram tratados, do 12º ao 14º dia de infecção, com o Benzonidazol , na dose de 100mg/kg/dia.

6.2- Mortalidade:

Foi avaliada diariamente durante o curso da infecção em todos os grupos experimentais e a mortalidade cumulativa foi avaliada pelo número de animais mortos em um período de 50 dias pós-infecção.

6.3- Tratamento:

O tratamento dos animais do Grupo A, infectados com a cepa Colombiana, e do Grupo B, infectados com o Clone 21SF-C3, foi iniciado no período de 90 dias (clone 21SF-C3) e 120 dias (Cepa Colombiana) após infecção, quando já se apresentavam na forma crônica da infecção. O Benzonidazol (N-benzyl-2-nitro-1-imidazolacetamida) foi administrado em suspensão de goma arábica, por via intragástrica. A dose foi de 100 mg/Kg/ dia 5 vezes por semana, durante 90 dias.

6.4- Critérios de cura:

A cura pós-tratamento foi estabelecida através dos seguintes critérios: 1) Testes parasitológicos com objetivos de identificar a presença do parasito no sangue periférico dos animais tratados e nos controles não tratados. 2) Testes sorológicos de imunofluorescência indireta para avaliar os títulos de anticorpos específicos, considerando o título mínimo de positividade de 1:20.

6.5- Testes de cura parasitológicos:

Os animais foram submetidos após o término do tratamento aos testes de cura parasitológico: exame direto da parasitemia após imunossupressão, hemocultura e subinoculação do sangue em camundongos recém-nascidos.

- **Parasitemia:** Os camundongos tratados e os controles não tratados com parasitemia negativa ao exame direto do sangue periférico, foram imunossuprimidos com duas doses de Ciclofosfamida de 250mg/Kg (uma dose semanal), para reativar a infecção e acompanhados três vezes por semana pelo exame da parasitemia.
- **Hemocultura:** 0,5mL de sangue dos animais sacrificados foi cultivado em meio de cultura de Warren (WARREN, 1960) e mantido a uma temperatura de 37°C, sendo acompanhado durante 60 dias.
- **Subinoculação:** O sangue dos animais sacrificados foi inoculado em camundongos recém-nascidos de 05 dias, sendo a parasitemia acompanhada durante 30 dias ou até a positivação.

6.6- Sorologia:

O soro dos animais dos diferentes grupos foi coletado para titulação de anticorpos pela técnica de imunofluorescência indireta.

As amostras foram centrifugadas a 10.000 rpm durante 3 minutos coletando-se o soro. Em seguida foram preparadas diluições do soro em PBS de 1/10 a 1/1280 em placas de múltiplos poços. Lâminas contendo 10 poços foram previamente preparadas utilizando como antígeno formas de cultura do *T. cruzi* em meio Warren, fixadas em formol. Sobre as formas de cultura foram colocados 10µl do soro diluídos em PBS 1/10 a 1/2560. As lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C durante 30 minutos e em seguida, lavadas

3 vezes com PBS pH 7.4 durante 5 min. Posteriormente foram adicionados sobre cada poço, 10µl do anticorpo IgG anti-camundongo, ligado à fluoresceína (Sigma), incubando as lâminas em câmara úmida durante 30 min. As lâminas após 3 lavagens com PBS pH 7.4 durante 5 min foram secadas e montadas em tampão Carbonato / Bicarbonato pH 9.6 (0,02M) e analisadas em microscópio Zeiss de epifluorescência. O título mínimo de positividade foi considerando o de 1:20.

6.7- Índice de cura dos camundongos tratados com Benzonidazol:

Os índices de cura foram estabelecidos pela combinação dos resultados parasitológicos com os títulos de imunofluorescência.

6.8- Eutanásia:

Os camundongos sobreviventes foram submetidos à eutanásia após anestesia com Hidrato de Cloral a 10%, com 150, 200 dias após o término do tratamento. Os órgãos foram submetidos a perfusão pela injeção no ventrículo esquerdo de PBS gelado após secção da veia porta.

6.9- Criopreservação:

Fragmentos de coração, músculo esquelético e baço foram criopreservados em Tissue-Tek (OCT compound-Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, USA) e armazenados a uma temperatura de -70°C.

6.10- Histopatologia:

Fragmentos do coração, músculo esquelético e baço foram fixados em formol Milloning e incluídos em parafina para obtenção de secções de 5µm, corados em Hematoxilina e Eosina para estudo histopatológico.

O estudo histopatológico foi feito em camundongos cronicamente infectados com o *T. cruzi*, comparando-se a intensidade das lesões fibrótico-inflamatórias do miocárdio e de músculo esquelético entre os grupos controles de infecção, não submetidos a tratamento, e em grupos tratados com o Benzonidazol.

Foi feita uma análise semi-quantitativa onde a intensidade das lesões inflamatórias foi expressa em +, ++ e +++ com a seguinte correspondência : (+) *lesão discreta*, correspondendo a escasso e difuso infiltrado mononuclear e/ou pequenos focos de infiltração mononuclear; (++) *lesão moderada*, representada por difuso infiltrado mononuclear mais acentuado do que no grau + e focos inflamatórios localizados, com lesão focal de miócito; (+++) *lesão intensa* que corresponde a denso infiltrado difuso e/ou infiltrados focais extensos e confluentes, correspondendo a necrose de miócitos. Casos representativos de fibrose, nos dois subgrupos, foram selecionados para a obtenção de secções coradas com Picro-sírius.

6.11- Estudo Imunohistoquímico

Para a avaliação da presença de antígenos parasitários do *T. cruzi* no miocárdio dos animais dos diferentes grupos experimentais, foram utilizados

para o grupo infectado com a cepa Colombiana 13 casos controles não tratados e 13 casos tratados com Benzonidazol e para o grupo infectado com o clone 21SF-C3, 8 casos controles não tratados e 10 casos tratados. Os casos foram selecionados pela intensidade dos infiltrados inflamatórios ao exame histopatológico. A avaliação foi realizada utilizando as técnicas da peroxidase e da imunofluorescência indireta.

6.11.1 - Pesquisa de antígenos parasitários do *T. cruzi* nas miocelulas cardíacas e no interstício ou seqüestrados em células dendríticas intersticiais do miocárdio pela técnica da peroxidase:

Os cortes histológicos em parafina, com 5 µm de espessura, colocados em lâminas com poli-lisina, foram utilizados para marcação de antígenos parasitários do *T. cruzi* através da técnica de imunomarcção com peroxidase por método imunohistoquímico.

Os cortes foram desparafinizados antes do início da reação. Foram feitos inicialmente 3 banhos em PBS de pH 7.4 e em seguida o bloqueio da reação com H₂O₂ a 3% diluído em metanol. As lâminas foram lavadas em água destilada e depois em PBS. Posteriormente foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado a 10% durante 15 minutos à temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS com Tween 20 a 2%. O anticorpo primário anti-*T.cruzi* produzido em coelho foi diluído em PBS com Tween 20 a 2% em uma diluição de 1:600 e colocado sobre o corte durante 30 minutos a 37°C. Depois os cortes passaram por banhos em PBS com Tween a 2%. Foi aplicado o soro de cabra normal inativado a 10% por 20 minutos à

temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em PBS, acrescentando em seguida o anticorpo secundário IgG de cabra anti-coelho conjugado à peroxidase (Sigma), com diluição de 1:800 em PBS, incubando a 37°C por 30 minutos. Após o anticorpo secundário, as lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS. A revelação foi feita com DAB (25mg/mL) a 24% + DMSO a 10% + H₂O₂ a 1% e a coloração do núcleo com Verde Metila a 1%. As lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá. Para controle da reação de imunohistoquímica com anticorpo anti-*T. cruzi*, foram utilizados secções em parafina de coração de camundongos na fase aguda da infecção com a cepa Colombiana, com intenso parasitismo.

6.11.2 - Imunofluorescência *in situ* para antígenos do *T. cruzi*:

Cortes histológicos de 5 µm em parafina em lâmina recoberta com poli-lisina, foram utilizados para identificação de antígenos parasitários do *T. cruzi* através da técnica de imunofluorescência *in situ*.

Os cortes foram inicialmente desparafinizados e as lâminas lavadas em PBS pH 7.4 por 10 minutos. Foi feito o bloqueio das ligações inespecíficas com leite desnatado a 10% durante 20 minutos. As lâminas foram lavadas em PBS e acrescentadas o soro de cabra normal e inativado a 10% por 30 minutos. Posteriormente foi diluído o anticorpo primário anti-*T. cruzi* produzido em coelho em PBS + BSA a 3% (1:650) e incubado a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram lavadas 3 vezes em PBS e acrescentado o anticorpo anti-IgG de coelho produzido em cabra, conjugado a FITC (Sigma) numa diluição de 1:160. Os cortes foram incubados por 30 minutos a 37°C e depois lavados novamente

em PBS. As lâminas foram montadas em tampão Carbonato / Bicarbonato pH 9.6 (0,02M) e analisadas no microscópico acoplado com lâmpada fluorescente.

6.11.3 – Controle da presença de células dendríticas intersticiais do miocárdio pelo uso de anticorpo anti-MAC:

Cortes de músculo cardíaco de 5 micra em parafina em lâmina cobertas com polilisina, foram utilizados para marcação das células dendríticas intersticiais do miocárdio pela técnica de imunohistoquímica.

Os cortes foram primeiramente desparafinizados e mergulhados em PBS pH 7.4. Foi feito o bloqueio da reação com H₂O₂ a 3% diluído em metanol. As lâminas foram lavadas em água destilada e depois em PBS. Foi realizada a recuperação antigênica dos cortes mergulhados em tampão citrato pH 6.0 utilizando o aparelho de microondas em diferentes tempos e potências (5 minutos em potência 8, 3 minutos em potência 6 e 2 minutos em potência 4). As lâminas foram resfriadas em banho Maria e depois lavadas em PBS para a aplicação do anticorpo primário produzido em rato anti-camundongo MAC 3 (Pharmingen) com diluição de 1:5. As lâminas foram incubadas durante a noite na câmara úmida a 4°C. Após lavagens em PBS, foi acrescentado o anticorpo secundário anti-rato ligado à peroxidase na diluição de 1:300 por 30 minutos a 37°C. Em seguida os cortes foram mergulhados em PBS. A revelação foi feita com DAB (25mg/mL) a 24% + DMSO a 10% + H₂O₂ a 1%. A coloração do núcleo foi feita com Verde Metila a 1% e as lâminas foram montadas com bálsamo do Canadá.

7 - RESULTADOS

7 - I – INFECÇÃO CRÔNICA COM A CEPA COLOMBIANA

7-I.1. Análise da Parasitemia:

Os camundongos infectados com a cepa Colombiana apresentaram uma curva parasitemica com picos irregulares entre o 20º e o 30º dia de infecção e mais elevados no 35º, negativando a partir do 45º dia. (Figura 1).

7-I.2 Índice da Mortalidade cumulativa:

A mortalidade dos camundongos foi de 70% até 50 dias de infecção, no grupo infectado com a cepa Colombiana. (Figura 2).

7-I.3 Resultado dos testes de cura parasitológicos:

Os camundongos sacrificados com 150 dias após o termino do tratamento (sub-grupo 1) apresentaram 7,14% de cura no subgrupo dos animais tratados e 0,0% de cura nos controles não tratados. Os animais sacrificados com 200 dias após o termino do tratamento (sub-grupo 2), demonstraram 9,09% de cura no sub-grupo dos animais tratados e 0,0% nos controles não tratados (Tabelas.1 e 2).

7-1.4 Análise Histopatológica

O estudo histopatológico foi feito em 42 camundongos infectados com a cepa Colombiana, que haviam sobrevivido à fase crônica, dos quais 25 foram submetidos ao tratamento a partir do 120º dia de infecção e 17 serviram de controles não tratados. Os camundongos deste grupo foram sacrificados em dois pontos: 150 e 200 dias após o término do tratamento constituindo respectivamente os subgrupos 1 e 2.

7-1.4.1 Subgrupo 1 - Camundongos sacrificados 150 dias após o término do tratamento – (Tabela 1 e 2)

7-1.4.1.1. Controles não tratados

Na maioria dos casos (7/8) havia lesões inflamatórias moderadas (++) no miocárdio e em 1 caso as lesões eram intensas (+++). O miocárdio apresentava infiltrado mononuclear intersticial difuso com adensamentos focais na presença de parasitos intracelulares (Figura 3-A,B). Havia também densos infiltrados inflamatórios mononucleares subepicárdicos e subendocárdicos, com presença de arterite focal. Depósitos colagênicos com adensamentos focais variando de discreto a intensos estavam presentes em atrios e foram identificados pela coloração com o método do Picro-Sirius. Nos ventrículos o depósito de colágeno estava presente em geral no conjuntivo peri-vascular ou em áreas de destruição de células cardíacas e substituição por tecido fibroso. (Figura 5-A) ou em feixes densos no interstício (Figura 5-B).

Músculo esquelético com lesões intersticiais difusas e focais, na maioria dos casos moderadas; em um caso as lesões eram intensas, caracterizadas pela presença de infiltrados mononucleares densos em torno de feixes vasculares e presença de arteriolite (Figura 3-C) A presença de parasitos foi detectado em 2/8 casos.

7-I.4.1.2 Camundongos tratados com Benzonidazol

As alterações de miocárdio e de músculo esquelético eram na maioria dos casos (9/13) discretas (+), representadas no coração, por discreto infiltrado mononuclear difuso e infiltrados focais perivasculares (Figura 4-A), com arteriolite, em 2 casos. Em 4/13 casos as lesões eram moderadas (++) com infiltrado difuso mais acentuado do que nos demais. Foi observada, em alguns casos, a presença de depósito colagênico frouxo e fragmentado, sugerindo processo regressivo da fibrose (Figura 4-B). A coloração pelo Picro-Sirius mostrou em geral depósito colagênico frouxo, difuso, com finos filamentos na parede atrial, e depósitos em áreas focais e peri-arteriolares, pouco denso, e fragmentado. Em ventrículo eram vistas áreas focais de fibrose na região subepicárdica se estendendo para o interstício (Figura 4-D). Em áreas focais, foi registrada a presença de células cardíacas com núcleos hipertrofiados e hiper cromáticos (Figura 4-C).

No músculo esquelético as alterações inflamatórias eram discretas ou ausentes e representadas por discreto (+) infiltrado intersticial difuso. Não foi detectada a presença de parasitos.

7-I.4.2 Subgrupo 2 - Camundongos sacrificados 200 dias após o tratamento – (Tabela 1 e 2)

7-I.4.2 .1 Controles não tratados

Foi observado no miocárdio infiltrado inflamatório mononuclear difuso e focal, variando de moderado (++) em 7/8 casos, a intenso nos 3 casos em que havia infiltrado intenso (+++), em geral predominavam os focos inflamatórios densos substituindo células cardíacas destruídas (Figura 3-D), onde eram vistos restos parasitários; nestes casos havia intenso infiltrado intersticial difuso, e depósito de colágeno no interstício. Foi registrada a presença de áreas focais de fibrose em substituição às fibras cardíacas destruídas, com coloração positiva para colágeno pelo método do Picro-Sirius. Presença de parasitos em 6/8 casos analisados (Figura 3-F).

Em músculo esquelético, as lesões variaram de discretas a intensas (Figura 3-E) com infiltrados difusos e focais e lesões envolvendo feixes vasculares com processo de arterite.

7-I.4.2 .2 Camundongos tratados com Benzonidazol

No miocárdio, as lesões inflamatórias eram na maioria dos casos (8/11) discretas (+), constituídas por difuso infiltrado intersticial e raros infiltrados focais. Em 3/11 casos havia moderado infiltrado inflamatório mononuclear difuso (++) , com adensamentos focais e presença de áreas focais de espessamento da matriz intersticial, e depósito de colágeno perimisial (Figura 4-E). A coloração pelo método do Picro-Sirius confirmou, nos casos tratados, a presença em atrios de depósitos colagénicos escassos e fragmentados

(Figura 5-C,D). Nos ventrículos os depósitos de colágeno eram focais ou perivasculares com aspecto frouxo. A presença de parasitos foi detectada em 3/11 casos. As lesões em músculo esquelético eram discretas ou ausentes, a não ser em um caso em que havia moderado infiltrado intersticial e lesões focais predominantemente peri-vasculares.

7-1.4.3 Conclusão da análise histopatológica dos camundongos infectados com a cepa Colombiana – (Tabela 3)

Nos camundongos cronicamente infectados com a cepa Colombiana, o grupo controle não tratado, considerando-se em conjunto os sacrificados 150 e 200 dias após o período de tratamento, apresentou, na maioria dos casos (15/16) alterações inflamatórias moderadas ou intensas. Nestes últimos, foram constatadas lesões necróticas de células cardíacas, correspondendo a densos infiltrados inflamatórios mononucleares, por vezes com restos parasitários. A presença de fibrose intersticial difusa em átrios e fibrose focal e perivascular em ventrículos estava presente na maioria dos casos, em graus variáveis.

Em músculo esquelético as lesões eram em geral discretas a moderadas, porém, nos casos em que as lesões cardíacas foram intensas, os músculos também apresentaram acentuado infiltrado difuso com envolvimento de feixes vasculares com processo de arterite. Havia também extensas áreas de destruição de fibras musculares, por vezes contendo restos parasitários.

No grupo tratado, considerando-se em conjunto os camundongos sacrificados com 150 e 200 dias pós-infecção observou-se regressão nítida das lesões fibrótico-inflamatórias sendo as lesões na sua maioria discretas (17/24 casos) e em poucos casos as lesões eram moderadas (7/24), com difuso infiltrado e

com áreas focais de adensamento. Não havia casos com lesões intensas. Foram observados nestes casos, sinais de regressão da fibrose, com feixes de colágeno irregulares, com aspecto frouxo e fragmentado.

Em músculo esquelético as lesões estavam ausentes em 22/24 casos.

7-1.5 Pesquisa de antígenos do *T. cruzi* no miocárdio de camundongos cronicamente infectados com a cepa Colombiana através as técnicas de imunoperoxidase e de imunofluorescência

7-1.5.1 Parasitos íntegros ou detritos parasitários – (Tabela 4):

Em raros casos, tanto em camundongos submetidos a tratamento como em controles não tratados foram identificadas e marcadas positivamente formas amastigotas do *T. cruzi*, integras no interior de miocélulas cardíacas, sem reação inflamatória. Em focos de desintegração de fibras cardíacas parasitadas, havia infiltrado inflamatório mononuclear em meio aos detritos de células e restos parasitários com marcação positiva pela técnica da imunoperoxidase (Figura 6-A,B) ou por imunofluorescência indireta (Figura 8-A,B,C,D). Em áreas focais foram observadas células cardíacas fragmentadas, com citoplasma vacuolizado, com infiltrado mononuclear intersticial e, eventualmente, depósito amorfo com marcação positiva para *T. cruzi*.

7-1.5.2 Células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDI) – (Tabela 4):

Em todos os casos submetidos a estudo imunohistoquímico, foi vista marcação positiva para antígeno do *T. cruzi*, sob a forma de depósitos granulares na membrana de células dendríticas intersticiais do miocárdio. As células

dendríticas intersticiais marcadas foram vistas no interstício, aderentes à membrana basal dos miócitos em geral isoladas ou, por vezes, em grupos de duas ou mais células. As células dendríticas, com marcação positiva para *T. cruzi*, foram vistas também em focos inflamatórios contendo linfócitos e macrófagos, associados às miocélulas em desintegração (Figura 6-C,D,E,F,G,H).

7-I.5.3 Controles da imunomarcação

Para controle da especificidade da marcação dos antígenos do *T. cruzi*, foi feita a marcação dos parasitos em secções de coração de camundongo com infecção aguda e com múltiplos ninhos parasitários, tanto para a reação de imunoperoxidase como de imunofluorescência.

Para controle na identificação das células dendríticas, foi utilizado o anticorpo anti-MAC (Pharmigen), com a demonstração da presença destas células nos cortes examinados (Figura 7- A,B,C,D).

Para controle da reação foram examinadas secções que sofreram todas as etapas do processo, menos o tratamento com o anticorpo primário anti-*T. cruzi* dando resultado negativo.

No coração de camundongos controles normais foram realizados todos os procedimentos de imunomarcação usando o anticorpo anti-*T. cruzi*, obtendo resultados negativos. Nos controles normais foi também realizada a imunomarcação com anticorpo anti-MAC, com resultado positivo (Figura 7-E,F).

7 - II - INFECÇÃO CRÔNICA COM O CLONE 21SFC3

7-II.1 Análise da Parasitemia:

Os camundongos infectados com o clone C3 da cepa 21SF apresentaram uma curva parasitemica com picos mais elevados no 12º dia de infecção, ocorrendo uma diminuição a partir do 13º, com negatificação parasitêmica no 26º dia (Figura 9).

7-II.2 Índice da Mortalidade cumulativa:

A mortalidade dos camundongos do grupo infectado com o clone 21SFC3 foi de 16.3% quando avaliado até 50 dias de infecção (Figura 10).

7-II.3 Resultado dos testes de cura parasitológicos:

Os camundongos sacrificados com 150 dias após o termino do tratamento (sub-grupo 1) apresentaram 11,76% de cura no subgrupo dos animais tratados e 0,0% de cura nos controles não tratados. Os animais sacrificados com 200 dias após o termino do tratamento (sub-grupo 2), demonstraram 35,23% de cura no sub-grupo dos animais tratados e 0,0% nos controles não tratados (Tabela 5 e 6).

7-II.4 Análise Histopatológica

Foi realizado o estudo histopatológico em 58 camundongos infectados com o clone 21SF-C3, que sobreviveram à infecção aguda, dos quais 34 foram submetidos ao tratamento no 90º dia de infecção e 24 serviram de controles não tratados. Os camundongos deste grupo foram sacrificados em dois pontos: 150 e 200 dias após o término do tratamento constituindo respectivamente os subgrupos 1 e 2.

7-II.4.1 Subgrupo 1 - Camundongos sacrificados 150 dias após o término do tratamento – (Tabela 5 e 6)

7-II.4.1.1 Controles não tratados

No coração foram vistas lesões discretas (+), focais e difusas, com escasso infiltrado mononuclear intersticial e infiltrados focais pequenos, em geral subepicárdicos, em 7/14 camundongos (50%). Nos 50% restantes (7/14) as lesões inflamatórias eram mais acentuadas, moderadas (++), constituídas por infiltrado intersticial difuso, dissociando as células cardíacas e infiltrados focais, variando de discretos a moderados, em geral subepicárdicos ou perivasculares, sem destruição focal de miócitos (Figura 11-A,B). Depósitos intersticiais de colágeno, eram vistos, comprovados pelo método do Picro-Sirius, em átrio ou nos ventrículos, em geral escasso e de distribuição perivascular. Em dois dos casos foram vistas áreas focais de fibrose correspondentes a infiltrado inflamatório na base do coração, em torno dos grandes vasos.

No músculo esquelético as lesões em 8/14 casos foram discretas (+), difusas ou focais e em 6/14 eram ausentes. Não foi detectada a presença de parasitos.

7-II.4.1.2 Camundongos tratados com Benzonidazol

Nos camundongos sacrificados com 150 dias após o término do tratamento, as lesões inflamatórias em miocárdio foram discretas (+) na maioria dos casos, representadas por discreto infiltrado mononuclear difuso, predominantemente em átrios, e por focos de infiltração mononuclear intersticial, sem destruição de miócitos cardíacos. Estas lesões foram vistas em 11/17 camundongos examinados. Em 6/17 casos as lesões inflamatórias eram moderadas (++), representadas pela presença de infiltrados intersticiais difusos, constituídos por células mononucleares, em geral em átrios e na região dos vasos da base do coração (Figura 12-A,B). Em 1 caso foi visto foco de fibrose no miocárdio, com a presença de colágeno frouxo, de aspecto fragmentado (Figura 12-C), comprovados pela coloração com o Picro-Sirius. Não foram encontrados parasitos em fibras cardíacas ou músculo esquelético.

No músculo esquelético foram vistos discretos infiltrados focais (+) e/ou focos de calcificação em 11/17 casos. Nos demais, o músculo não apresentou alterações.

7-II.4.2 Subgrupo 2 - Camundongos sacrificados 200 dias após o tratamento – (Tabela 5 e 6)

7-II.4.2.1 Controles não tratados

Secções do miocárdio apresentaram na maioria dos casos (7/10), lesões inflamatórias de grau moderado (++), difusas ou focais, por vezes correspondendo à destruição focal de miócitos com substituição por fibrose focal (Figura 11-D). Fibrose intersticial foi vista em 5/10 casos deste sub-grupo, com o depósito de colágeno denso, com a coloração positiva pelo Picro-Sirius (Figura 13-A,B). Em 3/10 camundongos, havia apenas infiltrados inflamatórios discretos (+), difusos e/ou focais. Em nenhum caso as lesões foram intensas. No músculo esquelético, em 5/10 casos foram vistos infiltrados focais discretos (+) e em um caso o infiltrado foi moderado (++). Foram vistos focos de arterite e peri-arterite (Figura 11-C). Não foi detectada a presença de parasitos.

7-II.4.2.2 Camundongos tratados com Benzonidazol

Nos 17 camundongos sacrificados, houve predominância de lesões inflamatórias discretas em miocárdio, vistas em 10/17 casos e lesões consideradas moderadas em 6/17 casos embora com destruição focal de miócitos e alterações nucleares e citoplasmáticas das células mononucleares do infiltrado (Figura 12-D,E) e em 1/17 casos ocorreu lesões intensas. Além disto, a presença de fibrose intersticial, variando de discreta a moderada, foi vista em 6/17 casos. A fibrose era, em geral, intersticial, difusa e, por vezes, apresentava um aspecto frouxo, sugestivo de regressão da fibrose, como comprovado pela coloração pelo método do Picro-Sirius (Figura 13-C,D).

Foram vistas também áreas focais de fibrose, com ou sem infiltrado inflamatório, correspondendo a áreas cicatriciais.

No músculo esquelético, em 2/17 casos foram vistos infiltrados focais discretos (+) e em 1/17 o infiltrado foi moderado (++). Os demais casos, não apresentaram alterações. Foi detectada, em 1 caso a presença de parasitos.

7-II.4.3 Conclusão da análise histopatológica do grupo infectado com o clone C23 da cepa 21SF– (Tabela 7).

A infecção crônica pelo clone 21SF-C3 determinou uma miocardite crônica difusa, variando de discreta a moderada, observando-se uma tendência para a acentuação das lesões nos camundongos sacrificados mais tarde. Nos controles não tratados, as lesões moderadas (++) predominaram (14/24 casos) considerando-se em conjunto os camundongos sacrificados com 150 e 200 dias após o término do tratamento. Em 10/24 casos, as lesões foram discretas. Em nenhum dos casos foram encontradas lesões intensas. Nos camundongos submetidos a tratamento, houve evidente decréscimo no grau de lesões inflamatórias, com nítida predominância de lesões discretas (21/34 casos). As alterações foram moderadas em 12/34 casos, porém em apenas um caso foram vistas lesões intensas. A coloração pelo método do Picro-Sirius demonstrou a presença de colágeno frouxo e fragmentado, indicando processo de regressão da fibrose.

7-II.5 Pesquisa de antígenos do *T. cruzi* no miocárdio de camundongos cronicamente infectados com clone 21SF-C3 através as técnicas de imunoperoxidase e de imunofluorescência .

7-II.5.1 Parasitos íntegros ou detritos parasitários – (Tabela 8):

Foram vistos raros parasitos íntegros no interior de células cardíacas, com marcação específica pelo anticorpo anti-*T.cruzi*. Foram também observados restos parasitários com marcação positiva para o *T.cruzi* em miocelulas em desintegração, no meio dos detritos celulares e em macrófagos (Figura 14-A,B,C). Em focos inflamatórios intersticiais, foram vistos depósitos de material amorfo com marcação positiva para o antígeno do *T. cruzi*. (Figura 15-A).

7-II.5.2 Células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDI) – (Tabela 8):

Em todos os casos em que foi feita imunomarcção para antígenos do *T. cruzi*, foi detectada a presença de células dendríticas intersticiais do miocárdio, com marcação positiva na sua membrana para antígenos do *T. cruzi*, isoladas (Figura 14-D,E) ou em grupos (Figura 14-F), por vezes relacionadas com os infiltrados inflamatórios. Excepcionalmente, foi encontrada em um dos casos tratados, uma célula dendritica com marcação positiva para antígenos do *T. cruzi* contendo no citoplasma formas amastigotas (Figura 14-G).

7-II.5.3 Controles da imunomarcção

Para controle da especificidade da marcação dos antígenos do *T. cruzi*, as reações foram controladas com lâminas de coração de camundongo com

infecção aguda e com múltiplos ninhos parasitários, tanto para a reação de imunoperoxidase como de imunofluorescência.

Para controle na identificação das células dendríticas, foi utilizado o anticorpo anti-MAC (Pharmingen), com a demonstração da presença destas células nas secções examinadas.

Para controle da reação foram examinadas secções que sofreram todas as etapas do processo, menos o tratamento com o anticorpo primário anti-*T.cruzi* dando resultado negativo.

No coração de camundongos controles normais foram realizados todos os procedimentos de imunomarcção usando o anticorpo anti-*T.cruzi*, obtendo resultados negativos. Nos controles normais foi também realizada a imunomarcção com anticorpo anti-MAC, com resultado positivo (Figura 7-E,F).

8- DISCUSSÃO

Em estudos prévios do nosso Laboratório, os resultados do tratamento com diferentes quimioterápicos específicos anti-*T. cruzi*, em camundongos cronicamente infectados, têm demonstrado que as lesões inflamatórias do miocárdio sofrem um processo de regressão, que se acompanha de um nítido decréscimo do processo de fibrose intersticial difusa detectada neste modelo. Este resultado foi atribuído à eliminação do parasito ou à diminuição da carga parasitária, o que indicaria a importância do fator parasitário no desenvolvimento das lesões de miocardite crônica. Entretanto, o exame histopatológico, nestes casos, tem demonstrado que, mesmo em animais com negatificação dos testes parasitológicos, persiste um infiltrado inflamatório crônico discreto, em geral difuso ou em focos isolados, cuja origem não é bem esclarecida e, hipoteticamente, seria devida à persistência de antígenos parasitários. No presente estudo, a pesquisa dos antígenos parasitários, nos animais não tratados e nos não curados, revelou além da presença de parasitos íntegros intracelulares, restos parasitários com marcação positiva pela peroxidase ou pelo teste de imunofluorescência indireta, com o uso de anticorpo anti-*T. cruzi*.

Entretanto, o achado mais importante foi o relacionado à presença de células dendríticas intersticiais do miocárdio, expressando em sua superfície antígenos do *T. cruzi*. As células dendríticas são identificadas pela sua localização e sua morfologia peculiar, com aspecto alongado, com citoplasma compacto, núcleo central arredondado e dois ou três prolongamentos citoplasmáticos finos, localizadas no interstício e aderentes à membrana do miócito cardíaco. O uso

de anticorpo monoclonal anti-MAC é capaz de marcar estas células e também os macrófagos pelo método imunohistoquímico. O uso de anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*, revelou na superfície destas células, nos camundongos infectados, a presença de antígenos granulares, delimitando as membranas celulares. Os controles positivos mostraram os parasitos íntegros positivos, pelo mesmo método, e a reação em camundongos normais resultou negativa.

A presença de antígenos parasitários relacionada com focos inflamatórios no miocárdio, foi anteriormente demonstrada em camundongos por YOUNÈS-CHENOUFFI, et al. (1998), utilizando a técnica da imunofluorescência indireta. Também HIGUCHI et al (1993) demonstraram no miocárdio de pacientes chagásicos a presença de antígenos parasitários particulados, identificados por imunohistoquímica. Estes dados sugerem que a persistência de lesões focais seja decorrente da presença de antígenos parasitários remanescentes em focos localizados, mas não permite explicar a difusa miocardite que permanece em animais cronicamente infectados em que os parasitos são muito escassos e difíceis de serem detectados ao exame histopatológico mesmo com as técnicas de imunohistoquímica.

Em camundongos cronicamente infectados e tratados com quimioterápico específico, várias possibilidades existem de persistência no miocárdio de antígenos parasitários, quer seja pela presença de amastigotas íntegros, nos casos não curados, pela presença de antígenos parasitários particulados em focos de destruição do parasito, e a presença de antígenos captados e processados por células dendríticas intersticiais do miocárdio, apresentadoras de antígenos.

A investigação sobre a presença destes antígenos em casos crônicos não tratados, em que os parasitos são escassos, e nos camundongos tratados, em que há persistência de infiltrados inflamatórios crônicos, poderia contribuir para o esclarecimento dos mecanismos patogênicos da miocardiopatia chagásica.

A resposta inflamatória que ocorre no miocárdio na fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, representativa de uma miocardite crônica, a qual tem caracteres próprios por ser evolutiva, com lesões difusas e focais, com fibrose, e com parasitismo discreto, é atribuída ou a uma resposta ao *T. cruzi* e seus antígenos (ANDRADE et al. 2000 ,TARLETON 2001), ou a fenômenos de autoimunidade (RIBEIRO DOS SANTOS et al. 1992, CUNHA NETO ET AL. 1995,1996, PONTES DE CARVALHO et al 2002).

A participação de uma resposta celular, no quadro imunopatológico da doença de Chagas tem sido registrada por diferentes autores (ANDRADE, 1991, 1999, DOS REIS, 1997, TARLETON 1995, TARLETON et al. 1996). De acordo com DOS REIS (2000) as células TCD4 e TCD8 são indispensáveis para o controle da proliferação parasitária. Foi demonstrado que tanto animais TCD8⁻ como TCD4⁻ apresentam um aumento de parasitos nos tecido, com grande diminuição da celularidade dos infiltrados inflamatórios (TARLETON, 1995, TARLETON et al. 1996) Enquanto as células TCD8 atuam em parasitos intracelulares, em células não linfóides, que expressam exclusivamente moléculas MHC classe I as células TCD4 atuam nos parasitos ou seus antígenos, endocitados por células que expressam moléculas MHC classe II como as células dendríticas, macrófagos e linfócitos B.

Desde a sua fase aguda, o processo de miocardite teria um componente imune como foi comprovado em cães, os quais desenvolveram lesões de

microangiopatia no miocárdio, com lesões do endotélio de capilares, associadas à presença na sua luz de linfócitos granulares citotóxicos (ANDRADE et al, 1994).

A evolução da doença de Chagas a partir da fase aguda, no homem e nos diferentes modelos experimentais, conduz a uma fase indeterminada onde os parasitos são escassos e dificilmente detectados, e as lesões miocárdicas são muito discretas e focais. Entretanto uma percentagem destes casos evolui para uma cardiopatia grave, caracterizada por uma miocardite crônica fibrosante, provavelmente devido a uma alteração dos processos imunológicos ligados à supressão da resposta celular como foi demonstrado por ANDRADE et al, (1987) com o uso de Ciclofosfamida em baixas doses em cães na fase indeterminada.

Fenômenos de autoimunidade têm sido responsabilizados pelas lesões cardíacas na fase crônica da infecção, quer seja por reação cruzada de resposta imune contra antígenos dos parasitos e antígenos próprios, ou por um mimetismo molecular ("molecular mimicry") entre os epitopos do parasito e do hospedeiro (CUNHA- NETO et al.,1995) além de numerosas outras hipóteses (como foi recentemente revisto por GIRONÉS & FRESNO, 2003).

De acordo com ANDRADE, 1999, considerando os aspectos da cardiopatia chagásica humana, os pacientes com doença de Chagas, não apresentam as características próprias de uma doença autoimune como, por exemplo, períodos de exacerbação e remissão da doença, presença de auto-anticorpos em títulos altos e constantes, e o envolvimento de diferentes órgãos, como ocorre nas doenças autoimunes em geral (ANDRADE, 1999).

No presente trabalho não se pretende investigar as reações de autoimunidade que poderiam estar envolvidas na patogenia da cardiopatia chagásica, embora ainda não haja uma conclusão sobre o tema. De acordo com SOARES et al. (2001) em estudo de revisão sobre a patogênese da doença de Chagas, embora uma resposta autoimune aos antígenos do coração possa participar na patogenia da cardiopatia crônica chagásica a persistência dos parasitos ou de antígenos parasitários pode ser necessária para desencadear e manter a reação.

Deste modo, visa o presente trabalho, investigar o papel do parasito e dos seus antígenos nesta patologia.

A investigação foi conduzida, procurando determinar nos camundongos cronicamente infectados, a eliminação do parasito ou a diminuição da carga parasitária através o tratamento quimioterápico com o Benzonidazol, e pesquisar a persistência pós-tratamento dos antígenos parasitários relacionados ou não à persistência de focos inflamatórios nos animais tratados.

A utilização de duas diferentes cepas teve dois objetivos: o primeiro foi relacionado ao desenvolvimento das lesões miocárdicas na fase crônica da infecção, que depende do Tipo de cepa ou Biodema, sendo as cepas do Biodema Tipo III (*T. cruzi I*) as mais patogênicas e determinando maior grau de lesão na fase crônica, enquanto as cepas do Biodema Tipo II (*T. cruzi II*), determinam lesões menos significantes na fase crônica (ANDRADE, 1990); em segundo lugar, levou-se em conta o grau de suscetibilidade das cepas ao tratamento quimioterápico. Com estes objetivos, foram usadas para infecção, a cepa Colombiana (Biodema Tipo III), que é altamente resistente e o clone C3 da cepa 21SF (21SF C3) o qual foi descrito como de alta suscetibilidade ao

Benzonidazol (CAMPOS et al. 2005) , embora as cepas deste tipo mostrem um grau variável de suscetibilidade ao quimioterápico. A avaliação do resultado da quimioterapia foi feita pela combinação dos testes parasitológicos e da sorologia, considerando-se como positivos os casos com positividade de testes parasitológicos e/ou sorologia positiva, tendo como ponto de corte o Título de 1:20. Foi confirmada a alta resistência da cepa Colombiana que apresentou um índice de cura de 8,3% e a média suscetibilidade do clone C3 da cepa 21SF, com 20,6% de cura. Quanto ao quadro histopatológico, os camundongos infectados com a cepa Colombiana, não tratados, mostraram no miocárdio, lesões moderadas a intensas, correspondendo a densos infiltrados inflamatórios, por vezes com restos parasitários e fibrose intersticial. Nos animais tratados, foi vista regressão da miocardite e do processo fibrogênico, quando comparados aos controles não tratados, o que reflete a importância do parasito na manutenção das lesões da fase crônica da infecção e confirma dados prévios que demonstraram a reversibilidade das lesões da fase crônica após tratamento curativo com quimioterápico (ANDRADE, 1991)

O presente trabalho permitiu demonstrar que as células dendríticas intersticiais do miocárdio são responsáveis pela manutenção da estimulação da resposta celular em camundongos cronicamente infectados pelo *T.cruzi*. Estas células foram descritas pela primeira vez por HART & FABRE (1981) e são reconhecidas como células especializadas, apresentadoras de antígenos, expressos através receptores MHC classe II. São responsáveis por iniciar a resposta imune e migram para o baço, como foi demonstrado por LARSEN et, al (1990). A migração destas células para a zona T do baço dá origem a uma sensibilização constante do coração para o desenvolvimento das lesões de

hipersensibilidade tardia (Tipo IV) que ocorrem na miocardite crônica chagásica.

O papel destas células como apresentadoras de antígenos do *T. cruzi*, na miocardite chagásica foi descrito pela primeira vez em cães infectados pelo *T. cruzi*, nas fases aguda, indeterminada e crônica cardíaca (ANDRADE et al. 2000). Em estudos prévios (ANDRADE et al. 1991) foi demonstrada a presença de antígenos do *T. cruzi* na membrana de células dendríticas foliculares do baço, em camundongos com infecção crônica, submetidos a tratamento curativo com a droga MK-436, os quais, entretanto, mantiveram sorologia positiva embora com decréscimo dos seus títulos. Estas células estão presentes nos centros germinais dos folículos linfóides do baço e são importantes na apresentação de antígenos para as células B de memória como foi descrito por diferentes autores (HANNA and SZAKAL, 1968, NOSSAL, 1968, BROWN et al., 1970, VAN ROOIJEN et al, 1978) Deste modo, a demonstração de antígenos nas células dendríticas intersticiais do coração, representativas das células dendríticas linfóides (HART & MACKENZIE, 1990), indica o envolvimento de ambos os tipos de células, na resposta humoral (células dendríticas foliculares do baço) e na resposta celular (células dendríticas intersticiais do miocárdio).

No presente trabalho as células dendríticas intersticiais com marcação positiva para antígenos do *T. cruzi* estavam presentes em todos os casos examinados. A pesquisa dos antígenos, pela imunohistoquímica, foi realizada em animais de cada um dos grupos experimentais, infectados com ambas as cepas do *T. cruzi*, os quais foram selecionadas pelo encontro no miocárdio de infiltrados

inflamatórios focais ou difusos, quer seja nos controles não tratados como naqueles tratados.

O resultado do presente trabalho confirma a importância do papel do parasito e de seus antígenos no desenvolvimento e manutenção das lesões da miocardiopatia chagásica.

Este fato poderá representar a possibilidade de cura e regressão dos componentes imunopatológicos da doença, dependendo da disponibilidade de drogas realmente eficazes contra o parasito.

9- CONCLUSÕES

- 1) Antígenos do *Trypanosoma cruzi* seqüestrados em células dendríticas intersticiais do miocárdio participam na manutenção da miocardite crônica em camundongos infectados, independentemente da cepa do parasita.
- 2) Presença de formas integras do *Trypanosoma cruzi*, de parasitas desintegrados ou de antígenos particulados, revelados por imunohistoquímica com anticorpo anti-*T.cruzi* estão relacionados com os focos inflamatórios e com destruição de miocélulas cardíacas.
- 3) O tratamento com o Benzonidazol leva a um decréscimo das lesões fibrótico-inflamatórias independente da cura, embora as lesões inflamatórias mais intensas sejam observadas em animais não curados.
- 4) A patogenicidade e a resistência ao tratamento quimioterápico é maior na infecção com a cepa Colombiana (índice de cura de 8,3%), quando comparados com a infecção com o clone 21SF-C3 (índice de cura de 20,6%).

10- REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

1. ALMEIDA, D.R.; CARVALHO, A.C.; BRANCO, J.N.; PEREIRA, A.P.; CORREA, L.; VIANNA, P.V.; BUFFOLO, E.; MARTINEZ, E.E. Chagas' disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment. **J. Heart Lung Transplant.**, **15**(10):988-992, 1996.
2. ANDRADE SG, STOCKER-GUERRET S, PIMENTEL AS, GRIMAUD JA. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz. Apr-Jun;86**(2):187-200, 1991.
3. ANDRADE, S.G.; CAMPOS, R.F.; SOBRAL, K.S.; MAGALHAES, J.B.; GUEDES, R.S.; GUERREIRO, M.L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biomes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **39**(1):1-8, 2006.
4. ANDRADE, S.G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **85**(1):17-27, 1990.
5. ANDRADE, S.G.; CARNEIRO FILHO, A.; DE SOUZA, A.J.; DE LIMA, E.S.; ANDRADE, Z.A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Pathol.**, **78**(6):391-399, 1997.
6. ANDRADE, S.G. *Trypanosoma cruzi*: clonal structure of parasite strains and the importance of principal clones. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**:185-187, 1999. Suppl 1.

7. ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; ANDRADE, S.G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **177**(6):796-799, 1983.
8. 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.
9. 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.
10. ANDRADE, S.G. et. al. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. **Bull. World Health Organ**, **63**:721-726, 1985.
11. ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanozoma cruzi* isoladas no Recôncavo baiano. **Rev. Patol. Trop.**, **3**:65-121, 1974.
12. ANDRADE, S.G. Patologia experimental da Doença de Chagas. In: **Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 177p.
13. ANDRADE, S.G; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHÃES, J.B. Immunological response of Swiss to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **79**:397-407, 1985.
14. ANDRADE, S.G; ANDRADE, Z.A. Aspecto anátomo-patológico e resposta terapêutica na infecção Chagásica crônica experimental. **Rev. Inst. Med. Trop.**, **18**(4):268-275, 1976.

15. ANDRADE, S.G.; FIGUEIRA, R.M. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **19**:335 – 341, 1977.
16. ANDRADE, S.G.; FIGUEIRA, R.M.; CARVALHO, M.L.; GORINE, D.F. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica e experimental pelo Bay2502. Resultados de tratamento a longo prazo. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **17**:380-389, 1975.
17. ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **94**(Suppl 1):71-80, 1999.
18. ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G.; CORREA, R.; SADIGURSKY, M.; FERRANS, V.J. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **Am. J. Pathol.**, **144**(6):1403-1411, 1994.
19. ANDRADE, S.G.; FREITAS, L.A.R.; PEYROL, S.; PIMENTEL, A.R.; SADIGURSKY, M. Experimental chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infection: persistence of parasite antigens and positive serology in parasitologically cured mice. **Bull. World Health Organ.**, **69**(2):191-197, 1991.
20. ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B. Biodemes and Zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **30**(1):27-35, 1997.
21. ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B.; PONTES, ^aL. Terapêutica da fase crônica da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* com o Benzonidazol e o Nifurtimox. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **22**(3):p.113-118, 1989.

22. ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of Chagas' disease. **Res. Immunol.**, **142**: 126-129, 1991.
23. 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.
24. BENOIST, C.; MATHIS, D. Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry? **Nat. Immunol.**, **2**:797-801, 2001.
25. BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, **63**(2):215-220, 1969.
26. BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, **5**(5)220-224, 1963.
27. BROWN JC, DE JESUS DG, HOLBOROW EJ, HARRIS G. Lymphocyte-mediated transport of aggregated human gamma-globulin into germinal centre areas of normal mouse spleen. **Nature. Oct 24; 228** (5269):367-9, 1970.
28. BUSTAMANTE, J.M. et al. Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. **Clin. Sci.**, **104**:415-420, 2003.
29. CAMPOS, R.F.; GUERREIRO, M.L.; SOBRAL, K.D.E. S.; LIMA, R.D.E. C.; ANDRADE, S.G. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biotype Type II, *Trypanosoma cruzi* II. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, **38**(2):142-146, 2005.

30. CASTRO, S.L. de.; SANTA-RITA, R. M.; EINICKER-LAMAS, M. Quimioterapia experimental. In: ARAÚJO-JORGE, T.C.; CASTRO, S. L. de. **Doença de Chagas; manual para experimentação animal**. Rio de Janeiro: Editora Fiocruz, 2000. cap. 7, p.111-121.
31. CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida . **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 1(2):1-62, 1909.
32. CHAGAS, C. Nova entidade mórbida do homem. Resumo geral de estudos etiológicos e clínicos. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 3(2):3-59, 1911.
33. CHAGAS, C. Revisão do ciclo evolutivo do "*Trypanosoma cruzi*". **Brasil-Méd.**, (23): 1913.
34. CUNHA-NETO E, KALIL J. Heart-infiltrating and peripheral T cells in the pathogenesis of human Chagas' disease cardiomyopathy. **Autoimmunity**, 34(3):187-192, 2001.
35. 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.** 92:3541-3545, 1995.
36. 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.** Oct 15;98(8):1709-12, 1996.

37. DE SOUZA, A.P.; OLIVIERI, B.P.; DE CASTRO, S.L.; ARAUJO-JORGE, T.C. Enzymatic markers of heart lesion in mice infected with *Trypanosoma cruzi* and submitted to benznidazole chemotherapy. **Parasitol. Res.**, **86**(10):800-808, 2000.
38. DIAS, J.C.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin America: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **97**(5):603-612, 2002.
39. DONERMEYER, D.L.; BEISEL, K.W.; ALLEN, P.M.; SMITH, S.C. Myocarditis-inducing epitope of myosin binds constitutively and stably to I-Ak on antigen-presenting cells in the heart. **J. Exp. Med.**, **182**(5):1291-300, 1995.
40. DOS REIS, G.A. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Today. Sep**; **13**(9):335-42, 1997.
41. FABBRO DE SUASNABAR, D.; ARIAS, E.; STREIGER, M.; PIACENZA, M.; INGARAMO, M.; DEL BARCO, M.; AMICONE, N. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, **42**(2):99-109, 2000.
42. FERNANDES, O.; MANGIA, R.H.; LISBOA, C.V.; PINHO, A.P.; MOREL, C.M.; ZINGALES, B.; CAMPBELL, D.A.; JANSEN, A.M. The complexity of the sylvatic cycle of *Trypanosoma cruzi* in Rio de Janeiro state (Brazil) revealed by the non-transcribed spacer of the mini-exon gene. **Parasitology**, **118**(Pt 2):161-166, 1999.
43. FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **81**(5):755-759, 1987.

44. GIRONES, N.; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends Parasitol.**, **19**(1):19-22, 2003.
45. GIRONES, N.; RODRIGUEZ, C.I.; BASSO, B.; BELLON, J.M.; RESINO, S.; MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; GEA, S.; MORETTI, E.; FRESNO, M. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. **Clin. Diagn. Lab. Immunol.**, **8**(6):1039-1043, 2001.
46. GONÇALVES, A.M.; MOREL, C.M. Tripanosomatid characterization by Schizodeme analysis. In: MOREL, C.M. (Ed.) **Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual**. 2.ed. Geneva/ RJ. :UNDP/World Bank/WHO Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases/Fundação Oswaldo Cruz , 1984. p.102-115.
47. HANNA MG JR, SZAKAL AK. Localization of 125I-labeled antigen in germinal centers of mouse spleen: histologic and ultrastructural autoradiographic studies of the secondary immune reaction. **J Immunol.** **101**(5):949-62, 1968.
48. HART, D.N.; MCKENZIE, J.L. Interstitial dendritic cells. **Int .Rev. Immunol.**, **6**(2-3):127-138, 1990.
49. HIGUCHI, M.L; BRITO, T.; REIS, M.M.; BARBOSA, A.; BELLOTTI, G.; PEREIRA-BARRETO, A.C.; PILEGGI, F. Correlation between *Trypanosoma cruzi* parasitism and myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovasc. Pathol.**, **2**:101-106, 1993.
50. JONES, E.M.; COLLEY, D.G.; TOSTES, S.; LOPES, E.R.; VNENCAK-JONES, C.L.; MCCURLEY, T.L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions human chagasic cardiomyopathy. **Am. J. Trop Med. Hyg.**, **48**(3):348-357, 1993.
51. KOBERLE, F. Megacolon. **J. Trop. Med. Hyg.**, **61**(1):21-24, 1958.

52. KOBERLE, F. Megaesophagus. **Gastroenterology**, **34**(3):460-466, 1958.
53. LARANJA, F.S. Clinical aspects of Chagas' disease. **Rev. Bras. Med.**, **10**:482-491, 1953.
54. LEON, J.S.; WANG, K.; ENGMAN, D.M. Myosin autoimmunity is not essential for cardiac inflammation in acute Chagas' disease. **J Immunol.**, **171**(8):4271-4277, 2003.
55. LUQUETTI, A.O. Etiological treatment for Chagas disease. Technical Report. Fundação Nacional de Saúde. **Parasitol. Today**, **13**:127-128, 1997.
56. MACEDO, V.O. **Influência da exposição a reinfecção na evolução da doença de Chagas. Estudo longitudinal de 5 anos.** Tese (Doutorado). **Rev. Patol. Trop.**, **5**:33-115, 1976.
57. MARIN NETO, J.A.; SIMOES, M.V.; SARABANDA, A.V. Chagas' heart disease. **Arq. Bras; Cardiol.**, **72**(3):247-280, 1999.
58. MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; DE SOUZA, A.A.; POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **74**(2):221-237, 1980.
59. MILES, M.A.; CIBULSKIS, R.E. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, **2**: 94-101, 1986.
60. MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, **29**(5 Suppl):1070-1074, 1980.

61. MOREL, C.M.; DEANE, M.P.; GONCALVES, A.M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. **Parasitol. Today**, 2(4):97-101, 1986.
62. NOSSAL GJ, ABBOT A, MITCHELL J, LUMMUS Z. Antigens in immunity. XV. Ultrastructural features of antigen capture in primary and secondary lymphoid follicles. **J Exp Med. Feb 1; 127** (2):277-90, 1968.
63. PONTES-DE-CARVALHO, L. et al. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. **J. Autoimmun.**, 18: 131-138, 2002.
64. RESENDE, J.M.; MOREIRA, H. Forma digestiva da doença de Chagas. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. **Trypanozoma cruzi e doença de Chagas**. 2ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. cap. 14, p.246-259.
65. RIBEIRO DOS SANTOS, R.; ROSSI, M.A.; LAUS, J.L.; SANTANA, SILVA, J.; SAVINO, W.; MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes longterm tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.**, 175: 29-39, 1992.
66. ROCHA, A.; DE MENESES, A.C.; DA SILVA, A.M.; FERREIRA, M.S.; NISHIOKA, S.A.; BURGARELLI, M.K.; ALMEIDA, E.; TURCATO JUNIOR, G.; METZE, K.; LOPES, E.R. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, 50(3):261-268, 1994.
67. ROMANHA, A.L. **Heteropatogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi***. 1982. Tese (Doutorado) – Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais, Minas Gerais.

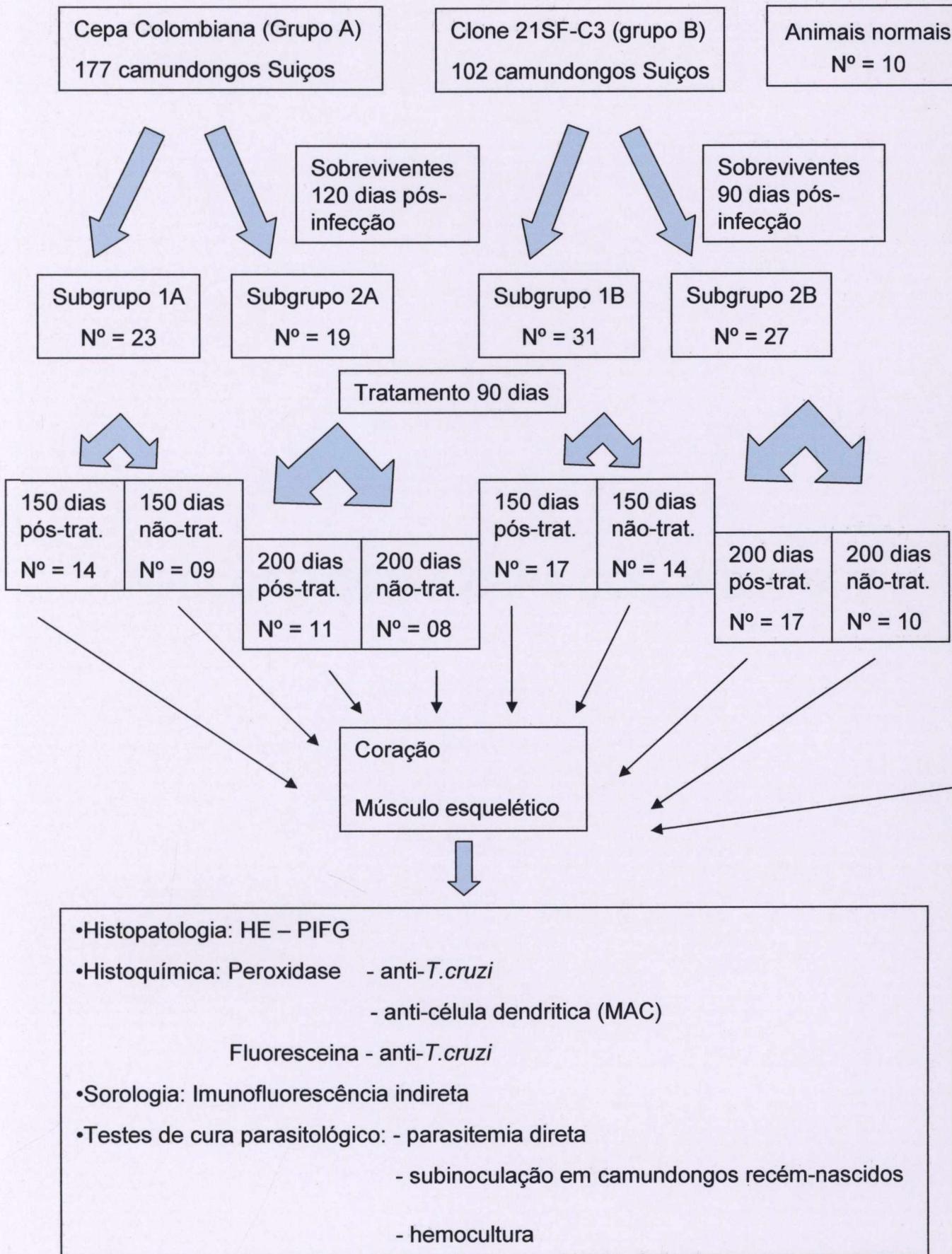
68. ROSE, N.R.; HILL, S.L. The pathogenesis of postinfectious myocarditis. **Clin. Immunol. Immunopathol.**, **80**(3 Pt 2):S92-99, 1996.
69. SARTORI, A.M.; LOPES, M.H.; CARAMELLI, B.; DUARTE, M.I.; PINTO, P.L.; AMATO NETO, V.; SHIKANAI-YASUDA, M. Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas' disease in a patient with AIDS. **Clin. Infect. Dis.**, **21**(5):1297-1299, 1995.
70. SOARES, M.B. et al. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Bras. Cienc.**, **73**:547-559, 2001.
71. SOTO, A.C.D.; MIRKIN, G.A.; SOLANA, M.E.; CAPPA, S.M.G. Trypanosoma cruzi infection modulates in vivo expression of major histocompatibility complex class II molecules on antigen-presenting cells and T-cell stimulatory activity of dendritic cells in a strain-dependent manner. **Infect Immun. Mar**; **71**(3):1194-9, 2003.
72. SOUTO, R.P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A.M.; CAMPBELL, D.A.; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of Trypanosoma cruzi. **Mol. Biochem. Parasitol.**, **83**(2):141-152, 1996.
73. STORINO, R. et al. Chagasic cardiopathy in endemic area versus sporadically infected patients. **Rev. Saude Publ.**, **36**:755-758, 2002.
74. TARLETON RL. The role of T cells in Trypanosoma cruzi infections. **Parasitol Today. Jan**; **11**(1):7-9, 1995.
75. TARLETON RL, GRUSBY MJ, POSTAN M, GLIMCHER LH. Trypanosoma cruzi infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int Immunol. Jan**; **8**(1):13-22, 1996.

76. TARLETON, R.L. Chagas disease: a role for autoimmunity? **Trends Parasitol.**, **19**(10):447-451, 2003.
77. TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, **31**:550-554, 2001.
78. TARLETON, R.L. et al. Autoimmune rejection of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite-specific response to infected host tissue. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.**, **94**:3932-3937, 1997.
79. VAGO, A.R. et al. PCR detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in oesophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, **348**:891-892, 1996.
80. VAN OVERTVELT, L.; VANDERHEYDE, N.; VERHASSELT, V.; ISMAILI, J.; DE VOS, L.; GOLDMAN, M.; WILLEMS, F.; VRAY, B. *Trypanosoma cruzi* infects human dendritic cells and prevents their maturation: inhibition of cytokines, HLA-DR, and costimulatory molecules. **Infect. Immun.**, **67**(8):4033-4040, 1999.
81. VAN ROOIJEN N. Binding of labelled antigens and immune complexes to macrophages and dendritic cells in cryostat sections of normal mouse spleen. **Acta Morphol Neerl Scand. May**; **16**(2):121-7, 1978.
82. VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H.; SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **Am. Heart J.** **127**(1):151-162, 1994.
83. VIOTTI, R. et al. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with longterm follow-up. **Am. Heart J.**, **127**:151-162, 1994.

84. WARREN LG. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **J Parasitol.** **Oct;46:** 529-39, 1960.
85. WHO. Control of Chagas disease. Report of a WHO Expert committee. **WHO Tech. Rep. Ser.**, Geneva , 81-85, 1991.
86. YOUNES-CHENOUFFI, A.B.; HONTEBEYRIE-JOSCOWICZ, M.; TRICOTTET, V.; EISSEN, H.; REYNES, M.; SAID, G. Persistence of *Trypanosoma cruzi* antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, **82:**77-83, 1998.
87. ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J. Infect. Dis.**, **180:**480-486, 1999.

FIGURAS E TABELAS

DESENHO EXPERIMENTAL



INFECÇÃO COM A CEPA COLOMBIANA

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

Figura 2 – Mortalidade cumulativa dos animais infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* até o 50º dia de infecção.

Cepa Colombiana

Figura 1

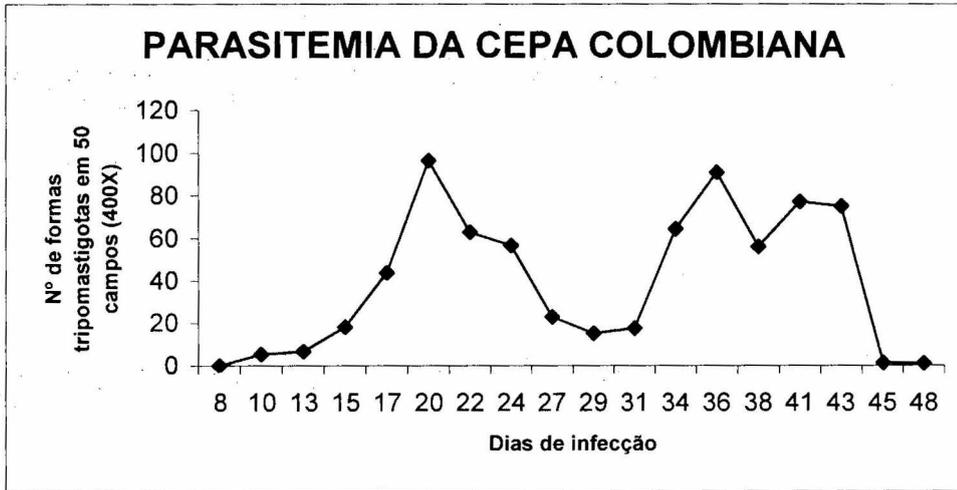


Figura 2

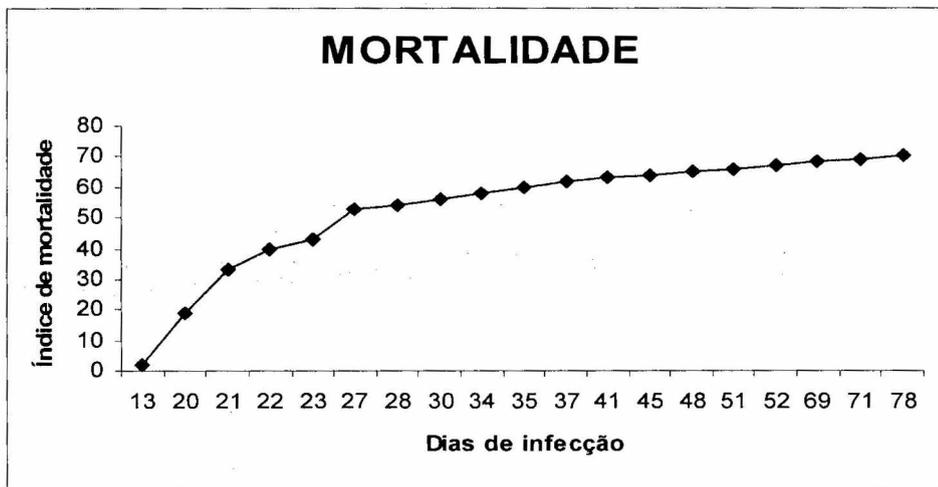


Tabela 1 – Correlação entre os testes de cura parasitológico, histopatológico e sorológico em camundongos infectados com a Cepa Colombiana (Grupo A) e tratados com Benzonidazol.

| Subgrupo 1 * 150 dias | | Histopatologia | | | ***Sorologia |
|--|-------------------------|---|----|---|---------------------|
| Código | **Testes de cura | Coração Inflam. focal / difusa | | Coração e Musc. Esq. Parasitismo | |
| ANTCOLTR/58 | Neg. | - | + | Neg. | 1:40 |
| ANTCOLTR/60 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:10 |
| ANTCOLTR/61 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| ANTCOLTR/62 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| ANTCOLTR/64 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:20 |
| ANTCOLTR/65 | Neg. | + | + | Neg. | 1:20 |
| ANTCOLTR/66 | Neg. | + | + | Neg. | 1:20 |
| ANTCOLTR/74 | Pos. | + | + | Neg. | 1:160 |
| ANTCOLTR/75 | Neg. | - | + | Neg. | 1:320 |
| ANTCOLTR/76 | Neg. | + | + | Neg. | 1:640 |
| ANTCOLTR/77 | Pos. | + | ++ | Neg. | 1:320 |
| ANTCOLTR/78 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:40 |
| ANTCOLTR/79 | Neg. | NR | NR | Neg. | 1:80 |
| ANTCOLTR/80 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| Subgrupo 2 * 200 dias | | | | | |
| ANTCOLTR/67 | Neg. | - | + | Neg. | 1:10 |
| ANTCOLTR/68 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:40 |
| ANTCOLTR/70 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| ANTCOLTR/71 | NR | + | + | Neg. | NR |
| ANTCOLTR/72 | Neg. | ++ | ++ | Pos. | 1:20 |
| ANTCOLTR/73 | Pos. | + | + | Neg. | 1:1280 |
| ANTCOLTR/84 | Pos. | + | + | Neg. | 1:160 |
| ANTCOLTR/86 | Neg. | + | + | Neg. | 1:80 |
| ANTCOLTR/87 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| ANTCOLTR/88 | Pos. | ++ | ++ | Pos. | 1:160 |
| ANTCOLTR/89 | Pos. | + | + | Pos. | 1:40 |

* Dias pós-término do tratamento

** Parasitemia; Subinoculação; Hemocultura

*** Teste de Imunofluorescência Indireta

+ = Lesão Discreta; ++ = Lesão Moderada; +++ = Lesão intensa ; - = Sem Lesão

P = Positivo; N = Negativo; NR = Não realizado

Tabela 2 - Correlação entre os testes de cura parasitológico, histopatológico e sorológico em camundongos infectados com a Cepa Colombiana (Grupo A), controles não tratados.

| Subgrupo 1 * 150 dias | | Histopatologia | | | | ***Sorologia |
|---------------------------------|-------------------------|--|-----|--|--------|---------------------|
| Código | **Testes de cura | Coração Inflam. focal / difusa | | Coração e Musc. Esq. Parasitismo | | |
| ANTCOLC/47 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:640 | |
| ANTCOLC/49 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:80 | |
| ANTCOLC/50 | Pos. | + | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANTCOLC/55 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANTCOLC/57 | Pos. | ++ | ++ | Pos. | 1:640 | |
| ANTCOLC/58 | Pos. | +++ | +++ | Pos. | 1:640 | |
| ANTCOLC/59 | Pos. | + | ++ | Neg. | 1:320 | |
| ANTCOLC/60 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:160 | |
| ANTCOLC/61 | Pos. | NR | NR | Neg. | 1:1280 | |
| Subgrupo 2 * 200 dias | | | | | | |
| ANTCOLC/51 | Neg. | ++ | ++ | Neg. | 1:160 | |
| ANTCOLC/52 | Pos. | +++ | ++ | Pos. | 1:80 | |
| ANTCOLC/53 | Pos. | +++ | ++ | Pos. | 1:1280 | |
| ANTCOLC/54 | Pos. | ++ | + | Neg. | 1:1280 | |
| ANTCOLC/62 | Pos. | + | +++ | Pos. | 1:320 | |
| ANTCOLC/63 | Pos. | + | + | Pos. | 1:160 | |
| ANTCOLC/65 | Pos. | ++ | ++ | Pos. | 1:40 | |
| ANTCOLC/66 | Pos. | + | ++ | Pos. | 1:80 | |

* Dias pós-término do tratamento

** Parasitemia; Subinoculação; Hemocultura

*** Teste de Imunofluorescência Indireta

+ = Lesão Discreta; ++ = Lesão Moderada; +++ = Lesão intensa ; - = Sem Lesão

Pos. = Positivo; Neg. = Negativo; NR = Não realizado

Tabela 3 – Análise da intensidade das lesões no tecido cardíaco e no músculo esquelético, nos animais infectados com a cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, tratados e não tratados com Benzonidazol, sacrificados com 150 e 200 dias pós-termino do tratamento.

| Subgrupo 1 * | Animais não tratados | | Animais Tratados | |
|--------------|----------------------|---------|-------------------|---------|
| | Grau das lesões | Coração | Músc. Esquelético | Coração |
| - | 0/8 | 0/8 | 0/13 | 2/13 |
| + | 0/8 | 3/8 | 9/13 | 10/13 |
| ++ | 7/8 | 4/8 | 4/13 | 1/13 |
| +++ | 1/8 | 1/8 | 0/13 | 0/13 |

| Subgrupo 2 ** | Grau das lesões | Coração | Músc. Esquelético | Coração | Musc. esquelético |
|---------------|-----------------|---------|-------------------|---------|-------------------|
| - | 0/8 | 0/8 | 0/11 | 4/11 | |
| + | 1/8 | 3/8 | 8/11 | 6/11 | |
| ++ | 4/8 | 2/8 | 3/11 | 1/11 | |
| +++ | 3/8 | 3/8 | 0/11 | 0/11 | |

* = Animais sacrificados com 150 dias pós-termino do tratamento.

** = Animais sacrificados com 200 dias pós-termino do tratamento.

Tabela 4- Identificação de antígenos do *Trypanosoma cruzi* em focos inflamatórios (detritos parasitários) e na membrana de células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDIs) em camundongos cronicamente infectados com a cepa Colombiana : Tratados com Benzonidazol e Controles não tratados

| Coração | | | | | |
|----------------------------------|------------|-----------|-------------------------------|------------|-----------|
| Tratados com Benzonidazol | | | Controles não Tratados | | |
| Código | CDI | DP | Código | CDI | DP |
| ANTCOLTR/58 | + | - | ANTCOLC/49 | + | - |
| ANTCOLTR/60 | + | - | ANTCOLC/51 | + | + |
| ANTCOLTR/61 | + | + | ANTCOLC/52 | + | + |
| ANTCOLTR/62 | + | + | ANTCOLC/53 | + | + |
| ANTCOLTR/64 | + | + | ANTCOLC/54 | + | + |
| ANTCOLTR/65 | + | - | ANTCOLC/55 | + | + |
| ANTCOLTR/66 | + | - | ANTCOLC/57 | + | + |
| ANTCOLTR/71 | + | + | ANTCOLC/58 | + | + |
| ANTCOLTR/72 | + | + | ANTCOLC/59 | + | + |
| ANTCOLTR/73 | + | - | ANTCOLC/60 | + | + |
| ANTCOLTR/77 | + | + | ANTCOLC/62 | + | + |
| ANTCOLTR/78 | + | + | ANTCOLC/65 | + | + |
| ANTCOLTR/88 | + | + | ANTCOLC/66 | + | + |

CDI = Células Dendríticas Intersticiais do Miocárdio
 DP = Detritos parasitários do *T. cruzi*

Figura 3 – Secções de coração e de músculo esquelético de camundongos **controles não tratados**, infectados com a cepa Colombiana, sacrificados com 150 dias (A, B, C) e com 200 dias (D, E, F) após o término do tratamento: **A, B:** secções de miocárdio com infiltrado intersticial difuso e adensamento focal com presença de formas amastigotas do *T. cruzi* em miocélula cardíaca; H & E - 400X (**A**); 100 X (**B**); **C:** Músculo esquelético com lesão inflamatória peri-vascular e processo de arteriolite, com infiltração da média e oclusão da luz vascular; H & E – 400X; **D:** secção de miocárdio com infiltrado inflamatório denso, substituindo células cardíacas destruídas; H & E – 400X; **E:** Intensa lesão inflamatória em músculo esquelético, com denso infiltrado substituindo fibras destruídas; H & E – 100X; **F:** Secção de músculo esquelético, com grande ninho parasitário íntegro, sem reação inflamatória; H & E – 400X.

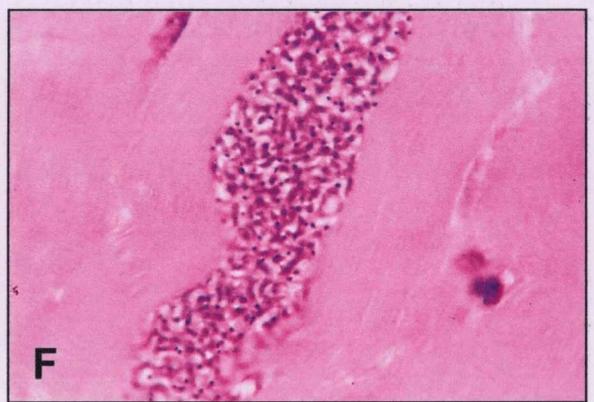
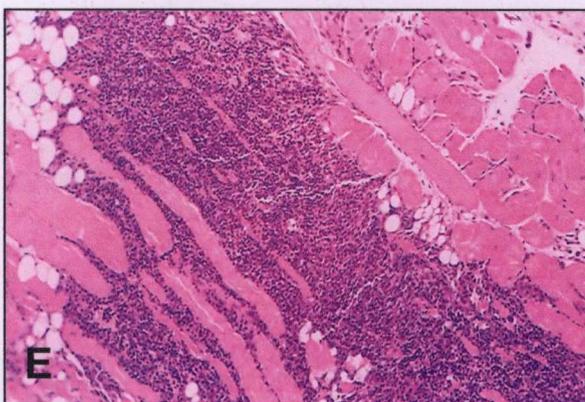
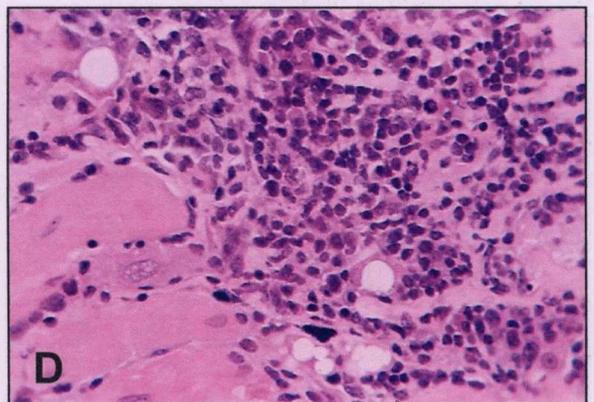
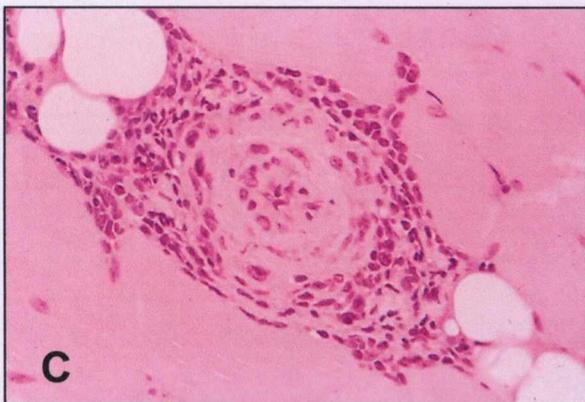
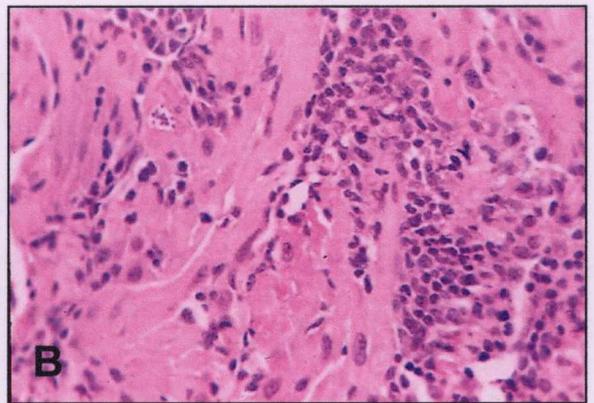
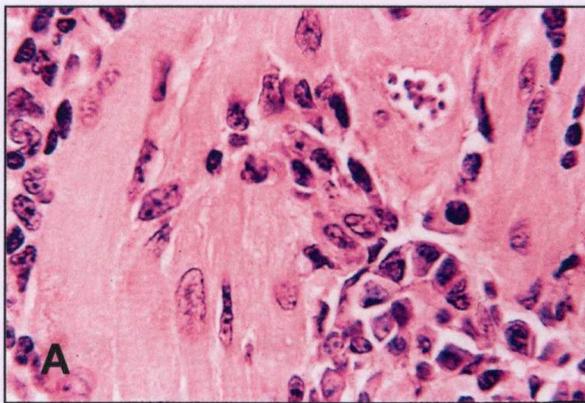


FIGURA 3

Figura 4 - Secções de coração de camundongos infectados com a cepa Colombiana, **tratados com Benzonidazol**, sacrificados 150 com dias (A, B, C, D) ou com 200 dias (E), após o término do tratamento: **A:** Infiltrado mononuclear, focal, perivascular, com envolvimento da parede arteriolar ; H & E – 100X; **B:** miocelulas cardíacas desorganizadas, com depósito intersticial de colágeno frouxo e fragmentado; H & E- 100X; **C:** Área focal de fibrose com discreto e difuso infiltrado mononuclear e presença de células cardíacas com núcleos hipertrofiados e hiper Cromáticos; **D:** área focal sub-epicardica ventricular, com infiltração mononuclear e fibrose; H & E – 100X; **E:** infiltrado inflamatório mononuclear difuso e área focal de espessamento da matriz intersticial com depósito colagênico de aspecto fragmentado, presença de ninho parasitário em célula cardíaca; H & E – 100X.

FIGURA 4

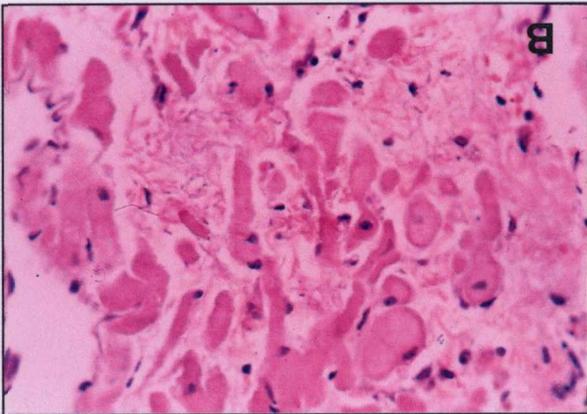
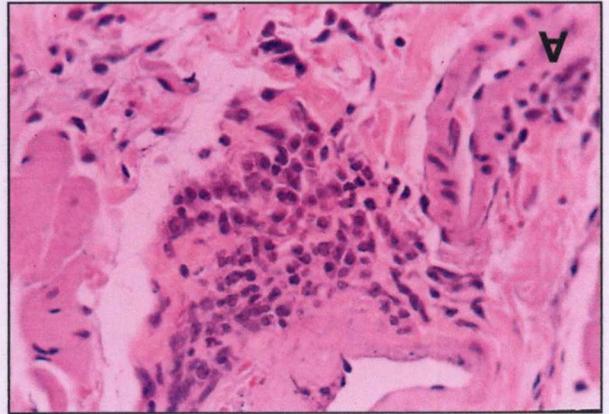
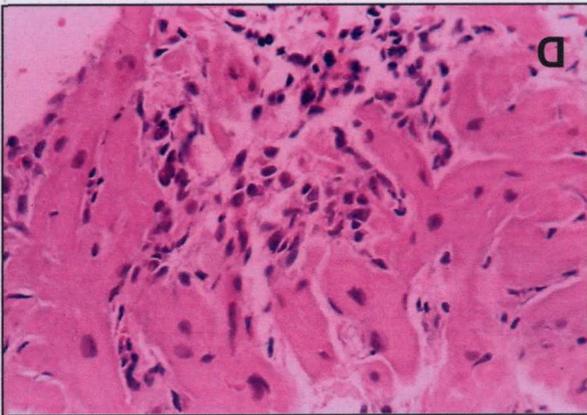
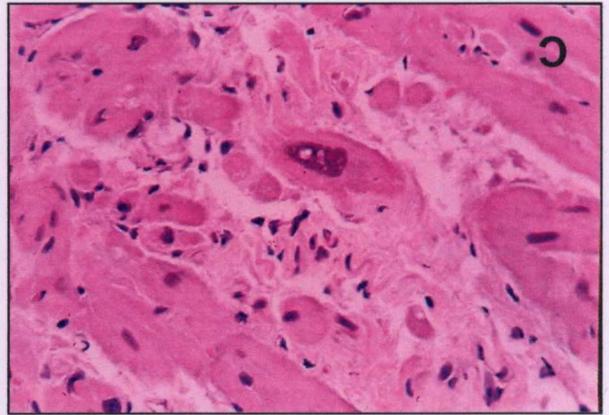
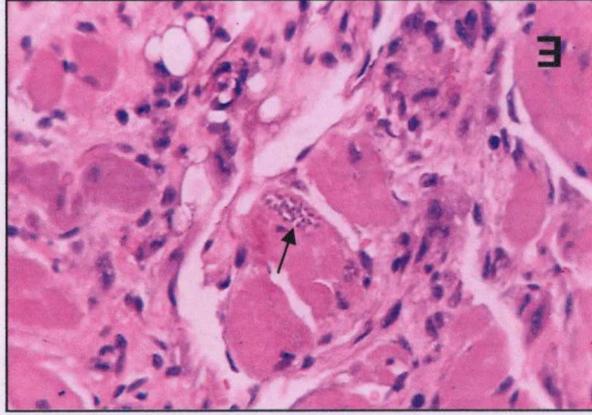


Figura 5 – Secções de miocárdio corados pelo método do Picro-Sirius; camundongos cronicamente infectados com a cepa Colombiana : A e B - Controles não tratados; C e D -tratados com Benzonidazol: **A:** Área focal de fibrose no ventrículo, com feixes colagênicos substituindo células cardíacas destruídas . 400X ; **B:** Depósitos de colágeno com coloração específica pelo Picro-Sirius , formando feixes densos no interstício, ao lado de áreas de fragmentação do colágeno; 400X ; **C,D** : em camundongos tratados com Benzonidazol, observam-se depósitos frouxos no miocárdio com feixes colagênicos finos, fragmentados, ao lado de área focal de colágeno denso; 400X.

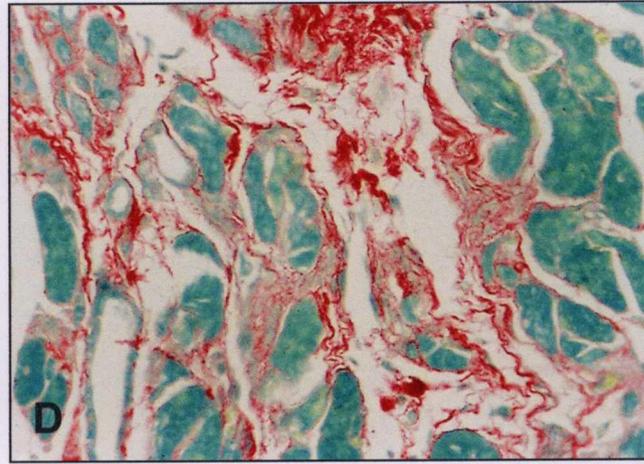
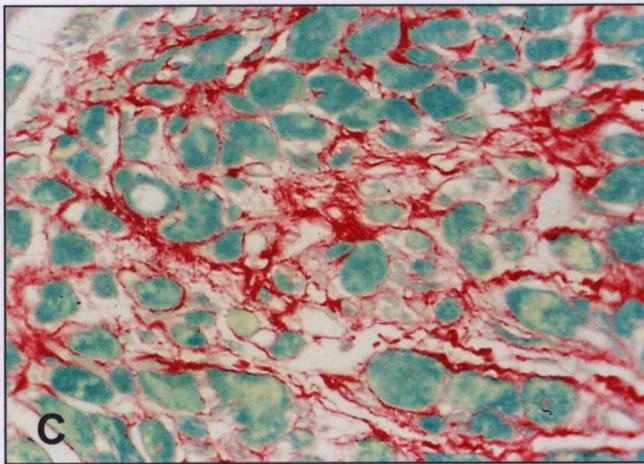
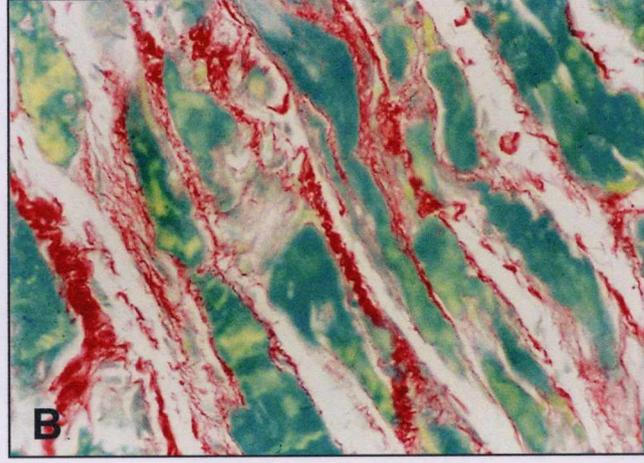
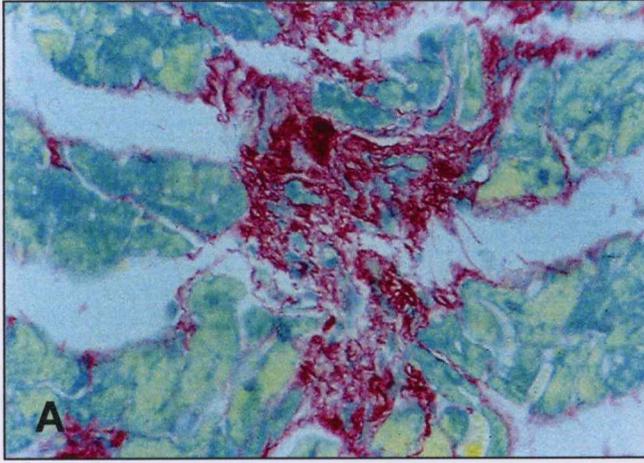


FIGURA 5

Figura 6 – Secções do coração submetidas à imunohistoquímica pela técnica da imuno-peroxidase para demonstração de antígenos do *T. cruzi* em focos inflamatórios (A, B) e em células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDIs)(C, D,E, F, G) : **A , B:** Focos de desintegração de miocélulas cardíacas , que aparecem vacuolizadas, dissociadas por infiltrado mononuclear e depósitos amorfos com marcação positiva para antígenos do *T. cruzi*; 400X. **C, D, E, F, G, H:** células dendríticas com núcleos alongados, marcação positiva na membrana, agrupadas ou isoladas, por vezes aderentes à membrana basal dos miócitos; 400 X.

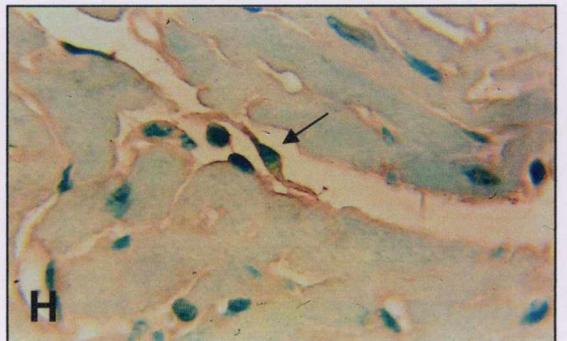
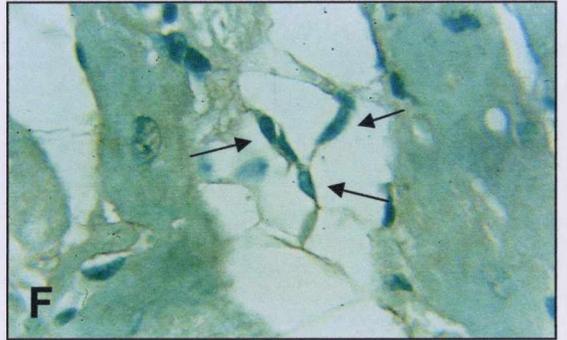
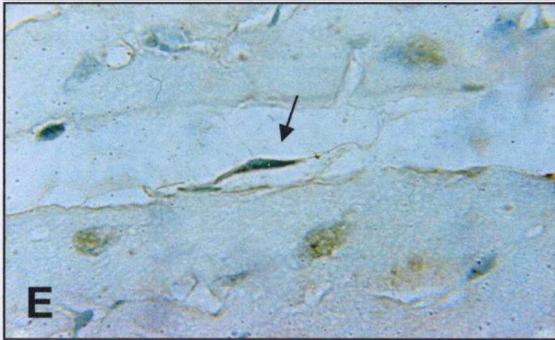
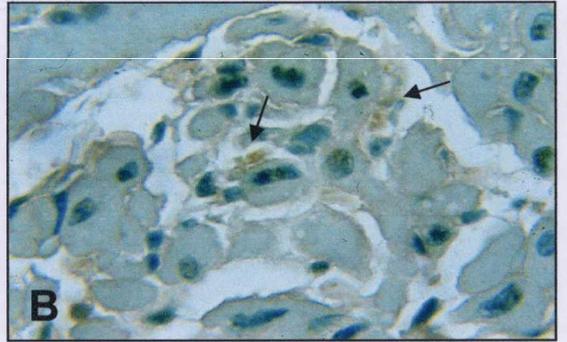
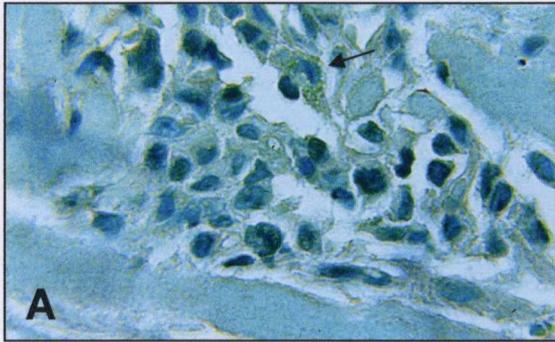


FIGURA 6

Figura 7 – A, B, C, D: Secções do miocárdio de camundongos infectados com a cepa Colombiana, submetidos à imunohistoquímica usando como anticorpo primário o anti-MAC (Pharmlingen). Exemplos de células dendríticas intersticiais (CDIs) com marcação positiva em membrana e no citoplasma. 1000X. **E, F:** Secções de coração de camundongo controle normal submetidos a imunohistoquímica com anticorpo primário anti-MAC mostrando marcação positiva. 1000X.

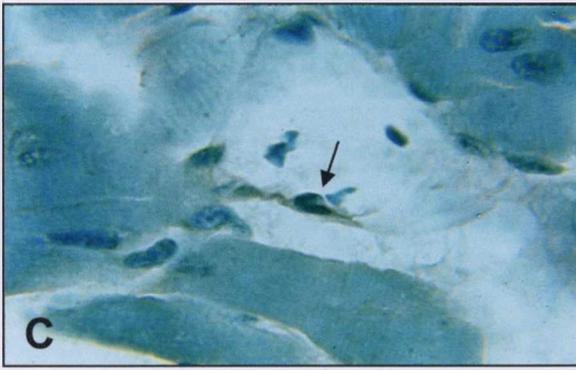
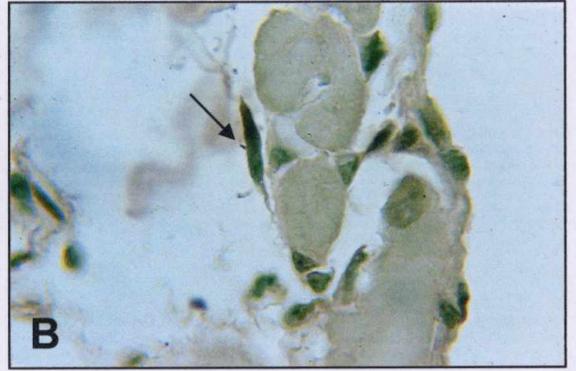


FIGURA 7

Figura 8 – A, B, C, D: Secções do miocárdio submetidas a imunomarcção *in situ* pela técnica da imunofluorescência indireta, usando o anticorpo primário *anti-T. cruzi*; presença de detritos celulares com marcação positiva para os antígenos do *T. cruzi*; 400X.

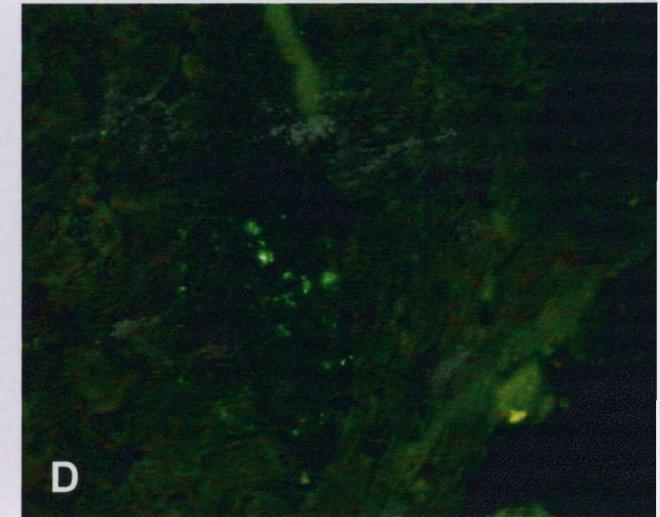
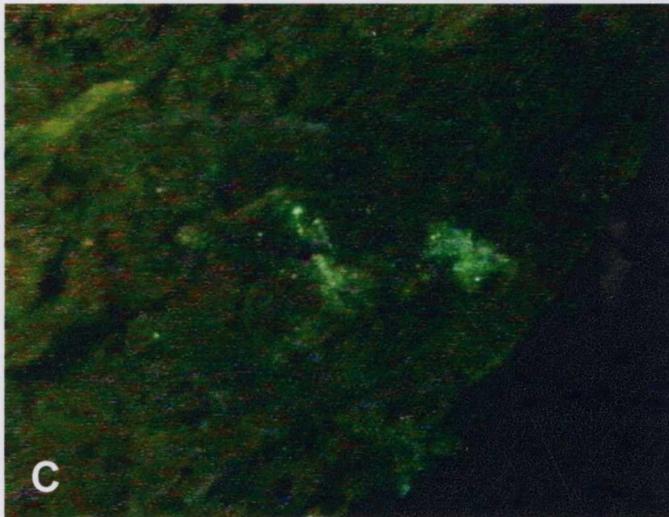
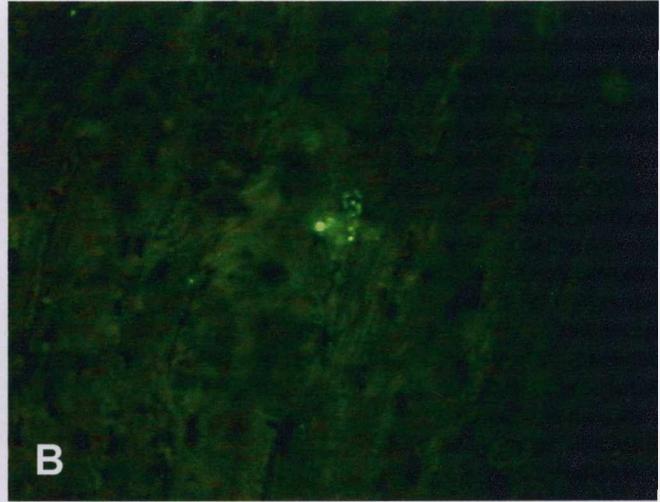
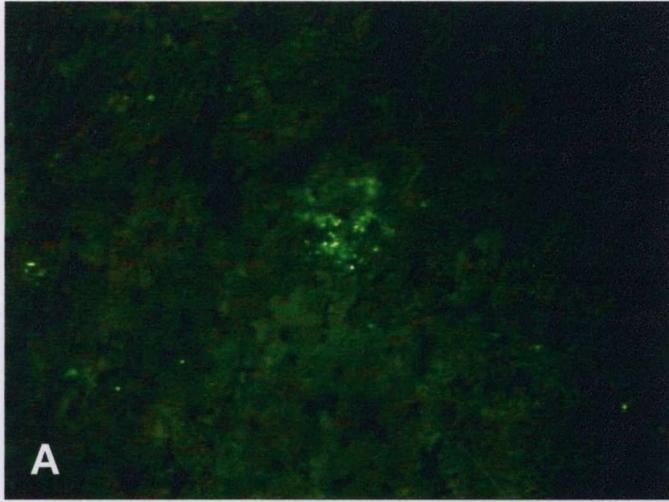


FIGURA 8

INFECÇÃO COM O CLONE 21SF-C3

Figura 9 – Curva parasitêmica da fase aguda da infecção pelo clone 21SF-C3 do *Trypanosoma cruzi*.

Figura 10 – Mortalidade cumulativa dos animais infectados com o clone 21SF-C3 do *Trypanosoma cruzi* até o 50º dia de infecção.

Clone 21SF-C3

Figura 9

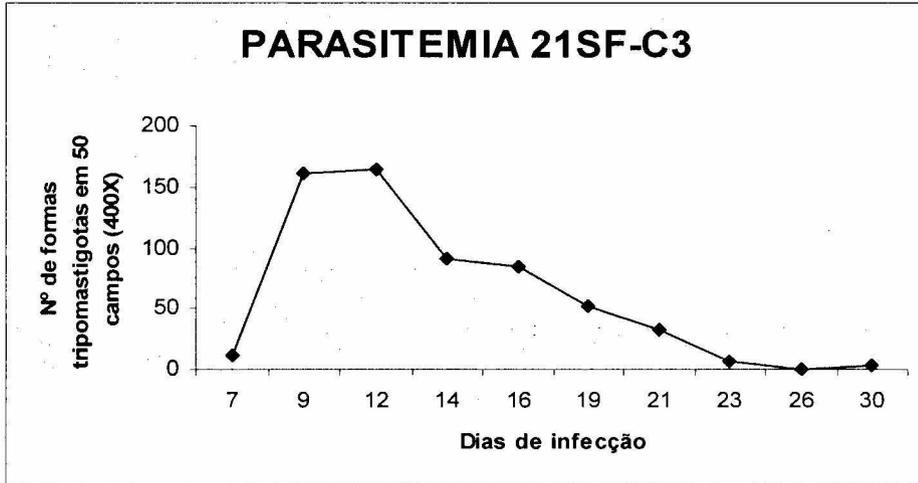


Figura 10

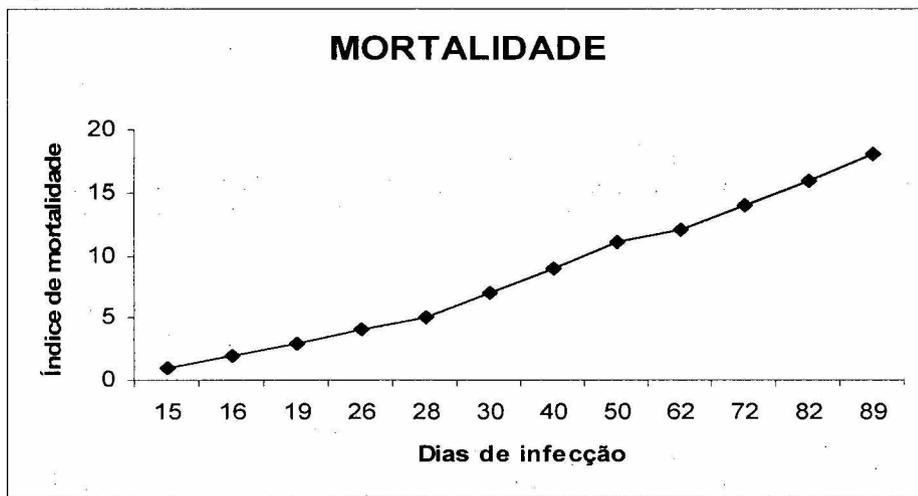


Tabela 5 - Correlação entre os testes de cura parasitológico, histopatológico e sorológico em camundongos infectados com o clone 21SF-C3 (Grupo B) e tratados com Benzonidazol.

| Subgrupo 1 * 150 dias | | Histopatologia | | | |
|---------------------------------|------------------|----------------|----------|----------------------|--------------|
| Código | **Testes de cura | Coração | | Coração e Musc. Esq. | ***Sorologia |
| | | Inflam. focal | / difusa | Parasitismo | |
| ANT21SFC3TR/01 | Neg. | + | + | Neg. | 1:160 |
| ANT21SFC3TR/02 | Neg. | + | + | Pos. | 1:320 |
| ANT21SFC3TR/03 | Neg. | + | + | Neg. | 1:320 |
| ANT21SFC3TR/04 | Neg. | + | + | Neg. | 1:320 |
| ANT21SFC3TR/06 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/08 | Neg. | - | + | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/09 | Neg. | ++ | ++ | Neg. | 1:160 |
| ANT21SFC3TR/10 | Neg. | + | + | Neg. | 1:80 |
| ANT21SFC3TR/11 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/12 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/13 | Neg. | - | + | Neg. | 1:20 |
| ANT21SFC3TR/14 | Neg. | + | + | Neg. | Neg. |
| ANT21SFC3TR/15 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:160 |
| ANT21SFC3TR/16 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:320 |
| ANT21SFC3TR/17 | Neg. | - | + | Neg. | 1:20 |
| ANT21SFC3TR/18 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:10 |
| ANT21SFC3TR/20 | Pos. | + | ++ | Neg. | 1:10 |
| Subgrupo 2 * 200 dias | | | | | |
| ANT21SFC3TR/21 | Neg. | - | + | Neg. | NR |
| ANT21SFC3TR/22 | Neg. | + | + | Neg. | 1:10 |
| ANT21SFC3TR/24 | Neg. | + | ++ | Pos. | 1:10 |
| ANT21SFC3TR/25 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:80 |
| ANT21SFC3TR/26 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:160 |
| ANT21SFC3TR/27 | Neg. | +++ | ++ | Neg. | 1:160 |
| ANT21SFC3TR/28 | Neg. | + | + | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/29 | Neg. | + | - | Neg. | 1:10 |
| ANT21SFC3TR/30 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:20 |
| ANT21SFC3TR/31 | Neg. | - | + | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/32 | Neg. | - | + | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/33 | Neg. | + | + | Neg. | 1:10 |
| ANT21SFC3TR/34 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:40 |
| ANT21SFC3TR/35 | Neg. | - | + | Neg. | 1:10 |
| ANT21SFC3TR/36 | Neg. | - | + | Neg. | Neg. |

| | | | | | |
|----------------|------|---|----|------|------|
| ANT21SFC3TR/37 | Neg. | - | + | Neg. | 1:20 |
| ANT21SFC3TR/38 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:40 |

* Dias pós-término do tratamento

** Parasitemia; Subinoculação; Hemocultura

*** Teste de Imunofluorescência Indireta

+ = Lesão Discreta; ++ = Lesão Moderada; +++ = Lesão intensa ; - = Sem Lesão

P = Positivo; N = Negativo; NR = Não realizado

Tabela 6 - Correlação entre os testes de cura parasitológico, histopatológico e sorológico em camundongos infectados com o clone 21SF-C3 (Grupo B), controles não tratados.

| Código | **Testes de cura | Histopatologia | | | | ***Sorologia |
|-------------------|------------------|------------------------|----|----------------------|--------|--------------|
| | | Coração | | Coração e Musc. Esq. | | |
| | | Inflam. focal / difusa | | Parasitismo | | |
| ANT21SFC3C/01 | Pos. | - | + | Neg. | 1:640 | |
| ANT21SFC3C/02 | Pos. | + | ++ | Neg. | NR | |
| ANT21SFC3C/03 | Neg. | ++ | ++ | Neg. | NR | |
| ANT21SFC3C/04 | Pos. | + | + | Neg. | NR | |
| ANT21SFC3C/05 | Pos. | + | + | Neg. | 1:160 | |
| ANT21SFC3C/06 | Neg. | ++ | ++ | Neg. | 1:640 | |
| ANT21SFC3C/07 | Pos. | + | + | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/08 | Pos. | + | ++ | Neg. | 1:160 | |
| ANT21SFC3C/09 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/10 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/11 | Pos. | + | + | Neg. | 1:640 | |
| ANT21SFC3C/13 | Pos. | + | ++ | Neg. | NR | |
| ANT21SFC3C/14 | Pos. | + | + | Neg. | NR | |
| ANT21SFC3C/15 | Pos. | + | + | Neg. | NR | |
| Subgrupo 2 | | | | | | |
| * 200 dias | | | | | | |
| ANT21SFC3C/16 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:40 | |
| ANT21SFC3C/17 | Neg. | ++ | ++ | Neg. | 1:2560 | |
| ANT21SFC3C/18 | Pos. | + | + | Neg. | 1:80 | |
| ANT21SFC3C/19 | Neg. | + | + | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/20 | Pos. | - | + | Neg. | 1:320 | |
| ANT21SFC3C/22 | Neg. | + | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/24 | Pos. | + | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/25 | Neg. | ++ | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/26 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:1280 | |
| ANT21SFC3C/27 | Pos. | ++ | ++ | Neg. | 1:1280 | |

* Dias pós-término do tratamento

** Parasitemia; Subinoculação; Hemocultura

*** Teste de Imunofluorescência Indireta

+ = Lesão Discreta; ++ = Lesão Moderada; +++ = Lesão intensa ; - = Sem Lesão

P = Positivo; N = Negativo; NR = Não realizado

Tabela 7 - Análise da intensidade das lesões no tecido cardíaco e no músculo esquelético, nos animais infectados com o clone 21SF-C3 do *Trypanosoma cruzi*, tratados e não tratados com Benzonidazol, sacrificados com 150 e 200 dias pós-termino do tratamento .

| | Animais não tratados | | Animais Tratados | |
|------------------------|-----------------------------|--------------------------|-------------------------|--------------------------|
| Subgrupo 1 * | | | | |
| Grau das lesões | Coração | Músc. Esquelético | Coração | Musc. esquelético |
| - | 0/14 | 6/14 | 0/17 | 5/16 |
| + | 7/14 | 8/14 | 11/17 | 10/16 |
| ++ | 7/14 | 0/14 | 6/17 | 0/16 |
| +++ | 0/14 | 0/14 | 0/17 | 0/16 |
| Subgrupo 2 ** | | | | |
| Grau das lesões | Coração | Músc. Esquelético | Coração | Musc. esquelético |
| - | 0/10 | 3/10 | 0/17 | 14/17 |
| + | 3/10 | 4/10 | 10/17 | 2/17 |
| ++ | 7/10 | 3/10 | 6/17 | 1/17 |
| +++ | 0/10 | 0/10 | 1/17 | 0/17 |

* = Animais sacrificados com 150 dias pós-termino do tratamento.

** = Animais sacrificados com 200 dias pós-termino do tratamento.

Tabela 8 - Identificação de antígenos do *Trypanosoma cruzi* em focos inflamatórios (debritos parasitários) e na membrana de células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDIs) em camundongos cronicamente infectados com o clone 21SF-C3: Tratados com Benzonidazol e Controles não tratados

| Coração | | | | | |
|---------------------------|-----|----|------------------------|-----|----|
| Tratados com Benzonidazol | | | Controles não Tratados | | |
| Código | CDI | DP | Código | CDI | DP |
| ANT21SFC3TR/01 | + | - | ANT21SFC3C/03 | + | - |
| ANT21SFC3TR/02 | + | + | ANT21SFC3C/04 | + | - |
| ANT21SFC3TR/03 | + | - | ANT21SFC3C/06 | + | + |
| ANT21SFC3TR/10 | + | - | ANT21SFC3C/14 | + | - |
| ANT21SFC3TR/16 | + | - | ANT21SFC3C/15 | + | - |
| ANT21SFC3TR/22 | + | + | ANT21SFC3C/22 | + | + |
| ANT21SFC3TR/24 | + | + | ANT21SFC3C/25 | + | + |
| ANT21SFC3TR/25 | + | + | ANT21SFC3C/26 | + | + |
| ANT21SFC3TR/27 | + | + | | | |
| ANT21SFC3TR/38 | + | + | | | |

CDI = Células Dendríticas Intersticiais do Miocárdio

DP = Detritos parasitários do *T. cruzi*

Figura 11 – Secções de coração de camundongos infectados com o clone 21SF C3. **Controles não tratados** – A e B – sacrificados com 150 dias pós-tratamento. **A:** Infiltrado inflamatório mononuclear focal, subepicárdico, propagando-se para o miocárdio, sem destruição de miócitos. H & E, 100X; **B** – Infiltrado mononuclear discreto e difuso, dissociando as miocélulas cardíacas, com adensamento em torno de arteríolas e depósito matricial fibrilar no interstício. H & E, 100X. C e D – sacrificados 200 dias pós-tratamento. **C** – Arterite focal com denso infiltrado peri-arteriolar e comprometimento da camada média da arteríola pelo infiltrado; hialinização subendotelial. H & E, 400X; **D** - Área focal de destruição de miócitos, com infiltrado inflamatório intersticial e substituição por área de fibrose do miocárdio. H & E, 400X.

FIGURA 11

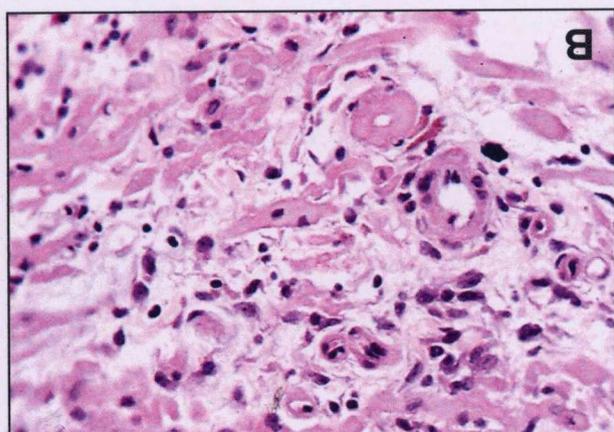
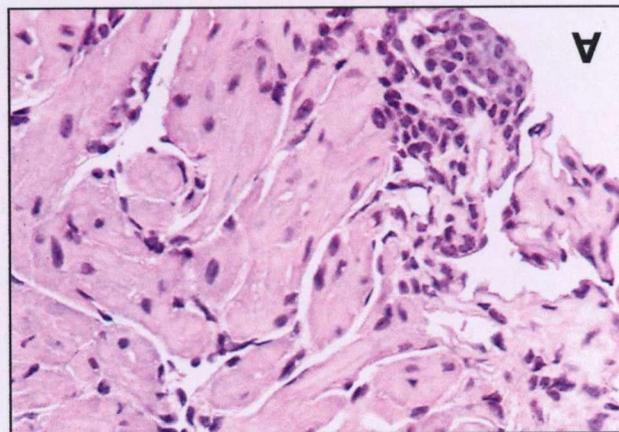
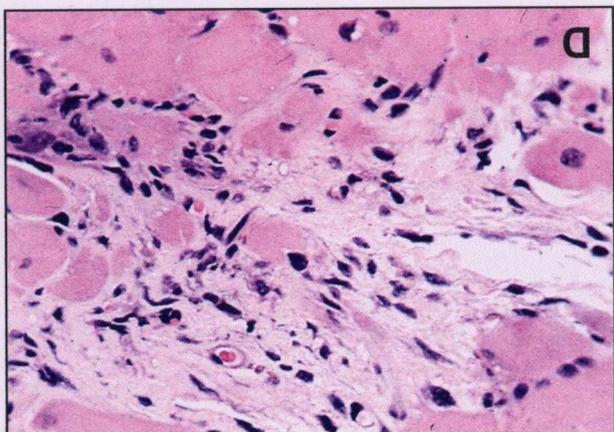
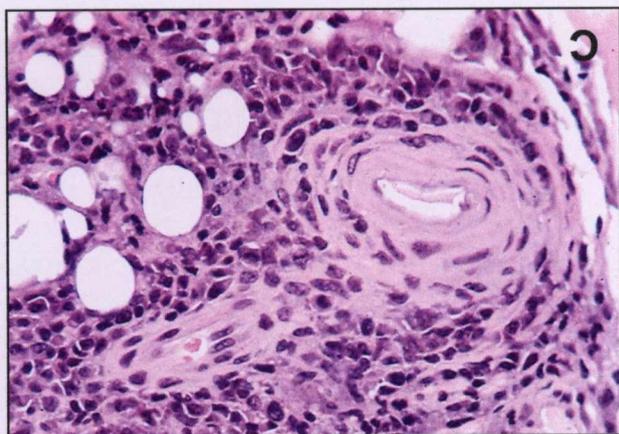


Figura 12 – Secções do miocárdio de camundongos infectados com o clone 21SF C3 . **Tratados com Benzonidazol** - A , B, C – sacrificados 150 dias pós-tratamento . **A:** aspecto geral da região dos vasos da base do coração com denso infiltrado inflamatório mononuclear peri-vascular. H & E, 100X ; **B** – Detalhe da figura anterior, mostrando a propagação do infiltrado inflamatório ao miocárdio. H & E, 400X; **C:** Presença de foco de fibrose no miocárdio com depósito de colágeno frouxo, de aspecto fragmentado. H & E, 400X; D e E – sacrificados 200 dias após o término do tratamento: **D** – Destruição focal de miócitos e infiltrado inflamatório focal com células mononucleares com núcleos picnóticos, e matriz intersticial frouxa. H & E, 400X; **E** – Área com difuso infiltrado inflamatório e depósito matricial escasso, dissociando as células cardíacas. H & E, 400X

FIGURA 12

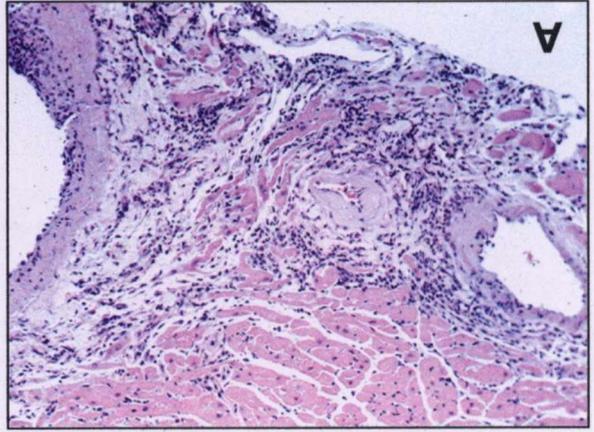
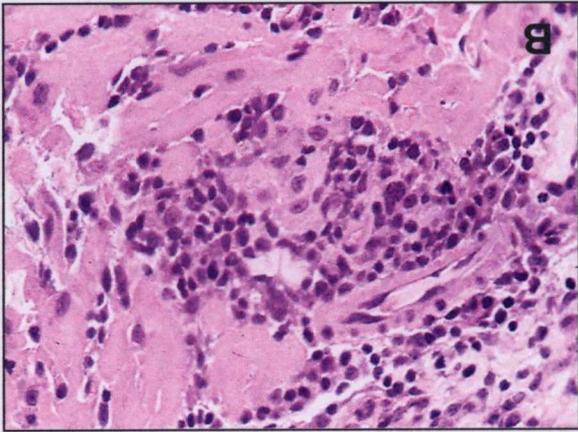
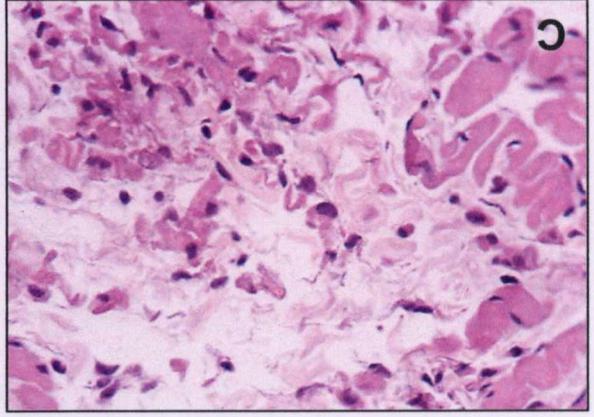
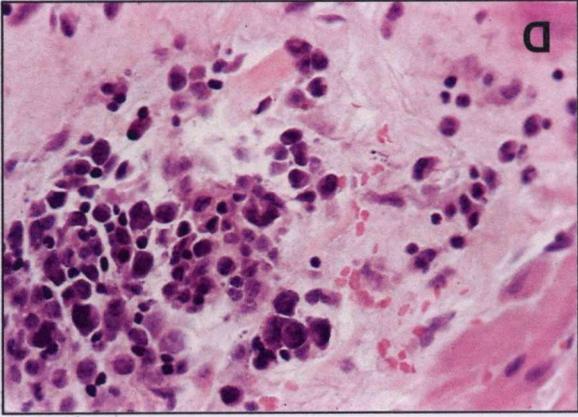
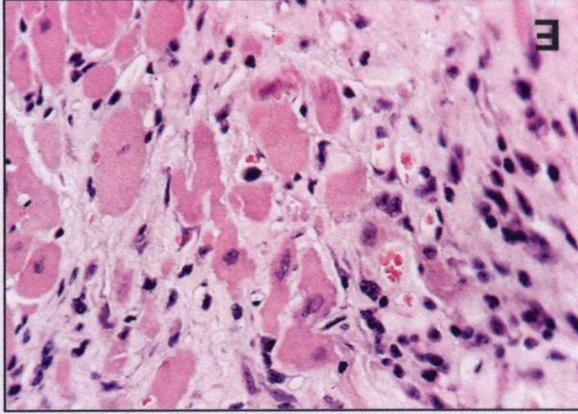


Figura 13 - Secções do miocárdio de camundongos infectados com o clone 21SF C3, coradas pelo método do Picro-Sirius: **A, B : Controles não tratados** – Feixes colagenicos densos delimitando as miocelulas cardíacas em áreas focais ou formando extensos depósitos intersticiais. 400X. **C, D: Tratado com Benzonidazol** - Fibrose intersticial difusa formada por finos feixes descontínuos com fragmentação das fibras colágenas. 400X.

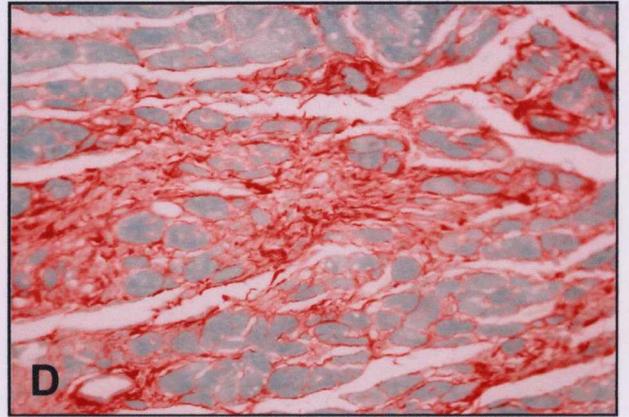
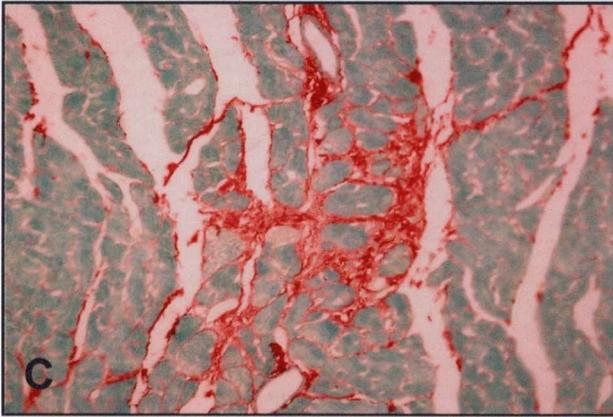
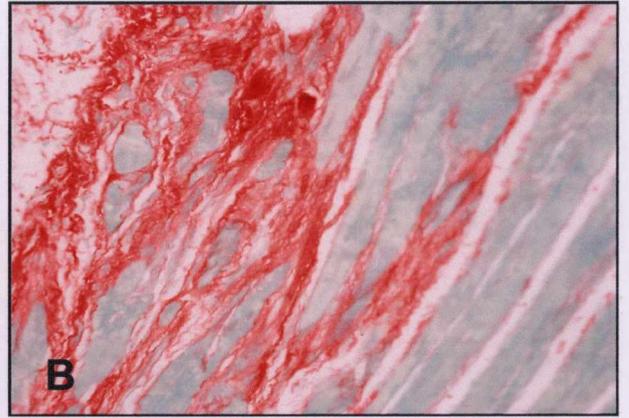
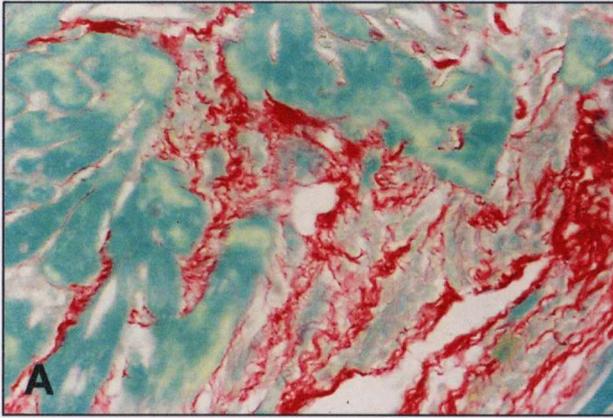


FIGURA 13

Figura 14 – Secções de miocárdio de camundongos cronicamente infectados com o clone 21SF C3; método da imunoperoxidase, para marcação de parasitos e de antígenos parasitários, em células dendríticas intersticiais do miocárdio (CDIs) e em focos inflamatórios, usando anticorpo policlonal anti-*T. cruzi*. **A, B:** Detritos celulares com marcação positiva em meio ao infiltrado inflamatório e no citoplasma de macrófago 1000X. **C** – presença de detritos parasitários em células cardíacas. 1000X. **D, E, F:** CDIs no interstício do miocárdio com marcação positiva na membrana e nos seus filamentos; 1000X. **G** - CDI no interstício, com marcação positiva da membrana, com citoplasma abundante contendo formas amastigotas do *T. cruzi* 1000X.

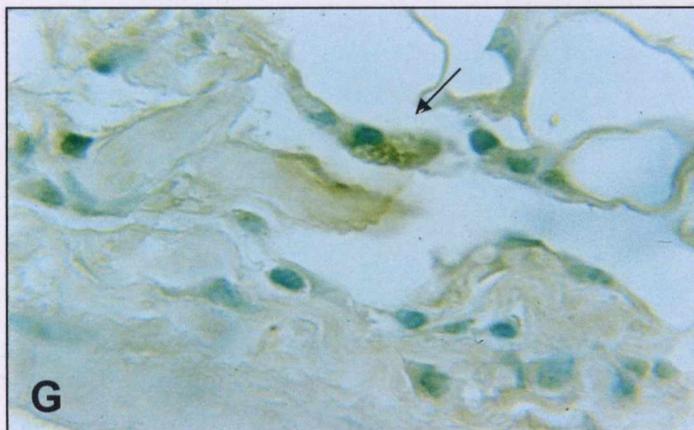
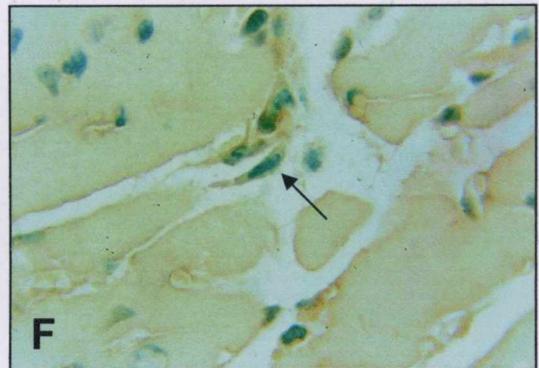
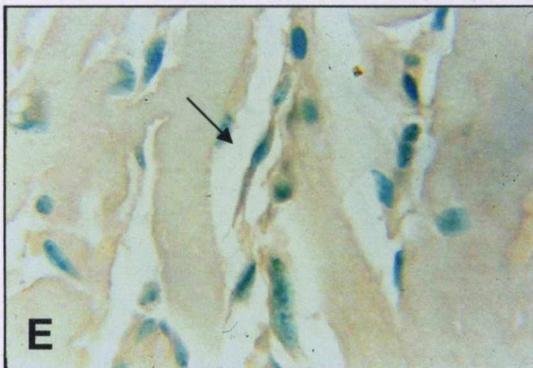
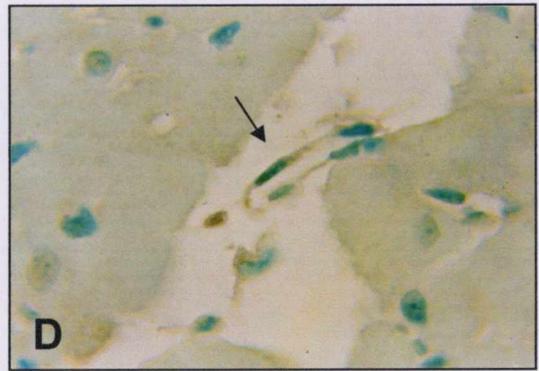
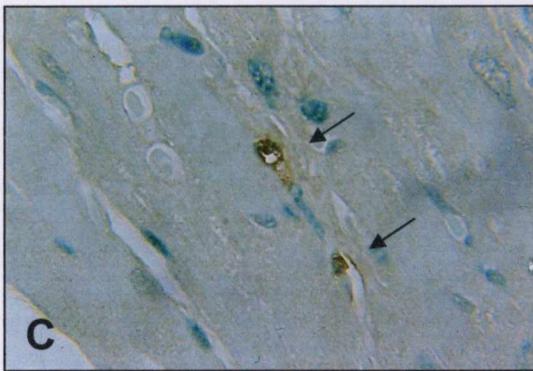
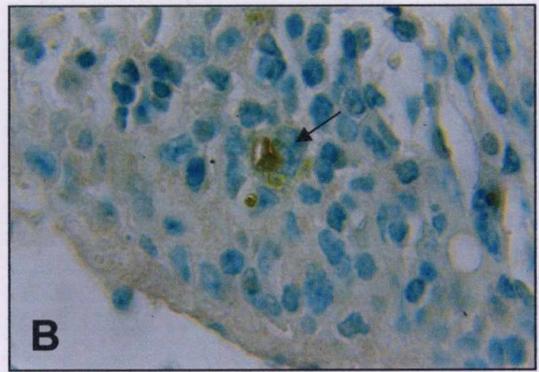
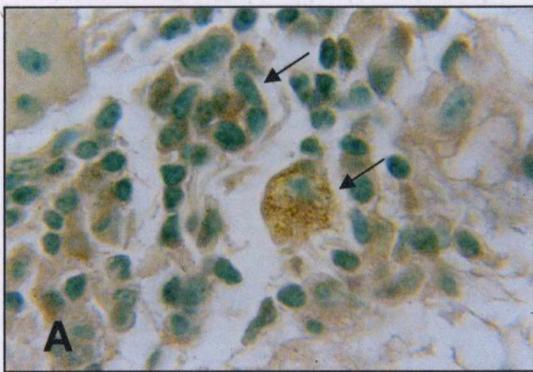


FIGURA 14

Figura 15 – Secção do miocárdio submetida à imunomarcação pelo método da imunofluorescência indireta, usando anticorpo primário anti-*T. cruzi* produzido em coelho e como anticorpo secundário, anti-IgG de coelho produzido em cabra, conjugado a FITC (Sigma) numa diluição de 1:160. Depósitos amorfos em foco inflamatório, com marcação positiva para antígenos do *T. cruzi*. 400X.