



UFBA

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



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CEPAS DO
TRYPANOSOMA CRUZI DE DIFERENTES BIODEMAS: COMPARAÇÃO DA
RESPOSTA ENTRE CEPAS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO
QUIMIOTERÁPICO**

MARCOS LÁZARO DA SILVA GUERREIRO

Salvador – Bahia – Brasil

2014

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

Curso de Pós-Graduação em Patologia

**INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CEPAS DO
TRYPANOSOMA CRUZI DE DIFERENTES BIODEMAS: COMPARAÇÃO DA
RESPOSTA ENTRE CEPAS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO
QUIMIOTERÁPICO**

MARCOS LÁZARO DA SILVA GUERREIRO

Orientadora: Prof^ª Dr^ª Sonia Gumes Andrade

Tese apresentada ao Curso de Pós-
Graduação em Patologia Humana para
a obtenção do grau de Doutor.

Salvador –Bahia - Brasil

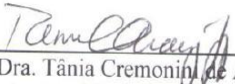
2014


INFLUÊNCIA DO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL NA RESPOSTA
IMUNOLÓGICA DE CAMUNDONGOS INFECTADOS COM CEPAS DO
TRYPANOSOMA CRUZI DE DIFERENTES BIODEMAS: COMPARAÇÃO DA
RESPOSTA ENTRE CEPAS SUSCETÍVEIS E RESISTENTES AO QUIMIOTERÁPICO

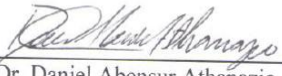
MARCOS LÁZARO DA SILVA GUERREIRO


Folha de Aprovação

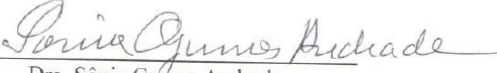
Comissão Examinadora


Dra. Tânia Cremonini de Araújo Jorge
Pesquisadora Titular do Instituto Oswaldo Cruz
Fiocruz/RJ


Dra. Simone Garcia Macambira
Professora Adjunta da Universidade Federal da
Bahia - UFBA


Dr. Daniel Abensur Athanazio
Professor Adjunto da Universidade federal da
Bahia -UFBA


Dr. Marcos Vannier dos Santos
Pesquisador Titular
CPqGM/FIOCRUZ


Dra. Sônia Gumes Andrade
Pesquisadora Titular
CPqGM/FIOCRUZ

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

Guerreiro, Marcos Lázaro da Silva

G934i Influência do tratamento com benzonidazol na resposta imunológica de camundongos infectados com cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes biodemas: comparação da resposta entre cepas suscetíveis e resistentes ao quimioterápico / Marcos Lázaro da Silva Guerreiro. - 2014.

155 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof^a. Dr^a Sonia Gumes Andrade.

Laboratório de Chagas Experimental.

Tese (Doutorado) - Universidade Federal da Bahia. Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, 2014.

FONTES DE FINANCIAMENTO

Ao centro de Pesquisa Gonçalo Moniz (CPqGM) – Fiocruz Unidade Bahia, pelas condições físicas e institucionais para realização deste trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES): pela concessão da bolsa de Doutorado nos períodos 2009 a 2013.

Ao curso de Pós-graduação em Patologia Humana, e ao corpo docente pelos ensinamentos, conduta e discussões científicas.

AGRADECIMENTOS

- À **minha orientadora** Dra. Sonia G. Andrade, pelos ensinamentos científicos, discussões e orientações basilares para minha formação intelectual e científica. Fica registrada minha mais profunda admiração pela postura ética, pelo exemplo de profissional e sobre tudo pela garra, entusiasmo, dedicação, paciência e carinho durante os ensinamentos científicos. Meu muito OBRIGADO!
- 1.0 À **Dra. Rozalia M. Campos**, por fazer parte da minha trajetória de forma basilar desde os primeiros anos de iniciação científica até os dias atuais. Por ter ensinado valores singulares na minha formação intelectual, profissional, ética e, pelo carinho sempre demonstrado;
 - 2.0 O **Prof. Dr. Zilton Andrade**, pelo exemplo de pesquisador e cientista;
 - 3.0 À **Dra. Márcia Souza**, por fazer parte da minha trajetória profissional, pela amizade, respeito e carinho sempre demonstrados;
 - 4.0 À Doutoranda **Isa Moraes**, pelo amor fraternal que nos une, pelo companheirismo e confiança sempre demonstrados;
 - 5.0 Ao Doutorando **Thiago de Almeida Pereira**, pelo amor fraternal que nos une, e pelos gestos de companheirismo e cumplicidade sempre demonstrados;
 - 6.0 Ao Doutor **Daniel Pessina**, pela ajuda em todos os momentos dessa Tese, pelos laços de amizade desde os tempos de graduação e pelo companheirismo;
 - 7.0 Aos **amigos e colegas do LACEI**, pela convivência e ensinamentos. Em especial, Márcio Almeida, Lorena Magalhães, Monica Rebouças, pela amizade;
 - 8.0 Ao Mestre Biólogo **Juracy Magalhães** (*In memoriam*) pelos ensinamentos técnicos e companheirismo. Você deixou muitas saudades!
 - 9.0 **Fátima Magalhães** pela pessoa singular que é. Pela nossa amizade ao longo dos anos e pelo carinho diário.

- 10.0 À técnica **Dinalva França de Jesus**, pelas culturas utilizadas neste trabalho, pelo carinho e amizade nos momentos mais difíceis ao longo dos anos de convivência. Meu muito OBRIGADO!
- 11.0 **Mirella C. Branco** pela amizade incondicional e singular que nos une.
- 12.0 À Bióloga **Ariane Pimentel**, amizade e convivência.
- 13.0 A doutoranda **Renata Portella**, pela amizade, convivência e companheirismo profissional.
- 14.0 A Dra. **Fabiola Cardillo**, pela amizade e convivência;
- 15.0 Ao funcionário **Preciano Correia**, pela dedicação e cuidado dos animais utilizados nesse trabalho.
- 16.0 A todos os meus amigos do LAPEX, em especial **Everton Batista, Elisangela Trindade, Samaly Souza, Tiago Landin, Miguel Tolentino, Ana Cristina**, pela amizade e por sempre estarem disponíveis em ajudar.
- 17.0 Ao técnico **Antônio Carlos**, pelo carinho, amizade, cuidado e auxílio prestado sempre nos momentos difíceis.
- 18.0 Aos meus alunos **Amanda Catariny, Anderson Basílio e Cayo Amaral** pela amizade e companheirismo.
- 19.0 Todos os funcionários da Biblioteca e, em especial a **Ana Maria Fiscina Vaz e Eliana de Souza Garcia** pelo carinho e cuidado na formatação desse trabalho.
- 20.0 Às secretárias **Miralva Andrade e Jaqueline Simas**, pela ajuda e amizade.
21. À funcionária do MASP, **Maria José dos Santos** pela limpeza do ambiente de trabalho.
- 22.0 A todos os funcionários do biotério pelo cuidado e carinho junto aos animais utilizados na realização deste trabalho. Em especial, à **Fernanda** e ao **Vitor Maffili**, por todo o esforço, compreensão e eficiência na liberação dos animais.

- 23.0 A equipe técnica do Laboratório de Histotecnologia da Fundação Oswaldo Cruz (FIOCRUZ) – Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela eficiência no processamento das lâminas, e pela amizade sempre demonstrada.
- 24.0 A equipe da Pós-graduação, nas pessoas de **Tuar Sampaio, Flavia Dias e Ana Carolina Sodré**, pelo excelente tratamento desprendido junto a minha pessoa, pela organização, paciência e auxílio nas questões administrativas.
- 25.0 A **Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz** (Fiocruz-Unidade Bahia) por toda infra-estrutura essencial na minha formação profissional e no desenvolvimento dessa Tese e, de todos os meus trabalhos já realizados e em andamento.
- 26.0 Ao **corpo docente** do curso de Pós-Graduação em Patologia pelos ensinamentos e exemplo de profissionais.
- 27.0 Aos amigos e colegas da pós-graduação, em especial a **Lucilene Silva, Fábio Batista, Círio Gomes** pela grande amizade que nos une ao longo desses anos de pós-graduação.
- 28.0 A todos os meus amigos, pela compreensão e ajuda no decurso desses dos anos.
- 29.0 Ao meu pai **Hélio Guerreiro** (*In memorian*) pelo amor demonstrado;
- 30.0 Ao meu pai, **Sostenes Alves**, pelo amor incondicional dedicado a minha pessoa durante todos esses anos de convivência;
- 31.0 A minha mãe, **Iolita Coutinho** (*In memorian*), pelo amor incondicional dedicado em cada suspiro de minha existência, pelo desprendimento de sua felicidade em prol de cada desejo filial. E aos laços eternos de amor que há séculos nos unem e pelo sublime coração maternal que me abriga. Mãe um dia estaremos juntos outra vez. Te amo eternamente!!!
- 32.0 A Deus energia vital para meu viver!!!

*A minha amada Mãe, Iolita Coutinho (in
memorian), por uma vida de dedicação, cuidado
e de muito amor!*

A Deus, energia vital do meu viver!!!

GUERREIRO, Marcos Lázaro da Silva. Influência do tratamento com benzonidazol na resposta imunológica de camundongos infectados com cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes biodemas: comparação da resposta entre cepas suscetíveis e resistentes ao quimioterápico. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

RESUMO

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* determina uma resposta imunológica inata do hospedeiro vertebrado, decorrente da multiplicação parasitaria em macrófagos e a produção de Interferon gama (IFN γ) pelas células T ativadas, além de estimulação policlonal de células do baço, com imunossupressão. Por outro lado tem sido demonstrado que o tratamento com quimioterápico Benzonidazol em camundongos infectados, além de determinar uma destruição dos parasitos, tem também uma ação sobre o sistema imunológico em camundongos infectados com cepas do *T. cruzi* com diferentes graus de suscetibilidade ao Benzonidazol, como a cepa Y (suscetível ao quimioterápico) e a cepa Colombiana (resistente). No presente estudo procura-se investigar a influência do tratamento com o Benzonidazol sobre a resposta imunológica em camundongos infectados com cepa suscetível (Cepa Y) ou resistente (Colombiana). Foram utilizados 320 camundongos, subdivididos em grupos experimentais: Infectados tratados cepa Y (YT) e não tratados (Y-NT); Colombiana tratados (COL-T) e não tratados (COL-NT), Tratados não infectados (TNI) e Controles sem tratamento (CI). O inóculo foi de $1,0 \times 10^4$ por via intraperitoneal. O tratamento foi iniciado no pico parasitêmico de cada cepa, sendo no 7^o dia após a infecção nos animais infectados pela cepa Y e, nos tratados e não infectados, no 18^o dia de infecção na cepa Colombiana. A quimioterapia foi realizada em 60 doses (100mg/kg/dia de Benzonidazol-Benz). Os camundongos sacrificados na fase aguda e na fase crônica em todos os grupos tiveram as seções de coração e músculo esquelético coletadas, fixadas e processadas para o estudo histopatológico em seções coradas pela Hematoxilina & Eosina e Picro-Sirius. Investigou-se a resposta humoral pela sorologia (Imunofluorescência indireta) e pela reação de Elisa. A resposta celular pela proliferação celular do baço, e pela avaliação quantitativa das subpopulações celulares no baço de CD4+, CD8+, células de memórias CD62L, células B e macrófagos. Também foi investigada a hipersensibilidade tardia pelo teste cutâneo (DTH). Os títulos sorológicos variaram de negativo a 1/640 YT, de 1/80 a 1/640 COL-T, de 1/80 a 1/2560 COL-NT, de negativo a 1/10 nos grupos TNI e CI. A dosagem das imunoglobulinas IgM, IgG₁, IgG_{2a} e IgG total, mostraram-se mais elevadas no grupo COL-NT em relação aos grupos avaliados. A dosagem das citocinas circulantes IL-6 IL-10, MCP-1, INF- γ e TNF- α , foram mais elevadas na cepa Y, e o tratamento com Benz, não foi capaz de alterar os índices circulantes nos animais TNI. As análises citométricas do baço na fase aguda demonstraram maior frequência de CD4+ e CD8+ no grupo TNI; de células de memória (CD62L/CD4 e CD8) no grupo YT; de CD11b no grupo COL-NT fase aguda e na YT na fase crônica; e de células B (B220) no grupo CI. Na fase crônica foi evidenciado maior frequência de CD4+ e CD8+ no grupo COL-T; de células de memória: (CD4/CD62L) no grupo YT e (CD8/CD62L) no COL-T; de CD11b no YT; e de células B (B220) CI. Em nossos resultados constatamos pela análise dos infiltrados inflamatórios (miocárdio e músculo esquelético) lesões mais extensas no grupo COL-NT em relação a todos os grupos analisados (COL-T, YT). A análise do teste cutâneo de hipersensibilidade tardia demonstrou maior celularidade evidenciada pelos infiltrados inflamatórios e pelo edema nos tempos de 48 e 72 horas no grupo YT. Nossos resultados sugerem que o tratamento com Benz tem influência sobre a resposta imunológica em camundongos.

Palavras-chave: *T. cruzi*, Biodemas, Benzonidazol, Resposta imunológica, imunoregulação, susceptibilidade/resistência.

GUERREIRO, Marcos Lázaro da Silva. Influence of treatment with Benznidazole on the immunological response of mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different Biodemes: comparison between susceptible and resistant strains to chemotherapy with BENZ. Tese (Doutorado) - Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador, 2014.

ABSTRACT

Infection with *T. cruzi* determines an immunological response in the vertebrate host, with parasites multiplication in macrophages, with production of TNF α by these cells and IFN γ , by stimulated T. cells: a polyclonal multiplication of spleen cells is present, with immunosuppression. Treatment of infected mice with BENZ showed that this chemotherapy determines parasitic destruction and also stimulates the immunological system in mice infected either with the Y or the Colombian strain which differs in the susceptibility to chemotherapy with BENZ. In the present study we intend to investigate the influence of treatment with BENZ on the immunological response in mice infected either with the Y strain (susceptible) or the Colombian strain (resistant). This study was performed by comparing the results obtained with the groups of mice not infected and treated, and infected controls, not treated. Material and methods : Number of animals: 320, sub-divided in the experimental groups: Y strain infected and treated with BENZ (YT) or not-treated (YNT); Colombian treated (COL-T) and not-treated (COL-NT); treated not infected (TNI); Control not treated (COL-NT). Inoculum : 1×10^4 trypomastigotes, (blood forms) injected intraperitoneally. Treatment was initiated in the peak of parasitemia for each strain: 7th day for the Y strain and in the 18th day in the infection with the Colombian strain. Chemotherapy was performed in 60 doses (100mg x kg x day) of BENZ. Mice were killed in the acute and chronic phases post infection; sections of the heart and skeletal muscles were collected, fixed and processed for histopathology, in sections stained with Hematoxylin and Eosin, and with Picro-Sirius staining, for collagen. The humoral response was evaluated by serological reactivity of indirect immunofluorescence and ELISA reaction. Cellular responses were evaluated by cellular proliferation in the spleen of CD4+, CD8+ and memory cells (CD62L) macrophages and B cells. DTH was evaluated by intradermal skin test. Serological titres varied in the several groups follows: YT: 0 - 1/640; COL-T: 1/80 to 1/640; COL-NT: 1/80 to 1/2560; TNI and CI: 0 - 1/10. Immunoglobulins levels (IgM, IgG1, IgG2a and total IgG) were higher in the groups COL-NT as compared with the other groups. Evaluation of serum cytokines levels (IL-6, IL-10, MCP-1, IFN- γ and TNF- α): They were higher in mice infected with the Y strain. Treatment with Benznidazole/BENZ did not influence the levels of cytokines in the group TNI. Cytometric analysis of the spleen in the acute phase showed a higher frequency of CD4+ and CD8+ cells in the group TNI; B cells (B220) in the CI group. In the chronic phase it has been shown a higher frequency of CD4+ AND CD8+ in the groups COL-T; memory cells (CD4/CD62L) in the group YT; CD8/CD62L in the group COL-T; CD11B in the group COL-T acute phases the YT acute chronic. Histopathology of the heart and muscles showed presence of inflammatory infiltrates more intense in the group COL-NT as compared with the several groups. The Skin Test for DTH revealed a higher cellularity of the inflammatory infiltrates in the groups YT, with 48 and 72 hours. Results suggest an influence of treatment with BENZ on the immunological response.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Chemotherapy-Benznidazole, Resistance, Susceptibility, Immunological response.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Mapa representativo da distribuição das linhagens de <i>T. cruzi</i> I ou VI nas Américas	30
Figura 2	Análise da parasitemia dos animais infectados com a cepa Colombiana e Y do <i>T. cruzi</i>	65
Figura 3	Índice de mortalidade nos animais infectados com a cepa Colombiana e Y do <i>T. cruzi</i> .	66
Tabela 1	Títulos de sorológicos do anticorpo IgG na fase aguda em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com as cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento. O fármaco utilizado foi o Benzonidazol.	67
Tabela 2	Títulos de anticorpos IgG na fase crônica em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com as cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento. O fármaco utilizado foi o Benzonidazol.	68
Figura 4	Dosagem pelo método de ELISA do anticorpo IgM, na fase aguda e crônica em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com as cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento. O fármaco utilizado foi o Benzonidazol.	69
Figura 5	Dosagem pelo método de ELISA do anticorpo IgG1, na fase aguda e crônica em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com as cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento. O fármaco utilizado foi o Benzonidazol.	70
Figura 6	Dosagem pelo método de ELISA do anticorpo IgG2a, na fase aguda e crônica em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com as cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento. O fármaco utilizado foi o Benzonidazol	71

Figura 7	Dosagem pelo método de ELISA do anticorpo IgG total, na fase aguda e crônica em camundongos tratados não infectados, infectados e tratados com as cepas Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Colombiana e controles sem tratamento. O fármaco utilizado foi o Benzonidazol	72
Figura 8	Cinética dos níveis plasmáticos de IL-6, em camundongos suíços não isogênicos durante a infecção experimental por cepa suscetível e resistente do <i>T. Cruzi</i> , submetidos ao tratamento com Benzonidazol	74
Figura 9	Cinética dos níveis plasmáticos de IL-10, em camundongos suíços não isogênicos durante a infecção experimental por cepa suscetível e resistente do <i>T. Cruzi</i> , submetidos ao tratamento com Benzonidazol	76
Figura 10	Cinética dos níveis plasmáticos de MCP-1, em camundongos suíços não isogênicos durante a infecção experimental por cepa suscetível e resistente do <i>T. Cruzi</i> , submetidos ao tratamento com Benzonidazol	77
Figura 11	Cinética dos níveis plasmáticos de IFN- γ , em camundongos suíços não isogênicos durante a infecção experimental por cepa suscetível e resistente do <i>T. Cruzi</i> , submetidos ao tratamento com Benzonidazol	79
Figura 12	Cinética dos níveis plasmáticos de TNF- α , em camundongos suíços não isogênicos durante a infecção experimental por cepa suscetível e resistente do <i>T. Cruzi</i> , submetidos ao tratamento com Benzonidazol	81
Figura 13	Avaliação da celularidade (hiperplasia) do baço em animais infectados e tratados com Benzonidazol, infectados e não tratados e tratados e não infectados	82
Figura 14	Avaliação da quantitativa das populações de linfócitos T no baço de camundongos suíços não isogênicos, que apresentaram o marcador CD4 ⁺	84
Figura 15	Avaliação da quantitativa das populações de linfócitos T no baço de camundongos suíços não isogênicos, que apresentaram o	85

marcardor CD8⁺

Figura 16	Avaliação da frequência de células CD4 ⁺ que não expressam o marcador CD62L ^{neg} (células efectoras)	86
Figura 17	Avaliação da frequência de células CD8 ⁺ que não expressam o marcador CD62L ^{neg} (células efectoras)	88
Figura 18	Avaliação da quantitativa da população de CD11b no baço de camundongos suíços não isogênicos	89
Figura 19	Avaliação da quantitativa da população de linfócitos B que expressavam o marcardor CD220 no baço de camundongos suíços não isogênicos	90
Figura 20	Medição da espessura das patas: cepa Y suscetível	91
Figura 21	Fotomicrografia de secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados com a cepa Y e tratados com Benzonidazol no tempo de 24 horas	93
Figura 22	Fotomicrografia de secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados com a cepa Y e tratados com Benzonidazol no tempo de 48 horas	94
Figura 23	Fotomicrografia de secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados com a cepa Y e tratados com Benzonidazol no tempo de 72 horas	95
Figura 24	Medição da espessura das patas: cepa Colombiana resistente	96
Figura 25	Fotomicrografia de secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados com a cepa Colombiana e tratados com Benzonidazol no tempo de 24 horas	98
Figura 26	Fotomicrografia de secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados com a cepa Colombiana e tratados com Benzonidazol no tempo de 48 horas	99
Figura 27	Fotomicrografia de secções de patas coradas pela H & E, em camundongos controles infectados pelas cepas Y e Colombiana e tratados com Benzonidazol e injetados PBS (salina	100

tamponada).

Figura 28	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos tratados não infectados	101
Figura 29	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético em animais controles sem infecção ou tratamento intactos (CI) coradas pela H & E	102
Figura 30	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Y e tratados com Benzonidazol na fase aguda	104
Figura 31	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Y e tratados com Benzonidazol na fase crônica	106
Figura 32	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Colombiana não tratados com Benzonidazol na fase aguda	108
Figura 33	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Colombiana tratados com Benzonidazol na fase crônica.	110
Figura 34	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Colombiana tratados com Benzonidazol na fase aguda.	112
Figura 35	Fotomicrografia de secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E e Picro-Syris, em camundongos infectados pela cepa Colombiana tratados com Benzonidazol na fase crônica	114

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

APC	Célula apresentadora de antígeno
Bio ou BIO	Biotina
BSA	Albumina bovina
CD	Grupo de diferenciação
CDI	Células dendríticas intersticiais
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
CPqGM	Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz
CTLA-4	do inglês, <i>Cytotoxic T lymphocyte antigen-4</i>
CI	Controles intactos sem tratamento
COL-NT	Cepa colombiana não tratada
COL-T	Cepa colombiana tratada
DAB	Diamino benzidina
DNA	Acido desoxirribonucleico
DMSO	Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo
DTU's	Discrete typing units
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
FITC	Fluoresceína
Foxp3	do inglês, <i>Forkhead box P3</i>
HLA	Complexo Principal de Histocompatibilidade
H₂O₂	Peróxido de Hidrogênio
ICAM	Intercellular Adhesion Molecule
IFN	Interferon
Ig	Imunoglobulina
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
kDNA	DNA mitocondrial do parasita
LFA	Leukocyte Function Associated Antigen
MDSC	Célula supressora de origem mieloide
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
µm	Micra
µl	Microlitro

mg	Miligrama
ml	Mililitro
NK	Linfócito <i>Natural Killer</i>
NKT	Linfócito T <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido nítrico
PBS	Solução salina tamponada com fosfato
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia
PE	Ficoeritrina
RPM	Rotação por minutos
RPMI	Meio de Cultura de Tecido Animal Desidratado
TCR	Receptor de célula T
TGFβ	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptor do tipo Toll
TNI	Tratado não infectado
TNFα	Fator de necrose tumoral alfa
Treg	Célula T regulatória
<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
WHO	World Health Organization

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
1.1	O <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i> : ASPECTOS BIOLÓGICOS E TAXONÔMICOS	23
1.2	CEPAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	24
1.3	BIODEMAS: TIPOS BIOLÓGICOS	25
1.4	ESTRUTURA CLONAL DO <i>DAS CEPAS TRYPANOSOMA CRUZI</i> .	26
1.5	HETEROGENEIDADE, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E POSIÇÃO FILOGENÉTICA ATUAL DO <i>T. CRUZI</i>	27
1.6	RELAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO NA ESPÉCIE <i>T. CRUZI</i>	31
1.6.1	Polimorfismo das formas sangüícolas do <i>T. cruzi</i>	31
1.6.2	Curvas de parasitemia e índices de mortalidade: Caracteres intrínsecos das cepas de <i>T. cruzi</i>.	32
1.7	SUSCEPTIBILIDADE DAS CEPAS DE <i>T. CRUZI</i> AOS QUIMIOTERÁPICOS	33
1.8	QUIMIOTERAPIA NA DOENÇA DE CHAGAS E SUA AÇÃO SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO	35
1.9	ASPECTOS GERAIS À RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO <i>T. CRUZI</i>	38
1.10	A DOENÇA DE CHAGAS: O PAPEL DO <i>T. CRUZI</i> E AS FORMAS CLÍNICAS	40
1.11	ASPECTOS IMUNOPATOLÓGICOS DA FASE CRÔNICA	42
1.12	O PAPEL DAS CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO <i>T. CRUZI</i>	45
2	HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO	47
3	JUSTIFICATIVA	49
4	OBJETIVO GERAL	50
4.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
5	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	52
6	MATERIAL E MÉTODOS	52
6.1	CEPAS DE <i>TRYPANOSOMA CRUZI</i>	52
6.2	INOCULAÇÃO E CÁLCULO DO INÓCULO	53
6.3	GRUPOS EXPERIMENTAIS E ANIMAIS EXPERIMENTAIS	53
7	PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS	53

7.1	TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO	53
7.2	PARASITEMIA	54
7.3	TAXA DE MORTALIDADE	54
7.4	EUTANÁSIA	55
7.5	SACRIFÍCIOS	55
7.6	ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	55
7.7	PESO DO BAÇO	56
7.8	IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (SOROLOGIA)	57
7.9	DOSAGEM DE ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS: MÉTODO DE ELISA	58
7.10	DOSAGEM DAS CITOCINAS PELO MÉTODO DO KIT CBA	58
7.11	PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS DO BAÇO PARA COLORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO. (FACS)	60
7.12	TESTE CUTÂNEO	61
7.13	OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DO <i>T. CRUZI</i>	61
7.14	TESTE DE AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA	62
7.15	MEDIÇÃO DA ESPESSURA DA PATA	63
8	RESULTADOS	64
8.1	ANÁLISE DA PARASITEMIA (CURVAS PARASITÊMICAS):	64
8.1	NÚMEROS DE FORMAS TRIPOMASTIGOSTAS CIRCULANTES EM ANIMAIS SUÍÇOS INFECTADOS COM AS CEPA Y SUSCETÍVEL E COLOMBIANA RESISTENTE.	64
8.2	TAXA DE MORTALIDADE	65
8.3	AVALIAÇÃO SOROLÓGICA EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS NÃO ISOGÊNICOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM BENZONIDAZOL E INFECTADOS PELO <i>T. CRUZI</i>	67
8.4	DOSAGEM PLASMÁTICA DO ISOTIPO IGM	68
8.5	DOSAGEM DO ISOTIPO IGG1	70
8.6	DOSAGEM DO ISOTIPO IGG2A	71
8.7	DOSAGEM DA IMUNOGLOBULINA IGG TOTAL	72
8.8	CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-6, EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS NÃO ISOGÊNICOS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E RESISTENTE DO <i>T. CRUZI</i> , SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM	73

BENZONIDAZOL

- 8.9 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-10, EM 75
CAMUNDONGOS SUÍÇOS NÃO ISOGÊNICOS DURANTE A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E
RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM
BENZONIDAZOL
- 8.10 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MCP-1, EM 77
CAMUNDONGOS SUÍÇOS NÃO ISOGÊNICOS DURANTE A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E
RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM
BENZONIDAZOL
- 8.11 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IFN- γ , EM 78
CAMUNDONGOS SUÍÇOS NÃO ISOGÊNICOS DURANTE A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E
RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM
BENZONIDAZOL
- 8.12 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF- α , EM 80
CAMUNDONGOS SUÍÇOS NÃO ISOGÊNICOS DURANTE A
INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E
RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM
BENZONIDAZOL
- 8.13 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE (HIPERPLASIA) DO BAÇO EM 81
ANIMAIS INFECTADOS E TRATADOS COM BENZONIDAZOL,
INFECTADOS E NÃO TRATADOS E TRATADOS E NÃO
INFECTADOS
- 8.14 ANÁLISE CITOMÉTRICA 82
- 8.14.1 **Avaliação quantitativa da frequência das populações de 83**
linfócitos T que expressavam o marcador CD4⁺
- 8.14.2 **Avaliação quantitativa da frequência das populações de 84**
linfócitos T que expressavam o marcador CD8⁺
- 8.14.3 **Avaliação quantitativa das populações que co-expressavam o 86**
marcador CD4⁺ e CD62L^{neg}
- 8.14.4 **Avaliação quantitativa das populações que co-expressavam o 87**
marcador CD8⁺ e CD62L^{neg}
- 8.14.5 **Avaliação da quantitativa da frequência das populações de 88**

CD11b

8.14.6	Avaliação quantitativa das populações de linfócitos B que expressavam o marcador CD220 / (CD45R)	89
8.15	AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA	90
8.15.1	Medição da espessura da pata: cepa Y suscetível	90
8.15.2	Avaliação dos aspectos microscópicos da hipersensibilidade tardia nos animais infectados pela cepa Y e tratados com Benzonidazol	91
8.15.3	Medição da espessura das patas: cepa Colombiana resistente	95
8.15.4	Avaliação dos aspectos microscópicos da hipersensibilidade tardia nos animais infectados pela cepa Colombiana e tratados com Benzonidazol	97
8.16	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	101
8.16.1	Avaliação histológica no miocárdio e músculo esquelético em camundongos tratados com Benzonidazol e não infectados (TNI).	101
8.16.2	Avaliação histológica no miocárdio e músculo esquelético em camundongos controles	102
8.16.3	Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Y (suscetível) fase aguda	103
8.16.4	Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Y (suscetível) fase crônica.	105
8.16.5	Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana (resistente) não tratados fase aguda.	107
8.16.6	Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana (resistentes) do <i>T. cruzi</i>, não tratados com Benzonidazol na fase crônica	109
8.16.7	Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana	111

	(resistente) do <i>T. cruzi</i>, tratados com Benzonidazol na fase aguda	
8.16.8	Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana (resistentes) do <i>T. cruzi</i>, tratados com Benzonidazol na fase crônica.	113
9	DISCUSSÃO	115
10	CONCLUSÕES	132
11	REFERÊNCIAS	134
	ANEXOS	

1 INTRODUÇÃO

1.1 O *TRYPANOSOMA CRUZI*: ASPECTOS BIOLÓGICOS E TAXONÔMICOS

O *Trypanosoma cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas, é um parasito com ciclo de desenvolvimento heteroxênico complexo, que se alterna entre um hospedeiro vertebrado da classe Mamalia e um inseto vetor da Ordem Hemíptera família *Reduviidea*.

Com relação ao comportamento do parasito no inseto vetor, esse pertence à seção Stercoraria, proposta por Hoare, onde estão incluídos os tripanosomas que tem seu ciclo de desenvolvimento completado na porção retal do vetor com liberação das formas infectivas pelas fezes ou urina, pertencem a essa seção o *T. cruzi* e *T. lewisi* (WHO, 1978).

Quanto à posição sistemática, esse protozoário flagelado pertence à classe Zoomastigofora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, Gênero *Trypanosoma*, Subgênero *Schyzotripanum* (CORLISS, 1994; MYLER, 1993).

O *T. cruzi* apresenta em seu ciclo vital, as formas amastigota, epimastigota e tripomastigota. Em hospedeiros vertebrados da classe Mamalia, ocorrem as formas tripomastigotas sanguícolas e amastigotas intracelulares (forma de reprodução no vertebrado). Em hospedeiros invertebrados e em meios de cultura predominam as formas epimastigotas.

Durante seu repasto habitual, os triatomíneos se infectam ao sugarem um hospedeiro vertebrado, ingerindo formas tripomastigotas sanguícolas, iniciando-se uma nova fase de desenvolvimento intrínseco à espécie. Esse ciclo evolutivo dá-se na porção anterior do intestino médio do hemíptero, onde as formas tripomastigotas

sanguícolas transformam-se em esferomastigotas e posteriormente em epimastigotas. As formas epimastigotas, ao chegarem à porção posterior do intestino médio, encontram um ambiente bioquimicamente favorável, onde se instalam e mantêm a infecção durante toda a vida do inseto, restabelecendo a capacidade reprodutiva do parasito, através de uma multiplicação ativa por divisão binária. Essas formas ao chegarem ao intestino posterior dos triatomíneos, sofrem uma metamorfose retomando à forma tripomastigota. A transformação de epimastigotas em tripomastigotas metacíclicos (metaciclogênese), é um fenômeno intrínseco e determinante no ciclo de vida deste parasito (REY, 2002; SCHAUB, 1989).

1.2 CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Desde os estudos iniciais com Carlos Chagas (1909), até os dias atuais, os pesquisadores sempre procuram isolar as formas parasitárias em humanos, em animais naturalmente infectados e vetores. Segundo LUMSDEN (1977), cepas de *Trypanosoma cruzi* são isoladas mantidas em laboratório através de passagens sucessivas em hospedeiros vertebrados ou em culturas axênicas, insetos vetores, meios de cultura e criopreservação, possuindo um ou mais caracteres específicos.

Atualmente sabe-se que esses isolados, com relação à espécie *Trypanosoma cruzi*, são compostos de populações multiclonais com uma ampla diversidade de comportamento, susceptibilidade, tropismo celular, virulência, patogenicidade e polimorfismo (ANDRADE; 1974; TIBAYRENC *et al.*, 1986; TIBAYREC & AYALA, 1988).

1.3 BIODEMAS: TIPOS BIOLÓGICOS

ANDRADE *et al.*, (1970) caracterizaram as cepas do *T. cruzi* em três tipos de acordo com parâmetros morfológicos e histopatológicos tais como: parasitemia, morfologia no sangue periférico, tropismo tissular, virulência e patogenicidade. Posteriormente ANDRADE (1976), em amplo estudo, o qual reunia um grupo diversificado de cepas de *T. cruzi*, correlacionou estes caracteres à ocorrência de tipos biológicos característicos, ou Biodemas:

1. **Tipo I:** amostras representadas pelas cepas Y e Peruana, com predominância de formas delgadas, picos parasitêmicos altos e precoces, reticulotropismo nas fases iniciais da infecção;
2. **Tipo II:** definido por amostras do Recôncavo Baiano, 12SF, 21SF, as quais são cepas que apresentam evolução mais lenta de parasitemia, com picos irregulares entre 12^o e 20^o dias de infecção, predominância de formas largas, mas com ocorrência de formas delgadas no início da infecção, e macrofagotropismo e miotropismo predominantemente para o miocárdio.
3. **Tipo III:** as amostras apresentam baixa multiplicação parasitária, com picos altos de parasitemia entre 20^o e 30^o dias da infecção, baixas taxas de mortalidade, predomínio de formas largas durante a infecção e tropismo para músculo esquelético, existindo como protótipo a cepa Colombiana.

Essa classificação biológica foi a primeira correlação feita de uma série específica de caracteres morfológicos e comportamentais no *T. cruzi*, sendo recomendada pela WHO (1986), e utilizado até os dias atuais.

1.4 ESTRUTURA CLONAL DAS CEPAS DO *TRYPANOSOMA CRUZI*

Clones são isolados populacionais de parasitos, provenientes de uma única célula que por divisões mitóticas (fissão binária), dá origem a células filhas geneticamente idênticas entre si.

Os estudos relacionados à genética de população utilizando o *T. cruzi* têm demonstrado que as cepas desse parasito apresentam uma estrutura multiclonal, sendo compatível com a sua reprodução por divisão binária com ausência ou raras trocas gênicas (TIBAYRENC *et al.*, 1986; DA SILVEIRA *et al.*, 2000; LANA *et al.*, 2000).

Posteriormente estudos experimentais utilizando cepas e clones de *Trypanosoma cruzi*, originárias de hospedeiros diversos, demonstraram haver uma ampla variação intra-específica dentro dessa espécie. Essa variação pode ser também explicada pela ampla diversidade filogenética e comportamental desse parasito (LANA *et al.*, 2000). Essa ampla diversidade gênica tem sido demonstrada fenotipicamente através de: isoenzimas; diferenças no polimorfismo do parasito em sangue periférico, virulência; capacidade de multiplicação no hospedeiro, patogenicidade, susceptibilidade frente a agentes quimioterápicos entre outras características causando implicações importantes na imunopatologia da doença de Chagas (BRENER e CHIARI 1963; BRENER, 1969; ANDRADE, 1974; MILES *et al.*, 1980; ANDRADE *et al.*, 1985; ANDRADE *et al.*, 1991; COURA e CASTRO, 2002; DEVERA *et al.*, 2003).

Análises posteriores utilizando técnicas moleculares específicas (RFLP & RAPD), em um grande número de isolados, correspondentes a genótipos clonais,

demonstraram haver uma grande variabilidade genética entre cepas e clones, concordantes com a heterogeneidade dentro da espécie (TIBAYREC e AYALA, 1988; ANDRADE, 1990; TIBAYRENC *et al.*, 1993; MACEDO e PENA, 1998).

CAMANDAROBA *et al.* (2006), estudando o comportamento biológico e o histotropismo de clones isolados da cepa Colombiana por micromanipulação (DVORAK, 1985), no 10^o e no 30^o da infecção, observaram que essas populações clonais apresentaram tropismo preferencialmente para músculo esquelético, reproduzindo o mesmo comportamento da cepa parental. Os estudos moleculares dessa mesma cepa e de seus clones demonstraram homegeneidade genotípica através do RFLP do KDNA.

CAMPOS & ANDRADE (1996), estudando a cepa parental 21SF, seus clones e subclones, demonstraram alta similaridade genotípica e fenotípica entre a cepa e seus clones. Esses achados confirmam a hipótese da predominância de um clone principal, responsável pelas características intrínsecas às cepas de *T. cruzi* (ANDRADE, 1999).

1.5 HETEROGENEIDADE, DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA E POSIÇÃO FILOGENÉTICA ATUAL DO *T. CRUZI*

Os primeiros estudos com linhagens diferentes datam da década de 60, quando reunidas diferentes cepas de *T. cruzi*, isoladas de pacientes chagásicos residentes em diferentes áreas geográficas (Colômbia/cepa Col; São Felipe-Ba/cepa 21SF e São Paulo/cepa Y), foi demonstrado que esses isolados apresentavam caracteres biológicos (Parasitemia, Mortalidade e padrões histopatológicos) que as diferenciavam (ANDRADE, 1964/1974). Esses achados foram recentemente ratificados através de múltiplos estudos comparativos (ZINGALES *et al.*, 2009).

Os primeiros achados moleculares sobre a heterogeneidade das diferentes linhagens do gênero *T. cruzi* versam sobre os achados de MOREL *et al.* (1980), os quais, estudando cepas isoladas de pacientes chagásicos de diferentes origens, demonstraram populações heterogêneas, através da análise do kDNA MOREL *et al.* (1986).

Posteriormente, os estudos de genética de populações envolvendo as cepas de *T. cruzi* revelaram ser essa espécie composta de populações e subpopulações multiclonais (TIBAYREC e AYALA, 1988; TIBAYRENC *et al.*, 1986). Ainda na década de 80, por análise de marcadores polimórficos foi confirmada a grande diversidade gênica dentro da espécie já vista por outros métodos biopatológicos e bioquímicos já empregados (ANDRADE, 1974; ANDRADE *et al.*, 1983; ANDRADE *et al.*, 1985).

Análises realizadas a partir uma ampla diversidade de técnicas e métodos, a comunidade de pesquisadores que trabalha com a espécie *T. cruzi*, criou as expressões *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, (SATELLITE MEETING, 1999), para identificar dois grandes grupos distintos ou linhagens, já bem caracterizadas por vários pesquisadores. No centenário da doença Chagas, foi realizado um novo “*Satellite Meeting*” com objetivo correlacionar a nomenclatura do *T. cruzi* com os marcadores de caracterização das cepas, visando melhorar a comunicação dentro da comunidade científica, sendo adotada nesse novo a taxonomia das cepas do *T. cruzi*, baseadas nas DTU's (*discrete typing units*) sendo atualmente classificadas em *T. cruzi* I a VI (ZINGALES *et al.*, 2009). Inicialmente foi proposto que o Taxa *T. cruzi* I circulava principalmente em mamíferos e triatomíneos silvestres, enquanto que o *T. cruzi* II estava associada ao ciclo doméstico da doença e a infecção em humanos (FERNANDES *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1999; ZINGALES *et al.*,

1998). Porém estudos mais recentes versando sobre ecologia do *Trypanosoma cruzi* em ambientes naturais têm demonstrado a presença do *T. cruzi* II, também compondo o ciclo silvestre bem como infectando pelo menos cinco ordens de mamíferos (LISBOA *et al.*, 2008).

Associação dessas linhagens filogenéticas em diferentes hospedeiros demonstrou que os ciclos silvestre e doméstico são conectados, com polimorfismo genético intragrupo (SANTOS *et al.*, 2002). LISBOA *et al.*, (2008), estudando o papel da ordem Chiroptera (morcegos) presentes em diversos biomas tropicais brasileiro, e sua possível correlação na manutenção da infecção pelo *T. cruzi*, demonstraram a presença dos dois Taxa: *T. cruzi* I e *T. cruzi* II bem com a presença de infecção mista. A caracterização de 11 cepas isoladas de humanos, triatomíneos e marsupiais, em Santa Catarina-BR, utilizando múltiplos marcadores biológicos e moleculares demonstrou ampla heterogeneidade intragrupo, bem como, mistura de cepas em um mesmo hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 2011).

ANDRADE e MAGALHÃES (1997), em amplo estudo, tendo como alvo o comportamento biológico e bioquímico de 138 cepas de *Trypanosoma cruzi*, das várias regiões brasileiras e sulamericanas, ratificaram a correlação entre os Biodemas e Zimodemas: Tipo I e Z2b, Tipo II e Z2, Tipo III e Z1, confirmando a predominância do mesmo Biodema e do Zimodema para uma determinada área geográfica. Estudos multicêntricos envolvendo cepas e clones de *Trypanosoma cruzi* das mais diversas áreas geográficas têm revelados dados importantes sobre o comportamento biológico, bioquímico, molecular e filogenético das cepas deste parasito. A análise de 146 isolados de *T. cruzi* obtidos em países da América Latina, revelou diferenças significativas envolvendo a linhagem *T. cruzi* I e *T. cruzi*

II, tanto com relação aos aspectos clínicos da doença como a plasticidade gênica da Linhagem *T. cruzi* II e ampla distribuição da espécie (HIGO *et al.*, 2004).

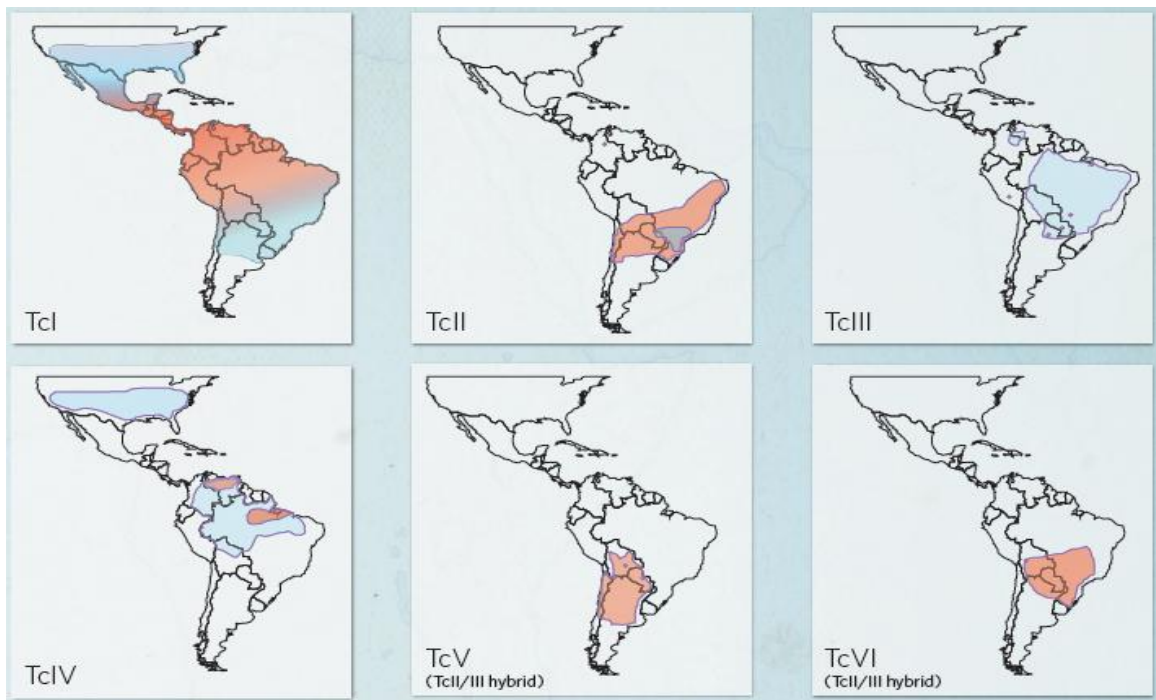


Figura 1. Mapa representativo da distribuição das linhagens de *T. cruzi* I ou VI nas Américas do Norte e do Sul segundo a classificação pelos DTUs (Discrete Typing Units). As áreas em azul predominância do ciclo de transmissão silvestre e as em vermelho do ciclo doméstico. Fonte: *Trypanosoma cruzi* Strains. PP 58-59 (2010), www.nature.com/outlooks .

Esses achados sugerem que a redução na diversidade da fauna selvagem de mamíferos, em paralelo aos fluxos migratórios e o processo de urbanização descontrolada de áreas antes desabitadas, serem os possíveis fatores da interconexão dos ciclos doméstico e selvagem na espécie *Trypanosoma cruzi*.

1.6 RELAÇÃO PARASITA – HOSPEDEIRO NA ESPÉCIE *TRYPANOSOMA CRUZI*

1.6.1 Polimorfismo das formas sangüícolas do *T. cruzi*

Análises morfológicas de tripomastigotas sangüícolas permitiram definir, claramente, a existência de heterogeneidade, detectada nas diferentes cepas

desde os primeiros trabalhos de Carlos Chagas (1909). Essas variações morfológicas, denominadas de polimorfismo, guardam relações importantes com a fisiopatologia intrínseca desse parasito.

Em análises morfológicas de isolados de *T. cruzi* em esfregaços de sangue periférico fixados e corados, são identificados dois padrões morfológicamente bem delineados: formas delgadas e largas. O aparecimento das formas delgadas decorre da multiplicação parasitária intensa, enquanto que as formas largas prevalecem em cepas pouco virulentas no decurso da evolução da infecção (BRENER e CHIARI, 1963; ANDRADE, 1970; ANDRADE, 1974).

As formas delgadas seriam mais infectantes para células e camundongos, desenvolvendo nesses, parasitemias mais precoces, porém mais sensíveis à ação de anticorpos circulantes. Já as formas largas são menos infectantes, apresentando parasitemias mais tardias em animais experimentais e mais resistentes a anticorpos circulantes, permanecendo assim mais tempo na corrente circulatória (BRENER, 1969).

Com relação ao parasitismo e ao histotropismo, as formas delgadas têm preferência pelo sistema mononuclear fagocitário do baço e do fígado, sendo denominados de macrofagotrópicas. As cepas com predominância de formas largas possuem um tropismo tissular para as células musculares cardíacas, esqueléticas e da musculatura lisa, sendo denominadas de miotrópicas (ANDRADE *et al.*, 1985; ANDRADE, 1990).

1.6.2 Curvas de parasitemia e índices de mortalidade: Caracteres intrínsecos das cepas de *T. cruzi*.

As curvas de parasitemia representam a multiplicação parasitária durante o curso da infecção podendo ser utilizadas para análise das variações intra-específicas na caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi*.

Segundo ANDRADE, *et al.* (1970), cepas que apresentam predomínio de formas largas desde a fase inicial da infecção geralmente têm um padrão de curva parasitêmica com ascensão lenta, picos máximos entre 20 e 30 dias, seguidos de diminuição lenta do número de parasitos e uma mortalidade variável, sendo a multiplicação do parasito um caráter próprio das cepas (ANDRADE, 1976).

Essa multiplicação parasitária encontra-se associada a características intrínsecas das cepas, mas também depende de fatores extrínsecos do parasito, tais como, o estado imunológico e nutricional do hospedeiro, a idade do animal infectado e a dose do inóculo (ANDRADE, 1979).

A taxa de mortalidade também é um outro critério biológico importante para caracterização das cepas de *T. cruzi*, permitindo correlações relevantes entre essa característica e outras, tais como: virulência e patogenicidade (ANDRADE, 1974).

1.7 SUSCEPTIBILIDADE DAS CEPAS DE *T. CRUZI* AOS QUIMIOTERÁPICOS

Dados da literatura chamam a atenção para os diferentes índices de susceptibilidade das cepas de *T. cruzi*, aos quimioterápicos. Os estudos sobre a quimioterapia da doença de Chagas têm demonstrado nítidas diferenças de suscetibilidade aos quimioterápicos Benzonidazol e Nifurtimox, em diferentes cepas do *T. cruzi* (ANDRADE e FIGUEIRA, 1977; FILARDI e BRENER, 1982; CANÇADO, 2002; NOGUEIRA *et al.*, 2007; VIOTTI *et al.*, 2011). O tratamento em pacientes residentes em áreas endêmicas em diferentes países ainda demonstram

resultados contraditórios (CAMPOS *et al.*, 2005; CANÇADO *et al.*, 1975; PINTO *et al.*, 2009).

As variações quanto ao grau de resistência e susceptibilidade foram relacionadas com os diferentes biodemas (ANDRADE e FIGUEIRA, 1977; ANDRADE *et al.*, 1977; ANDRADE *et al.*, 1985a). Estes estudos caracterizaram as cepas de Tipo I (Y e Peruana) como de alta suscetibilidade, as de Tipo II (cepas de São Felipe e Mambáí) como de média suscetibilidade e as de Tipo III (Colombiana e Montalvânia) como de alta resistência. Enquanto as cepas de Tipo I e III apresentam respectivamente, índices de cura uniformes, as cepas de Tipo II apresentam uma alta variabilidade na resposta aos dois quimioterápicos (ANDRADE *et al.*, 1985; CAMPOS *et al.*, 2005).

A resposta da cepa 21SF, Biodema Tipo II, Zimodema 2, *T. cruzi* II, e dos seus referidos ao tratamento quimioterápico com Benzonidazol por longo período, demonstrou um índice de susceptibilidade desses clones e da cepa ao quimioterápico entre 25 a 100% (CAMPOS *et al.*, 2005). CAMANDAROBA, (1999), estudando o comportamento biológico e a resposta dos clones da cepa Colombiana (Biodema Tipo III, Zimodema I, incluída no Taxa *T. cruzi* I), demonstrou elevada resistência desses clones ao Benzonidazol, semelhante à cepa parental, indicando uma maior identidade entre os mesmos em relação à resposta ao quimioterápico.

ANDRADE *et al.* (1992), em estudo experimental de onze cepas de *T. cruzi*, isoladas por xenodiagnóstico e por subinoculação a partir de pacientes da região central do Brasil, os quais foram submetidos à quimioterapia, revelou uma taxa de cura entre 66 e 100%, em camundongos infectados com cepas do Tipo II e de 0-

9% nos animais infectados com cepas do Tipo III, a correlação entre os resultados do tratamento em pacientes e em camundongos foi de 81,8% (9 de 11 casos), envolvendo as cepas do Biodema Tipo II / *T. cruzi* II, os quais diferem quanto à susceptibilidade aos quimioterápicos, esses achados atualmente podem ser explicados pela composição multiclonal das cepas de *T. cruzi* (CAMPOS et al., 2005).

DE CASTRO *et al.* (2006), estudando a ação do tratamento com Benzonidazol em 27 pacientes na fase crônica da doença de Chagas tratados e não tratados, observaram mudança no perfil da parasitemia via hemocultura, revelando um sucesso de 88,8% contra 11,2% de insucesso na reversão dessas parasitemias, onde concluíram ser o Benzonidazol, uma forte droga de efeito tripanocida. VIOTTI *et al.* (2011), avaliando a ação do tratamento com Benzonidazol em pacientes na fase crônica, revelaram ser o tratamento um fator de impacto sobre a sorologia específica, levando a uma sorologia negativa completa ou parcial nos níveis de anticorpos anti *T. cruzi*, que consistiu em uma possível eliminação ou redução da carga parasitária.

DOS SANTOS *et al.* (2008) estudando a resistência de populações de *T. cruzi* ao benzonidazol, demonstraram que essas populações quando mantidas permanentemente através de passagens sucessivas *in vivo* ou *in vitro*, podem desencadear mecanismos de estabilidade/instabilidade fenotípicas tais como resistência a droga, bem como, aumento e diminuição da virulência.

1.8 QUIMIOTERAPIA NA DOENÇA DE CHAGAS E SUA AÇÃO SOBRE O SISTEMA IMUNOLÓGICO

Diversos estudos clínicos e experimentais chamam a atenção para o papel sinérgico entre o tratamento com benzonidazol (*N*-benzyl-2-nitroimidazole acetamida) e o sistema imunológico (MURTA *et al.*, 1999; OLIVEIRA-BAHIA *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 2002; VIOTTI *et al.*, 2011). Entre os fatores que podem estar envolvidos no maior ou menor grau de resistência ao tratamento, está a resposta imunológica determinada no animal experimental por diferentes cepas, tendo sido evidenciado uma menor capacidade de indução da citocina IL12 pelas cepas mais resistentes (MICHAILOWSKY *et al.*, 2001). ROMANHA *et al.* (2002), investigando a resposta quimioterápica em camundongos infectados com a cepa Y (suscetível ao Benzonidazol) em camundongos não geneticamente modificados (selvagens) e em camundongos knockout (KO) para o IFN- α e, o papel deste durante a infecção demonstraram correlações importante entre os níveis INF- α durante o tratamento com benzonidazol refletido nos índices de cura entre os animais selvagens.

OLIVIERI *et al.* (2005), estudando o papel do tratamento com o benzonidazol sobre a resposta imune de camundongos infectados com uma cepa susceptível e, a diminuição nas taxas de apoptose em linfócitos duplo positivo CD4⁺/CD8⁺ no timo, verificaram menores índices de apoptose dessas células, nos camundongos infectados e tratados em relação aos camundongos infectados não tratados, correlacionando embora que parcialmente, a preservação da homeostasia do timo ao tratamento com benzonidazol.

Estes estudos sugerem um importante papel da resposta imunológica em relação à suscetibilidade ou resistência dos hospedeiros frente aos quimioterápicos. Deste modo é importante se investigar se a resistência/susceptibilidade das cepas de *T. cruzi* estaria relacionada com a resposta imunológica desenvolvida pelo camundongo à infecção e, a ação do Benzonidazol sobre a resposta imune de camundongos infectados com cepas de *Trypanosoma cruzi* de diferentes susceptibilidades.

Experimentalmente a infecção pelo *T. cruzi* determina uma resposta celular do baço e nos linfonodos, órgãos linfóides, que apresentam na fase aguda da infecção uma ativação policlonal de linfócitos CD4+, CD8+ e B (D'IMPERIO *et al.*, 1985; OLIVIERI *et al.*, 2006), traduzida morfológicamente por uma evidente esplenomegalia, linfadenomegalia e alterações da sua estrutura e celularidade. A reação celular do baço na infecção pelo *T. cruzi*, é evidente, com proliferação de linfócitos e presença de células blásticas nas polpas branca e vermelha, hiperplasia dos centros germinais dos folículos linfóides (ANDRADE *et al.*, 1985b). Esta reação difere cineticamente, conforme o tipo de cepa do parasito em relação à intensidade da proliferação celular no baço, bem como, dos níveis de imunoglobulinas no soro e na evolução da parasitemia nos camundongos infectados pelas diferentes de cepas (ANDRADE *et al.*, 1985).

A ativação policlonal na infecção pelo *T. cruzi*, corresponde a uma imunossupressão que se traduz pela baixa resposta de anticorpos específicos na fase aguda e elevação das imunoglobulinas inespecíficas: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM (ANDRADE *et al.*, 1985b). O estudo da resposta imunológica em seis diferentes linhagens isogênicas de camundongos e a avaliação quanto à variação dos níveis

de IgG durante o curso da infecção, revelaram que a infecção por cepas de *T. cruzi* de diferentes Biodemas, leva a variações nos níveis de IgG circulantes (ANDRADE *et al.*, 1985a).

DOS SANTOS *et al.* (2009), em estudo experimental utilizando os diferentes Taxa (*T. cruzi* I e *T. cruzi* II) demonstraram que os diferentes genótipos clonais do *T. cruzi* são capazes de influenciar na expressão de diferentes classes de imunoglobulinas. Em relação à resposta dos órgãos linfóides em camundongos infectados e tratados com o Benzonidazol, observou-se no tratamento da infecção aguda com cepa Y, reversão total do aumento da massa absoluta do baço no 9^o dia pós-tratamento e a expansão das células T foi revertida no 14^o dia pós tratamento (OLIVIERI *et al.*, 2006). LIMA *et al.* (2001), verificaram que o tratamento com o Benzonidazol na fase aguda da infecção, inibe a produção de TNF- α pelos macrófagos do baço, diminuindo a necrose tissular e elevando os índices sobrevivência dos camundongos.

1.9 ASPECTOS GERAIS À RESPOSTA IMUNE NA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI*

A infecção pelo *T. cruzi* em hospedeiros vertebrados promove a ativação e o desenvolvimento de reações imunopatológicas cruciais, ativando e recrutando uma diversidade de subpopulações do sistema imune incluídos macrófagos, linfócitos B, linfócitos T CD4+, CD8+, células NK, moléculas protéicas e enzimáticas, como a via alternativa do complemento (C') e a secreção hepática de da proteína C reativa de fase aguda (BRENER e GAZZINELLI, 1997; CARDILLO *et al.*, 1996; MEDRANO–MERCADO *et al.*, 1996).

Após a infecção, células do sistema mononuclear fagocitário (macrófagos) quando infectados passam à secretar citocinas e quimiocinas responsáveis pelo desenvolvimento, ativação e recrutamento de várias populações celulares envolvidas na regulação da resposta imune (LAUCELLA *et al.*, 1996). Estudos mostram que os macrófagos e cardiomiócitos quando infectados podem produzir e responder a quimiocinas após a infecção com o *T. cruzi*. Essas quimiocinas facilitam a produção de TNF- α pelos macrófagos infectados atuando em sinergia com IFN- γ para mediar a morte do parasito (ALIBERTI *et al.*, 1999).

Inicialmente a resposta humoral inata realizada por anticorpos, em associação com as células fagocíticas, corroboram com o sistema imune inato, opsonizando as formas circulantes e ou eliminando-as através da amplificação da fagocitose e da ativação do sistema complemento. Múltiplos estudos chamam a atenção sobre a importância das duas populações celulares centrais TCD4 e TCD8 na imunidade celular durante a infecção pelo *T. cruzi*. A reação celular do baço na infecção pelo *T. cruzi*, é evidente, com proliferação de linfócitos e presença de células blásticas nas polpas branca e vermelha, hiperplasia dos centros germinais e dos folículos linfóides (ANDRADE *et al.*, 1985b).

Em modelos experimentais TARLETON *et al.* (1992) foi evidenciado que a deleção de células TC8⁺ em camundongos C57BL/6 (resistentes) e C3H (susceptíveis), bem como, animais duplamente deficientes em células T CD4 e T CD8, e posteriormente infectados pelo *T. cruzi*, passavam a desenvolver altos índices de parasitemia e mortalidade já nas fases iniciais da infecção, quando comparados com animais normais que controlavam a parasitemia frente a inóculos similares (ROTTENBERG *et al.*, 1993; TARLETON *et al.*, 1992). Foi posteriormente

demonstrado no tocante à imunidade celular que a depleção de células T CD8+, durante infecção pelo *T. cruzi* resultou no aumento da resposta inflamatória e no crescimento do parasitismo tissular do miocárdio, sugerindo o papel crucial dessas populações no controle do parasitismo tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção em humanos e animais (MARTIN e TARLETON, 2005).

Em paralelo, a resposta humoral dá-se pela ativação policlonal de linfócitos B nos centros germinais no baço e linfonodos, sendo essa ativação regulada através das células T CD4+ e pela secreção de suas citocinas que induzem essas células a se diferenciarem em plasmócitos e a concomitante secreção de imunoglobulinas protetoras, tendo o Isotipo IgG papel crucial na imunoproteção (ANDRADE, 2000; ANDRADE *et al.*, 1983/1985; TAKEARA *et al.*, 1981 OCHSENBIEN e ZINKERNAGEL, 2000;). ANDRADE , *et al.* (1985) analisando a resposta imunológica em camundongos infectados com diferentes cepas de *T. cruzi*, observaram altos níveis de imunoglobulinas coincidentes com os altos níveis de parasitemia e mortalidade. ANDRADE *et al.* (1985b), analisando aspectos imunológicos em seis diferentes linhagens de camundongos detectaram níveis mais elevados de IgG2a e IgG2b nos animais infectados com a cepa Colombiana com relação às cepas Peruana e 21SF, tendo essas imunoglobulina papeis cruciais para o controle e resistência, desses animais à infecção. POSTOL *et al.* (2001), avaliando a resposta humoral em camundongos C57Bl/6 knockout para células B e animais normais, infectados por uma cepa do Taxa *T. cruzi* II biodema Tipo II, demonstraram que animais deficientes de células B apresentaram altos níveis de parasitemia em comparação com os normais, sugerindo uma relativa importância das células B na resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

1. 10 A DOENÇA DE CHAGAS: O PAPEL DO *T. CRUZI* E AS FORMAS CLÍNICAS

A doença de Chagas apresenta-se com uma doença polimórfica complexa e multifatorial. Muitos aspectos associados à patogenia da doença estão associados a mecanismos imunoregulatórios com uma participação especial de células dendríticas, linfócitos CD4+ e CD8+ (ANDRADE et al., 2000; PORTELLA e ANDRADE, 2009; MARTIN e TARLETON, 2004). A infecção do hospedeiro vertebrado ocorre quando esse entra em contato com as dejeções intestinais do inseto vetor (triatomíneo), contaminadas com as formas tripomastigotas metacíclicas, através das mucosas ou alternativamente por outros mecanismos não vetoriais (LARANJA, 1953). Quanto aos aspectos sintomatológicos (fases aguda e crônica) e clínicos da doença, bem como, suas manifestações desenvolvidas, podemos classificar as diferentes formas clínicas: cardíaca (CARD), digestiva (DIG) ou cardiodigestiva (CDG) e indeterminada (IND).

A fase aguda caracteriza-se pelas primeiras manifestações clínico-imunológicas, em resposta à interação parasito-hospedeiro, desencadeada pela penetração do parasito nas células alvo. Nos humanos e no animal experimental, essa fase inicial da infecção, dá-se pela intensa multiplicação do parasito, tendo como consequência o surgimento dos primeiros focos inflamatórios (ANDRADE, 1979). Com relação ao quadro clínico da doença na fase aguda, o indivíduo pode manifestar sinais característicos variáveis como o sinal de Romana, que é caracterizado pelo desenvolvimento de edema bipalpebral, unilateral, elástico, indolor e de coloração róseo-violácea, acometendo na grande maioria das vezes apenas um dos lados da face. (ROMAÑA, 1935).

Outra característica marcante da fase aguda é a parasitemia. Esta é bem evidente, tornando fácil a visualização do parasito em amostras de sangue periférico coletadas do indivíduo, ficando na dependência da quantidade de parasitos que consegue infectar o indivíduo, conforme discutido por ROMANHA e TERRACINI (1945).

Na infecção em humanos alguns indivíduos apresentam um quadro de alterações sistêmicas, como o edema subcutâneo, aumento de volume dos linfonodos, hepatoesplenomegalia, complicações cardíacas e meningoencefálicas, podendo haver uma mortalidade nessa fase variando entre 6% a 10% dos indivíduos infectados. Na infecção experimental é evidenciado parasitismo tissular dependente da cepa, ocasionando lesões em diferentes órgãos, com parasitemias de curso mais precoce (cepa Y), de curso mais lento (cepa 21SF) e mais tardio (cepa Colombina), com conseqüente destruição de miócitos e cardiomiócitos, gerando intensa miosite, miocardite e lesões de arterite e periarterite (ANDRADE e FREITAS, 1987; ANDRADE *et al.*, 1985; SILVA *et al.*, 1985).

No coração a inflamação assume um padrão difuso, com presença de células inflamatórias mononucleares e edema de miocárdio, que se estende ao sistema de condução, nervos e gânglios nervosos autônomos, estando inflamação geralmente acompanhada por necrose de células parasitadas ou não, além de alterações eletrocardiográficas, arritmias, falha e colapso cardíaco (ANDRADE, 1990; ANDRADE, 1984; ANDRADE e ANDRADE, 1968).

1.11 ASPECTOS IMUNOPATÓLOGICOS DA FASE CRÔNICA

Os pacientes que sobrevivem à fase aguda passam a uma fase crônica, em que a maior parte dos pacientes apresenta-se na forma indeterminada da doença, sendo

esta caracterizada pela ausência de manifestações clínicas, eletrocardiográficas e radiológicas em pacientes sorologicamente positivos e com xenodiagnóstico também positivo.

Achados epidemiológicos apontam que cerca de 30% dos indivíduos infectados evoluem para uma fase crônica cardíaca. Essa transição ocorre provavelmente devido a uma imunomodulação existente entre o hospedeiro e o parasita, aliado a um complexo multifatorial envolvendo o tamanho do inóculo, tipo de cepa e o grau de resistência e susceptibilidade do indivíduo (ANDRADE, 1999).

A forma crônica cardíaca da doença de Chagas se caracteriza por uma miocardite progressiva associada ao recrutamento e a presença de células inflamatórias mononucleares, áreas de necrose de fibras cardíacas e musculares, formação de trombos, envolvimento do sistema nervoso autônomo e do sistema excito-condutor do coração, dilatação de câmaras cardíacas e fibrose cicatricial, associada a um considerável infiltrado inflamatório difuso, composto por linfócitos T e macrófagos, num processo característico da reação de hipersensibilidade tardia (ANDRADE, 1979; ANDRADE, 2000; ANDRADE, 1999).

Estudos clínicos e experimentais avaliando o perfil das lesões inflamatórias e das populações celulares na fase crônica, através da imunohistoquímica evidenciaram ampla destruição de fibras cardíacas com presença ou ausência de parasitismo, áreas necrótico-fibrosas, apoptose de miocélulas em associação com a presença de linfócitos T CD4+ e T CD8+, sendo essas células essenciais na imunoproteção e também na geração das lesões (ALVAREZ *et al.*, 2008; ANDRADE, 2000; GRIMAUD e ANDRADE, 1984; REIS *et al.*, 1994).

A miocardite crônica chagásica fibrosante observada na infecção pelo *T. cruzi*, e as lesões de necrose arteriolar e de destruição focal de células cardíacas não-parasitadas, sugere a participação de mecanismos imunológicos geradores da hipersensibilidade tardia na imunopatogenia dessas lesões. A hipersensibilidade tardia pode ser explicada através das células especializadas na apresentação de antígenos (dendríticas), que ao reconhecerem os antígenos do *T. cruzi* mantêm a estimulação da resposta celular em camundongos cronicamente infectados. PORTELLA e ANDRADE (2009), estudando aspectos imunopatológicos na fase crônica da infecção em cepas suscetíveis e resistentes, demonstraram um papel importantes das células dendríticas intersticiais do miocárdio na apresentação de antígenos parasitários às células T CD4 no baço, e concomitante ativação e recrutamento de linfócitos TCD8, bem como, manutenção de focos inflamatórios difusos e focais no miocárdio e persistência dos títulos sorológicos em animais tratados e curados.

A avaliação da participação das células dendríticas intersticiais sobre os mecanismos de hipersensibilidade tardia e, sua co-relação na ativação dos mecanismos regulatórios em animais infectados com a cepa Colombiana, foi evidenciada predominância quantitativa de células T CD8+ através de anticorpos monoclonais, nas lesões necrótico-inflamatórias do baço, músculo esquelético e miocárdio, demonstrando a participação efetora dessas células (THÉ *et al.*, 2013) Nesse mesmo estudo, animais infectados e tratados com ciclofosfamida, droga capaz de promover a desregulação dos mecanismos imunoregulatórios, apresentaram lesões necrótico-inflamatórias mais intensas quando comparado com animais não tratados.

1.12 O PAPEL DAS CITOCINAS NA INFECÇÃO PELO *T. CRUZI*

Outro componente importante do processo imunopatológico envolvido nessas lesões, são as citocinas pró-inflamatórias do tipo Th1 (TNF- α , IFN- γ , IL2, IL12). A resistência à infecção pelo *T. cruzi*, caracteriza-se por uma resposta Th1 precoce de ampla ação, quando comparada com animais suscetíveis (ZHANG e TARLETON 1996). Estudos clínicos e experimentais têm demonstrado a influência das citocinas IL-2, IL-12, TNF- α , e IFN- γ , sobre a evolução das lesões inflamatórias em múltiplos órgãos (ANDRADE *et al.*, 2006; MARIANO *et al.*, 2008; VILLANI *et al.*, 2010). CUTRULLIS *et al.* (2011), estudando o papel das citocinas na infecção experimental demonstraram a influência do IFN- γ sobre as lesões e a modulação da expressão gênica do cardiomiócito levando a conseqüências no sistema de condução muscular e no ritmo cardíaco.

SANOJA *et al.* (2013), estudando a participação de linfócitos TCD4+, e seu papel nos infiltrados inflamatórios no coração de camundongos de duas linhagens diferentes, demonstraram uma correlação entre aumento de TNF- α no soro e o aumento dos infiltrados inflamatórios nesses camundongos infectados em relação aos não infectados. Esses estudos demonstram serem essas citocinas (IFN- γ e TNF- α) importantes no recrutamento de populações inflamatórias e na geração de lesões.

GUEDES *et al.* (2009), estudando a evolução da cardiopatia crônica no modelo canino e a influência das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, demonstraram *in vitro* e *in vivo* que os animais com alta produção de IFN- γ , TNF- α apresentavam maiores índices de miocardite, cardiomegalia e fibroses, tanto na fase aguda como na fase crônica, e baixos níveis de IL-10. Outras investigações, no entanto, chamam a

atenção do papel protetor dessas citocinas pró-inflamatórias na defesa do hospedeiro e na imunidade contra ao *T. cruzi* (BERMEJO *et al.*, 2013; GUTIERREZ *et al.*, 2009; SILVA *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 1992). Outras citocinas tais como TGF β , IL-11 e IL-6, estão relacionadas com o aumento da expressão de moléculas de adesão tais como: CAM, LFA, VLA-4 e VCAM; dados da literatura sugerem que tanto as citocinas inflamatórias como as antiinflamatórias determinam um padrão de resposta celular e conseqüentemente gravidade das lesões.

Desta forma, os estudos imunopatológicos da cardiopatia crônica nos diversos modelos revelam que os fenômenos descritos acima, estão associados a infiltrados inflamatórios difusos e focais, compostos de subpopulações de macrófagos, linfócitos e plasmócitos, sendo a intensidade das lesões variáveis de acordo com a cepa, tamanho do inóculo e com a susceptibilidade do hospedeiro.

2 HIPÓTESE DE INVESTIGAÇÃO

Dados da literatura chamam a atenção para os diferentes índices de susceptibilidade das cepas de *T. cruzi*, aos quimioterápicos. CAMPOS *et al.* (2005) estudando a susceptibilidade/resistência da cepa 21 SF (São - Felipe/Ba) e de seus clones em relação à cepa parental, frente à quimioterapia com Benzonidazol, detectaram variabilidade nos índices de cura que variaram de 25 % a 100%, demonstrando que essas populações diferem quanto ao grau de resistência ao quimioterápico. A ação conjunta do tratamento com recombinante de IL-12 na indução de IFN- α associado ao tratamento com Benzonidazol, elevou os índices de eficácia do quimioterápico em camundongos infectados e tratados MICHAILOWSKY *et al.* (1998). A investigação do efeito do tratamento com Benzonidazol sobre a resposta imune em camundongos infectados com cepa Y do *T. cruzi* (susceptível) demonstrou alta diminuição da carga parasitária, redução da massa absoluta do baço e dos linfonodos, menores índices de apoptose de Linfócitos CD4+/CD8+ duplo positivos, bem como impediu o esgotamento clonal dessas células mantendo parcialmente a homeostasia do timo (OLIVIERI *et al.*, 2005; OLIVIERI *et al.*, 2006). Estes resultados permitem sugerir que o Benzonidazol interfere na resposta imunológica em camundongos infectados pelo *T. cruzi*, o que concorreria para aumentar a ação anti-parasitária do quimioterápico.

Baseados nestas investigações elaboramos a seguinte hipótese:

Sendo o Benzonidazol um quimioterápico largamente utilizado no tratamento da doença de Chagas, a ação desta droga, potencializaria mecanismos imunoregulatórios em camundongos infectados com cepas de *T. cruzi* de diferentes Biodemas, as quais diferem nos índices de susceptibilidade ao quimioterápico, com

a possível influência desta resposta nos mecanismos imunoregulatórios e na resposta ao tratamento.

3 JUSTIFICATIVA

Investigações experimentais já demonstraram que a variabilidade no que tange a susceptibilidade à infecção pode ser influenciada por fatores diversos dentre eles, a resposta imune do hospedeiro e o tipo de cepa do parasito (ANDRADE, 1979; ANDRADE, V. *et al*, 1985a; MAGALHÃES e ANDRADE, 1991).

Os achados da presente investigação poderão contribuir para uma melhor interpretação dos estudos experimentais que versam sobre o tema, assim como, dos casos clínicos observados em pacientes infectados por cepas de *T. cruzi* de diferentes Biodemas, presentes nas diversas áreas endêmicas do continente americano, as quais diferem quanto ao nível de susceptibilidade aos quimioterápicos. Vale ressaltar também, que o presente estudo investigará de forma conjunta o papel do quimioterápico (Benzonidazol) sobre a resposta imune com cepas de diferentes susceptibilidade na fase aguda e crônica da infecção.

Assim os resultados encontrados na presente investigação poderão contribuir de forma somatória para uma melhor compreensão dos mecanismos imunoregulatórios, envolvidos na susceptibilidade/resistência das diferentes cepas de *T. cruzi*.

4 OBJETIVO GERAL

Investigar a resposta imunológica em camundongos infectados com cepas do *T. cruzi* de diferentes Biodemas (atualmente incluídas em diferentes Taxa *T. cruzi* I e *T. cruzi* II) suscetíveis (cepa Y) e (Colombiana) resistentes ao quimioterápico, procurando verificar a influência do tratamento com Benzonidazol sobre os mecanismos imunoregulatorios envolvidos na infecção pelo *T. cruzi*.

4.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1 - Estudar o efeito do benzonidazol sob a resposta imunológica em camundongos Suíços nas fases aguda e crônica da infecção, infectados com as cepas Y e Colombiana
- 2 - Avaliar os componentes celulares do processo inflamatório no coração e músculo esquelético, em animais infectados tratados e não tratados nas fases aguda e crônica da infecção pelas cepas Y e Colombiana, animais tratados não infectados (TNI) e controle;
- 3 - Investigar as alterações na resposta humoral pela dosagem total de imunoglobulinas e, sorológica pelos níveis de anticorpos específicos através da imunofluorescência indireta (sorologia);
- 4 - Quantificar as populações celulares (linfócitos B, CD4⁺, CD8⁺, células de memória, macrófagos) no baço em animais infectados não tratados, infectados e tratados e nos tratados e não infectados, na fase aguda e crônica da infecção através da citometria de fluxo;

5 – Investigar os níveis e circulantes de citocinas durante o tratamento na fase aguda e na fase crônica da infecção, em todos os grupos experimentais.

5 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Para a realização do presente estudo, o projeto foi submetido à avaliação pelo Comitê de Ética e pesquisa no uso de animais de Laboratório (CEUA), do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz / Fiocruz - Unidade Bahia, sendo seu número de aprovação (013/09). Todas as atividades relacionadas ao uso e manipulação desses animais estão de acordo com as normas éticas exigidas pelo referido comitê.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 CEPAS DE *TRYPANOSOMA CRUZI*

Foram utilizadas as cepas Y (suscetível) e Colombiana (resistente) com diferentes índices de susceptibilidade ao Benzonidazol. Essas cepas vêm sendo mantidas através de passagens sucessivas em camundongos, em meio de cultura acelular e criopreservação no Laboratório de Chagas Experimental Autoimunidade e Imunologia Celular - LACEI. Essas foram classificadas de acordo com seu comportamento biológico (parasitemia, morfologia do parasito em sangue periférico, virulência, patogenicidade, tropismo tissular), como Biodemas Tipo I e III e zimodemas Z1 e Z3, sendo incluídas no Taxa *T. cruzi* I e *T. cruzi* II.

6.2 INOCULAÇÃO E CÁLCULO DO INÓCULO

Os animais em todos os grupos experimentais foram inoculados por via intraperitoneal, com 1×10^4 formas tripomastigotas sanguícolas de sangue citratado provenientes dos animais infectados com as referidas cepas.

6.3 GRUPOS EXPERIMENTAIS E ANIMAIS EXPERIMENTAIS

Para o estudo da resposta imunológica ao tratamento foram utilizados 140 camundongos Suíços albinos, não isogênicos, de ambos os sexos, com 18 a 25 gramas de peso corporal, mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-FIOCRUZ. Os camundongos foram divididos em grupos de animais os quais compuseram os diferentes grupos experimentais: infectados e tratados (**YT – COL-T**), infectados e não tratados (**COL-NT**), Tratados não infectados (**TNI**) e controles com gavados com PBS (**Controles**).

7 PROCEDIMENTOS EXPERIMENTAIS

Os camundongos de todos os grupos experimentais foram avaliados quanto ao comportamento biológico (parasitemia, mortalidade, estudo histopatológico), bem como, a resposta humoral e celular. Para a realização dos procedimentos experimentais, todos os camundongos foram eutanasiados seguindo os protocolos do comitê de ética e experimentação animal (CEUA).

7.1 TRATAMENTO QUIMIOTERÁPICO

O benzonidazol foi administrado na dose de 100mg/kg/dia por entubação esofágica nos grupos experimentais **YT, COL-T, TNI**.

O tratamento foi realizado em 60 doses sendo iniciado no sétimo dia de infecção para cepa Y e no 18^o para a cepa Colombiana, correspondendo à evolução da parasitemia nos respectivos grupos experimentais. No grupo tratado e não infectado (TNI) seguiu-se o mesmo esquema quimioterápico.

7.2 PARASITEMIA

A parasitemia referente a todos os grupos experimentais (Infectados e tratados e Infectados e não tratados, cepas Y e Colombiana), foi avaliada em dias alternados a partir do 7^o dia de infecção até sua negativação. A avaliação foi feita pela contagem do número de formas tripomastigotas sanguíneas circulantes, obtidas pela secção da cauda de cada animal infectado, e examinado entre lâmina lamínula 22 x 22 mm, em 50 campos microscópicos (40 x 10). O acompanhamento da parasitemia de cada grupo, foi realizada com uma amostra de cinco animais sendo os resultados representados pela média aritmética das contagens obtidas nos cinco animais (ANDRADE, 1974). Para a geração das curvas parasitêmicas, foi utilizado o graphPad Prism 5.0.

7.3 TAXA DE MORTALIDADE

A taxa de mortalidade foi avaliada durante todo o estudo sendo determinada pela porcentagem em relação ao número de animais sobreviventes, excluído-se os animais sacrificados para o estudo histopatológico.

7.4 EUTANÁSIA

Todos os animais pertencentes aos vários grupos foram submetidos à eutanásia por exsanguinação após serem anestesiados com Ketamina/Xilaxina diluídas em PBS, na proporção volumétrica de 1/1.

7.5 EUTANÁSIA E SACRIFÍCIOS

O período de sacrifício em todos os grupos experimentais teve início como base os grupos infectados e tratados. Os sacrifícios foram iniciados 48 horas após o início do tratamento e, seguiram posteriormente de forma seqüenciada até após 60^o dose do quimioterápico. A seqüência sistemática dos intervalos deu-se em: 48 horas após início do tratamento; cinco dias; dez dias; 15 dias; 20 dias; 25 dias correspondendo a fase aguda e opôs a 30^o e 60 doses fase crônica. A avaliação da fase crônica deu-se, em todos os grupos tratados e não tratados, exceto na cepa Y não tratada devido a mortalidade total no 12 dia pós infecção.

7.6 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Para a obtenção das secções histopatológicas a serem estudadas, os fragmentos de músculo esquelético, coração, baço e fígado, foram coletados (após serem submetidos à perfusão pela injeção no ventrículo esquerdo de PBS 1x pH 7.4, gelado após a secção da veia porta), e fixados em formol Milloning, encaminhados ao laboratório de Histotecnologia Fiocruz / Unidade Bahia, para serem incluídos em parafina e posteriormente obtidas secções de 5µm, corados em Hematoxilina e Eosina ou pelo método do Picro-sirius para identificação de fibrose do miocárdio e de músculo esquelético (H&E) para o referido estudo.

O estudo histopatológico foi realizado em todos os grupos experimentais (cepa Y animais tratados, cepa Colombiana animais tratados e não tratados, animais

tratado não infectados e controles sem tratamento). Os animais foram sacrificados de acordo com o esquema do tratamento quimioterápico, comparando-se a intensidade das lesões fibrótico-inflamatórias do miocárdio, músculo esquelético, baço e fígado entre os grupos infectados e tratados (YT, COL-T), infectados não tratados (COL-NT) e tratados não infectados (TNI). Os animais controles serviram de parâmetro para as respectivas análises.

A análise realizada foi semi-quantitativa, sendo a intensidade das lesões inflamatórias expressas em +, ++ e +++ com a seguinte correspondência: (+) lesão discreta, correspondendo ao escasso (difuso e focal) infiltrado mononuclear e/ou pequenos focos de inflamação monuclear; (++) lesão moderada, representada por difuso infiltrado mononuclear mais acentuado com focos inflamatórios localizados e lesão de miócitos; (+++) lesão intensa que corresponde a denso infiltrado difuso e/ou infiltrados focais extensos e confluentes, correspondendo à necrose de miócitos. Os casos representativos de fibrose, nos vários grupos, foram selecionados para a obtenção de secções coradas com Picro-sírius red.

7.7 PESO DO BAÇO

Para avaliar o peso do baço, os animais de todos os grupos experimentais, após serem eutanasiados e perfundidos, tinham o órgão retirado através de remoção cirúrgica e pesado em balança tipo analítica. O peso obtido em grama do baço foi catalogado para posterior geração do gráfico representativo dos valores em grama. Para a geração do gráfico foi utilizado o graphPad Prism 5.0.

7.8 IMUNOFLUORESCÊNCIA INDIRETA (SOROLOGIA)

Para realização da imunofluorescência indireta (INF), cada animal teve o seu sangue coletado através de secção da veia da porta, sendo o sangue posto em tubo da marca Falcon, refrigerado no gelo por um período de 1 hora, em seguida centrifugado por três minutos a 1000 G, o soro obtido foi acondicionado em tubos de 100 µL e congelado até a realização do teste.

Para a Titulação dos anticorpos foram preparadas diluições seriadas do soro em PBS de 1/10 a 1/256 em placas de múltiplos poços, de fundo em U. Após essa etapa o volume de 10 µL das diluições de cada poço foi distribuído nas lâminas contendo o antígeno de *T. cruzi*. Em seguida as lâminas foram incubadas em câmara úmida a 37°C por um período de 30 minutos. Passado o período de incubação as lâminas foram submetidas a três lavagens sequenciais com PBS 1X pH 7.4, por um período de 5 minutos em cubetas próprias e secas a temperatura ambiente. Posteriormente, foram aplicadas 10 µl do anticorpo IgG anti-mouse conjugado ligado à fluoresceína (Sigma), sobre cada poço das várias laminas sendo em seguida incubadas a 37°C na estufa por mais 30 minutos.

Retiradas da estufa após o período de incubação as lâminas foram submetidas a três lavagens seguidas com PBS de 5 minutos, secadas e montadas com tampão Carbonato/Bicarbonato pH 9.6 (0,02M) e analisadas no microscópio Zeiss de epifluorescência.

7.9 DOSAGEM DE ISOTIPOS DE IMUNOGLOBULINAS: MÉTODO DE ELISA

As placas de poliestireno, foram sensibilizadas com antígeno bruto do *T. cruzi* diluído em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 numa concentração de 1,0 µg/poço (estabelecida previamente) e incubadas durante a noite, a 4°C. As placas foram

lavadas com PBS na concentração de 1,0%, pH7,4, os sítios livres bloqueados pela adição de leite desnatado (5%) diluído em PBS-Tween (0,3%) e incubadas em câmara úmida durante uma hora à temperatura ambiente. Antes de cada etapa de incubação foram realizadas lavagens com PBS-Tween 0,05%. Em seguida as amostras de soro dos camundongos foram diluídas em PBS-Tween 1:100 (previamente testada) e novamente incubadas um hora a 4°C. Na etapa seguinte, as placas foram incubadas com anti-imunoglobulina (Ig) de camundongo para os seguintes isotipos, IgG total, IgG1, IgG2a e IgM (SIGMA) nas diluições de 1:1000, em PBS-Tween 0,05% e incubadas por uma hora a 37°C. Como substrato, foi utilizado tetrametil benzidina (TMB)-peroxidase (SIGMA) para detectar interação antígeno-anticorpo. A reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N e a leitura da placa foi feita em espectrofotômetro com o comprimento de onda de 490nm.

7.10 DOSAGEM DAS CITOCINAS

As citocinas IL-6, IL-10, MPC-1, TNF e IFN- γ foram dosadas no plasma dos camundongos (infectados e tratados cepa Y, infectados tratados e não tratados cepa Colombiana e tratados não infectados) através do Kit Cytometric Bead Array - CBA (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA). Para a detecção o das concentrações o Kit possui beads de captura específica (FL3) para cada citocina de interesse, que são esferas ligadas a um anticorpo específico com intensidades de fluorescência distintas, e um anticorpo de detecção conjugado a ficoeritrina (PE - FL2). Os anticorpos proporcionam um sinal fluorescente proporcional com a quantidade de citocinas capturadas. Uma curva padrão para cada citocinas foi utilizada como referência de concentrações conhecidas, e abrange um conjunto

definido de concentrações de 20 a 5.000 pg/mL. Para construção da curva padrão foi realizada uma diluição seriada. Para isso utilizamos um tubo falcom de 15mL (Top Standert), ao qual transferimos as esferas do Standert e acrescentamos 2 mL do Assay diluente, incubamos por 15 minutos em temperatura ambiente. Foram identificados oito endorffs (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64, 1:128, 1:264), nos quais foram acrescentados 300 µL do ensaio diluente para a realização da diluição seriada. Após essa etapa, acrescentamos a diluição seriada num volume de 25µL da solução em cada poço da placa (96 poços, fundo U) devidamente identificados para posterior aquisição. Posteriormente as amostras de plasma foram distribuídas nos poços, seguintes aos da curva padrão, na concentração de 25 µL.

Para a realização da dosagem as amostras de plasma dos animais representativos dos vários grupos e os padrões, foram incubados com as beads e o PE por três horas. Para a distribuição das beads foi feito um mix, constituído por uma alíquota de 5 µL de cada bead de captura para cada poço de ensaio a ser analisado, incluindo os padrões. (ex. 5 µL da Bead Capture IL-8 × 20 poços = 100 µL).

Seguindo a distribuição do mix de beads adicionamos 25µL do PE (anticorpo de detecção) a cada poço e incubamos por três horas na geladeira e protegido da luz. Após a incubação foi feita a lavagem com 200 µL com o tampão de lavagem (centrifugação refrigerada, 1500 rpm, 10min), em seguida descartamos o sobrenadante vagarosamente e ressuspendemos as amostras e os padrões com 200 µL com o tampão de lavagem.

Os dados foram adquiridos por citometria de fluxo (BD FACSAarray) e a análise realizada pelo Software FCAP Array (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, USA) considerando uma curva padrão (pg/mL).

7.11 PREPARAÇÃO DAS CÉLULAS DO BAÇO PARA COLORAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO POR CITOMETRIA DE FLUXO. (FACS)

Inicialmente o baço foi extraído cirurgicamente dos camundongos provenientes dos diferentes grupos experimentais, e então suavemente divulsionados para obtenção das células. Estas células foram lavadas por 2 vezes, por centrifugação a 1000 rpm por 15 minutos a 4^o C. Após a primeira centrifugação, o sobrenadante foi ressuspenso em PBS pH 7.4 e após os primeiros artefatos ou “debris”, se depositarem sobre o fundo do tubo, retirou-se a solução em outro tubo a fim de que sejam excluídos os artefatos depositados. Posteriormente, foi efetuada uma nova centrifugação e por fim a ressusensão em cerca de 3 mL de RPMI incompleto. Para preservação das células viáveis, as mesmas foram mantidas em gelo. Após as lavagens, o número de células foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Ao se obter o número de células por mililitros, foram preparadas diluições contendo 2×10^6 células em cada 100 μ L. Em seguida a esse procedimento as células foram plaqueadas em placas de 96 poços (“Falcon”), sendo adicionando 2×10^6 células/poço, e posteriormente centrifugadas a 394 x G por 3 segundos. O próximo passo foi à ressusensão cuidadosa por “agitação” utilizado-se o Vortex, e imediatamente adicionado em cada poço cerca de 100 μ L de tampão de FACS, constituído de PBS, 5% (v/v) Soro Fetal Bovino e 0,1% (p/v) Azida. Alíquotas de 100 μ L das suspensões celulares foram então incubadas, por 30 minutos a 4^oC e protegidos da luz, com os seguintes anticorpos monoclonais (mAbs) anti-camundongos: anti-CD4 e anti-CD8 conjugados com isotiocianato de fluoresceína (FITC); anti-CD45RB, anti-CD62L e CD11b em seguida, as células foram lavadas 3 vezes por centrifugação e ressusensas em 0,5 mL de PBS. As

suspensões de células foram submetidas à leitura em citômetro de fluxo (FACScan, Becton Dickinson, Sunnyvale, CA).

7.12 TESTE CUTÂNEO

Os animais dos grupos experimentais (YT e COL-T) foram submetidos à injeção intradérmica, com antígeno de formas epimastigotas de *T. cruzi* (das respectivas cepas) obtidas de meio de cultura, como meio de avaliação da reação de hipersensibilidade tardia.

7.13 OBTENÇÃO DOS ANTÍGENOS DE FORMAS EPIMASTIGOTAS DO *T. CRUZI*

As formas epimastigotas provenientes de cultura mantidas em meio WARREN (1960), foram concentradas após centrifugação (1500 rpm por 20') em tubos novos e autoclavados da marca Falcom de volume correspondente a 50 mL. Os precipitados referentes aos conteúdos das amostras, foram reunidos num único tubo e lavados sucessivas vezes com PBS (pH 7,4). Posteriormente a essas sucessivas lavagens, fez-se uma última centrifugação do material que fora re-suspendido em PBS, recolhendo-se em seguida o precipitado e descartando o sobrenadante.

O precipitado colhido foi então submetido a dez ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196°C), sendo logo em seguida descongelado (banho Maria) à 37°C. Através dos procedimentos acima descritos obteve-se a ruptura da membrana plasmática do *T. cruzi*, permitindo que o conteúdo protéico fosse liberado. O conteúdo final foi centrifugado, sendo agora o sobrenadante coletado para uso.

Este conteúdo foi filtrado em filtro milipore dentro de um fluxo laminar para evitar contaminação por outros agentes.

Foi realizada a dosagem protéica pelo método BCA. Onde foi utilizando o “BCA Protein Assay Kit” da PIERCE (catálogo numero 2161297A). Ao referido kit é aplicado a técnica baseada em uma detecção colorimétrica através da utilização do ácido bicinconinico (BCA), onde é possível a detecção e quantificação do total de proteínas numa amostra. A amostra obtida foi submetida ao protocolo da técnica sendo a sua concentração protéica medida através espectrofotômetro e posteriormente ajustada para 2mg/mL.

7.14 TESTE DE AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA

Os animais infectados dos respectivos grupos experimentais (YT e COL-T) receberam o antígeno preparado na concentração de 2mg/mL. A pata traseira direita recebeu um volume de 0,5 mL do antígeno enquanto a pata traseira esquerda recebeu o mesmo volume de solução salina fosfatada (PBS). Os camundongos infectados e não tratados cepa Y e Colombiana não foram submetidos ao teste devido à insuficiência de animais por mortalidade em ambos os grupos.

7.15 MEDIÇÃO DA ESPESSURA DA PATA

Utilizando um paquímetro (FISHERBRAND DIGITAL CALIPERS, TRACEABLE, FISHER SCIENTIFIC) todos animais tiveram suas patas medidas em períodos que seguiram a seguinte sistemática: antes da injeção, 24, 48 e 72 horas, após a exposição aos antígenos. A unidade de medida utilizada foi o milímetro (mm) e as medidas obtidas foram protocoladas para posterior análise.

8 RESULTADOS

Os resultados da presente investigação da avaliação experimental nos grupos: Controle, Tratados não infectados (TNI), cepa Y Infectados e tratados (YT), cepa Colombiana infectados e tratados (COL-T), e não tratados (COL-NT).

8.1 ANÁLISE DA PARASITEMIA (CURVAS PARASITÊMICAS)

8.1.1 Número de formas tripomatigostas circulantes em camundongos suíços infectados com as cepa Y suscetível e Colombiana resistente ao Benzonidazol.

As curvas de parasitemia representam o acompanhamento dos níveis de parasitas em sangue periférico. As curvas parasitêmicas nos vários grupos (infectados e tratados e infectados não tratados) apresentaram ascensão inicial a partir do 5^o dia da infecção, com picos irregulares entre o 5^o e 12^o dias de infecção cepa Y suscetível e entre o 17^o e 24^o dias cepa Colombiana resistente. A negatização da parasitemia no grupo infectado e tratado Cepa Y ocorreu 9^o dia de infecção e, na Cepa Colombiana no 24^o dia. A diminuição no grupo infectado não tratado cepa Col deu-se a partir 33^o de infecção, com negatização parasitêmica a partir do 42^o dia de infecção. A curva parasitêmica referente aos animais infectados e não tratados cepa Y, não foi avaliada devido a mortalidade dos animais no 12^o dia pós infecção.

Parasitemia em camundongos Suíços infectados com a cepa Y

suscetível e, colombianas resistentes ao Benzonidazol

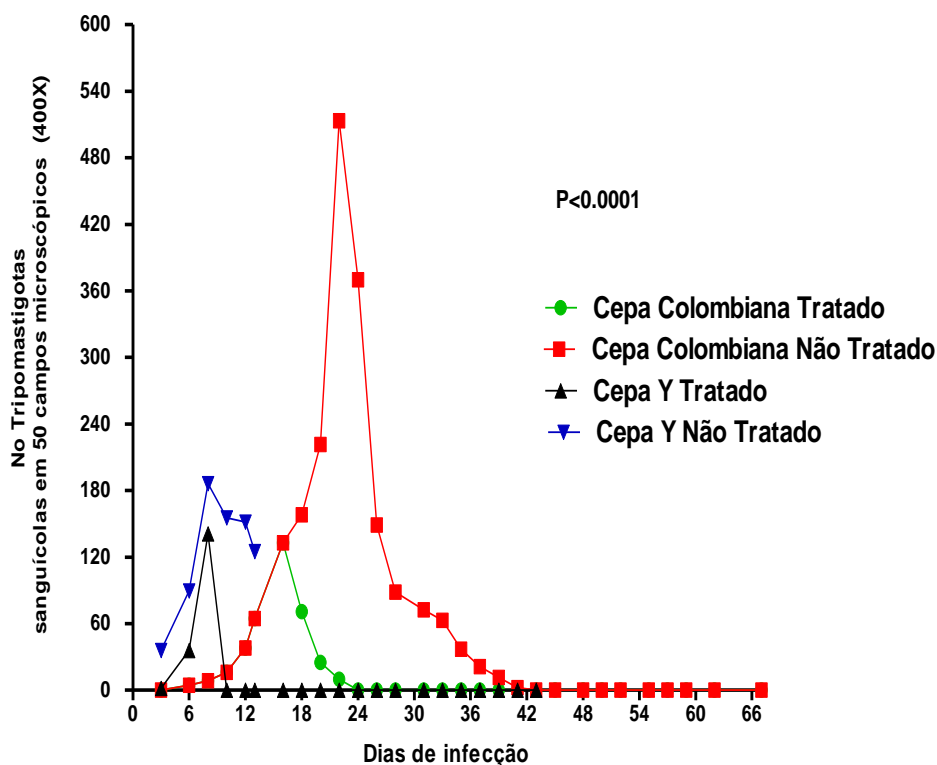


Figura 2. Números de parasitas circulantes. Camundongos Suíços infectados por via intraperitoneal com 10 mil formas tripomastigotas sanguíneas com as cepas Colombiana (resistente) e Y (suscetível). Em detalhe o gráfico representa os grupos experimentais: infectados e tratados cepa Y e Colombiana, infectados não tratados cepa Y e Colombiana, sendo os níveis circulantes dos parasitas acompanhado em dias alternados durante todo decurso da infecção e tratamento. A avaliação da estatística em todos os grupos revelou índices de significância de $p < 0,0001$ no grupo infectado pela cepa Colombiana e não tratado (**COL NT**), em relação aos demais grupos. O teste realizado foi não paramétrico de Kruskal-Wallis.

8.2 TAXA DE MORTALIDADE

As taxas de mortalidade foram acompanhadas durante todo o decurso da infecção em todos os grupos. A mortalidade cumulativa nos grupos experimentais apresentou as seguintes taxas: Cepa Y camundongos infectados e não tratados 100% no 12º dia de infecção e, 11% nos camundongos infectados e tratados; na

cepa colombiana 12% camundongos infectados e tratados, e de 35% nos não tratados. No grupo tratado não infectado e nos controles intactos (sem tratamento) não foi observada mortalidade durante todo o estudo.

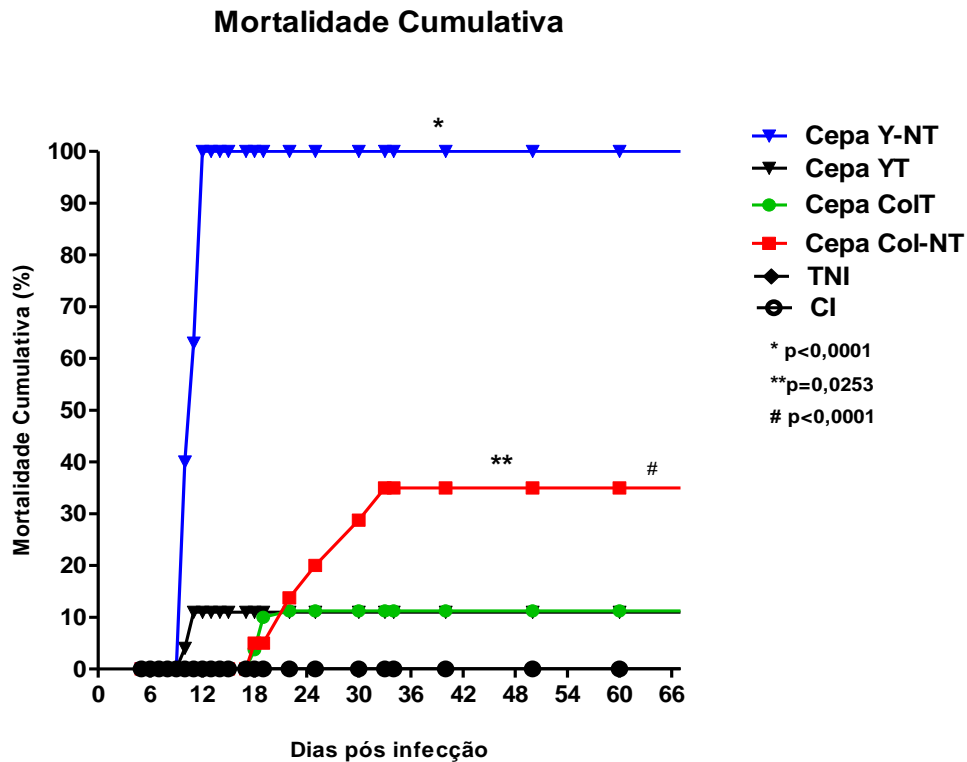


Figura 3. Taxa de mortalidade cumulativa. Camundongos Suíços infectados por via intraperitoneal com 10 mil formas tripomastigotas sanguícolas com as cepas Colombiana (resistente) e Y (suscetível), tratados não infectados e controles intactos. A avaliação da estatística pelo teste t Student grupos revelou índices de significância de * $p < 0,0001$, entre os grupos YT e YNT. A avaliação intergrupos entre os grupos COL-NT e YNT, demonstrou índice de significância com $p = 0,0253$ e, a análise entre os grupos YNT e Col-NT demonstrou diferença estatística com o valor de # $p < 0,0001$.

8.3 AVALIAÇÃO SOROLÓGICA EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS TRATADOS E NÃO TRATADOS COM BENZONIDAZOL E INFECTADOS PELO *T. CRUZI* (FASE AGUDA E CRÔNICA)

Os títulos de anticorpos IgG dentro dos vários grupos experimentais infectados com as cepas Y suscetível e Colombiana resistente e tratado com Benzonidazol (YT, COL-T), infectados não tratados (COL-NT), tratado não infectados (TNI) e controle sem tratamento (Controles), variaram de negativo a 1/2560. No grupo infectado e tratado cepa Colombiana fase aguda os títulos sorológicos variaram de 1/80 a 1/320 no grupo infectado não tratado de 1/80 a 1/640. Na fase crônica os títulos variaram de 1/80 a 1/640 no grupo infectado e tratado e no grupo não tratado de 1/160 a 1/2560 (Tabela 1).

Tabela 1. Sorologia de camundongos infectados com as cepas Y (suscetível) e Colombiana (resistente), animais tratados não infectados e controles sem tratamento. Os títulos sorológicos representam os níveis de IgG obtidos dos soros dos animais infectados durante a **fase aguda**, nos animais não infectados e tratados e nos controles sem tratamento, as amostras foram obtidas no mesmo período do esquema de tratamento correspondente ao dos animais infectados.

<i>Identificação</i>	<i>Inóculo</i>	<i>Nº Camundongos</i>	<i>Sorologia</i>	
			<i>Menor Título</i>	<i>Maior Título</i>
Cepa Y Trat.	5 x 10 ⁴	12	1/ 40	1/ 320
Cepa Col Trat.	5 x 10 ⁴	12	1/ 80	1/ 320
Cepa Col Não Trat.	5 x 10 ⁴	12	1/ 80	1/ 640
Não infec. Trat.	0	12	Neg.	1/10
Controles	0	12	Neg.	1/10
Total		60	Soros 60 unidades	

No grupo infectado e tratado cepa Y os títulos sorológicos variaram de 1/40 a 1/320 fase aguda e de negativo a 1/40 na fase crônica (**Tabela 2**).

Tabela 2. Sorologia de camundongos suíços não isogênicos infectados com as cepas Y (suscetível) e Colombiana (resistente), animais tratados não infectados (TNI) e controle sem tratamento (Controles). Os títulos sorológicos representam os níveis de IgG obtidos dos soros dos animais infectados durante a fase crônica, nos animais não infectados e tratados e nos controles sem tratamento, as amostras foram obtidas no mesmo período do esquema de tratamento correspondente ao dos animais infectados.

<i>Identificação</i>	<i>Inóculo</i>	<i>Nº Camundongos</i>	<i>Sorologia</i>	
			<i>Menor Título</i>	<i>Maior Título</i>
Cepa Y Trat.	5 x 10 ⁴	10	Neg.	1/ 40
Cepa Col Trat.	5 x 10 ⁴	10	1/ 80	1/ 640
Cepa Col Não Trat.	5 x 10 ⁴	09	1/ 160	1/ 2560
Não infec. Trat.	0	10	Neg.	1/10
Controles	0	06	Neg.	1/10
Total		45	Soros 45 unidades	

8.4 DOSAGEM PLASMÁTICA DO ISOTIPO IgM

Pela reação de Elisa, foram detectados níveis maiores da imunoglobulina IgM, nos camundongos infectados não tratados pela cepa Colombiana (COL-NT) resistentes ao Benzonidazol na fase crônica em relação a todos os grupos (Controles, TNI, COL-T e YT) tanto na fase aguda como na crônica (Fig 4). A análise intergrupos (Controles, TNI, COL-NT, COL-T e YT) nas mesmas fases da infecção (aguda e crônica e do tratamento) revelou diferenças estatísticas entre os grupos COL-T e YT $p=0,0031$ na fase aguda e, entre os grupos COL-T e COL-NT $p=0,0423$ na fase crônica. A análise entre grupos considerando as fases aguda e crônica só revelou diferença significativa para o grupo YT com o valor de $p=0,0030$.

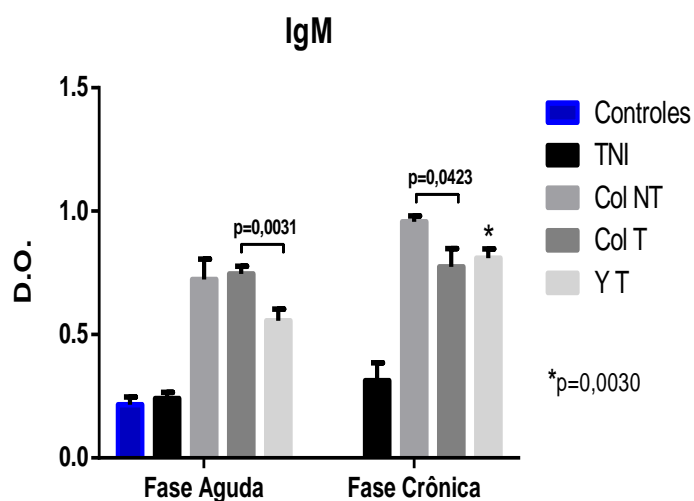


Figura 4. Dosagem do isotipo IgM, em camundongos Suíços infectados pelas cepas Y tratados (YT) e Colombiana tratados e não tratados (COL-T e COL-NT), animais tratados não infectados (TNI) e controles.

8.5 DOSAGEM DO ISOTIPO IgG1

Pela reação de ELISA, foram detectados níveis maiores das imunoglobulinas IgG1, nos camundongos infectados não tratados pela cepa Colombiana na fase crônica em relação a todos os grupos analisados tanto na fase aguda (Controles, TNI, COL-T e YT) quanto na crônica (Fig. 5). A análise intergrupos (Controles, TNI, COL-NT, COL-T e YT) nas mesmas fases da infecção (aguda e crônica) não revelou diferenças estatísticas. A análise entre grupos, considerando as fases aguda e crônica, revelou diferenças significativas entre os grupos YT valor de $p= 0,0030$ e Col NT $p= 0,0201$.

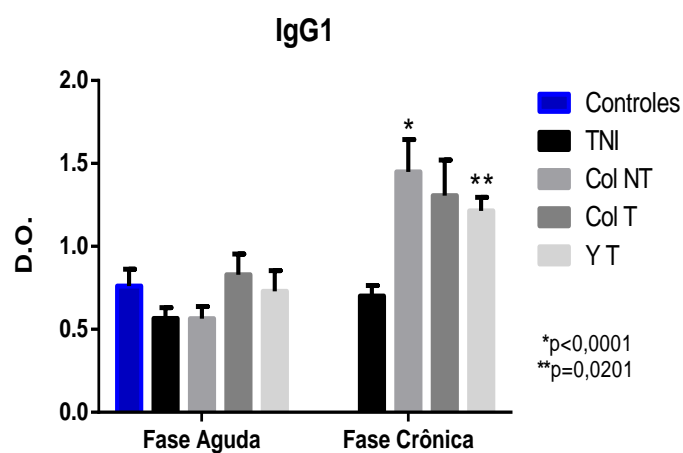


Figura 5. Dosagem do isotipo IgG1, em camundongos suíços infectados pelas cepas Y (YT) e Colombiana (COL-T e COL-NT), animais tratados não infectados (TNI) e controles durante a fase crônica e aguda.

8.6 DOSAGEM DO ISOTIPO IgG2a

Pela reação de Elisa, foram detectados níveis mais elevados do isotipo IgG2a, nos camundongos infectados pela cepa Colombiana não tratados na fase crônica em relação a todos os grupos (Controles, TNI, COL-T e YT) analisados tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção. A análise estatística realizada pelo teste t de Student da fase aguda revelou diferença significativa $p= 0,03$ entre os grupos COL-T e YT (Fig. 6). As análises nos demais grupos, não revelaram diferenças significativas. A avaliação intergrupos (Controles, TNI, COL-T e YT), considerando as fases aguda e crônica, revelaram diferenças significativas nos grupos TNI $p= 0,0275$, YT $p= 0,0116$ e COL- NT $p=0,006$.

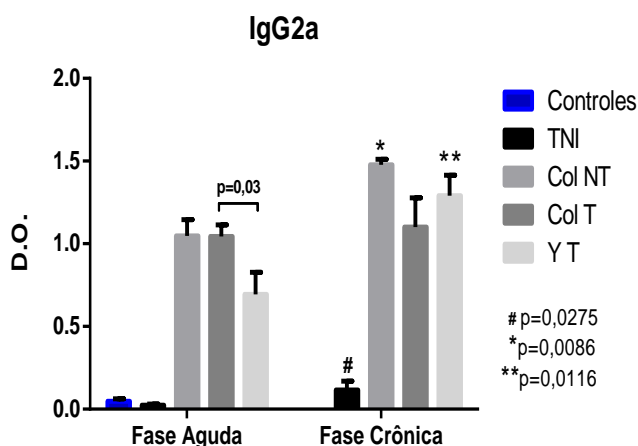


Figura 6. Dosagem do isotipo IgG2a, em camundongos suíços infectados pelas cepas Y (YT) e Colombiana (COL-T COL-NT), animais tratados não infectados (TNI) e controles pelo fármaco Benzonidazol.

8.7 DOSAGEM DA IMUNOGLOBULINA IGG TOTAL

Pela reação de ELISA, não foi detectado níveis maiores das imunoglobulinas IgG Total, nos camundongos infectados não tratados pela cepa Colombiana na fase crônica em relação a todos os grupos analisados tanto na fase aguda como crônica (Controles, TNI, COL-T e YT). A análise intergrupos (Controles, TNI, COL-T e YT) da fase aguda não demonstrou diferenças significativas em nenhum dos grupos analisados. A avaliação entre os níveis de IgG total, considerando as fases aguda e crônica, revelou diferença significativa nos grupos COL-NT $p= 0,0001$ e YT $p= 0,0201$ (Fig. 7).

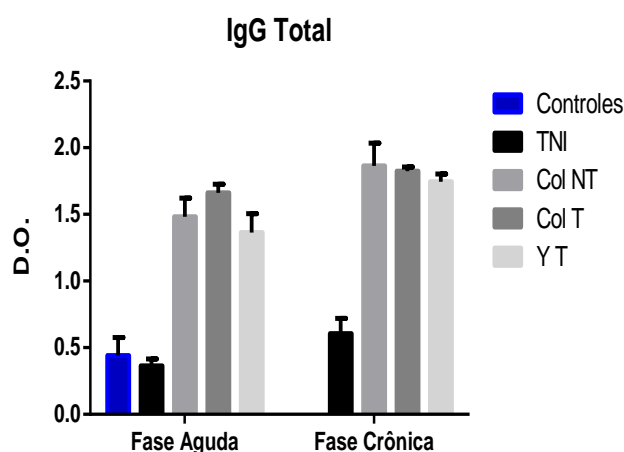


Figura 7. Dosagem do isotipo IgG Total em camundongos suíços infectados pelas cepas Y (YT) e Colombiana tratados e não tratados (COL-T e COL-NT), animais tratados não infectados (TNI) e controles.

8.8 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-6, EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS DURANTE A INFECCÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL

A dosagem plasmática dos níveis de IL-6 em camundongos durante às trintas doses iniciais do fármaco Benzonidazol por via intragástrica, demonstrou no grupo infectado tratado pela cepa Y, ascensão precoce já após o nono dia de infecção (correspondente ao 2º dia de tratamento), com picos irregulares durante todo o tratamento (Fig. 8). Na cepa Colombiana a ascensão inicial deu-se em torno do 25º de infecção (correspondendo ao 5º dia de tratamento), com pico máximo em torno do 30º dia pós-infecção, o que corresponde ao 10º dia de tratamento e, com concomitante decréscimo ao longo do tratamento.

A avaliação entre os grupos da cepa Colombiana camundongos tratados (COL-T) e não tratados (COL-NT), revelou níveis maiores nos animais não tratados no 30º dia de infecção. O grupo tratado não infectado (TNI) não apresentou nenhuma alteração ao longo do tratamento. Nesse grupo o nível máximo de IL-6 plasmático detectado foi em torno de 18,96 pg/mL no 30º dia de tratamento, não sendo visível no gráfico, quando comparado com os níveis nos animais infectados tratados e não tratados.

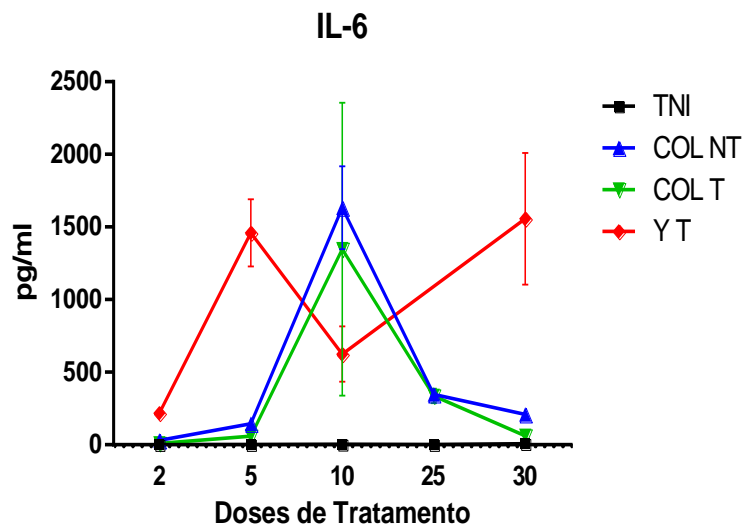


Figura 8. Níveis plasmáticos de IL-6 em camundongos tratados não infectados (TNI), infectados e tratados cepa Y (YT), infectados pela cepa Colombiana animais tratados (COL-T) e não tratados (COL-NT). Os resultados são expressos em pm/mL.

A análise estatística realizada comparando os números de doses do quimioterápico revelou valores significantes comparando os grupos COL-T e COL-NT nos pontos correspondente aos números de doses: 2 doses $p = 0,0442$; 5 doses $p = 0,0084$ e 30 doses $p = 0,003$. Os pontos correspondentes as doses 10 e 25 doses não revelaram significância estatística. A avaliação intergrupos comparando as cepas Y e Colombiana (animais tratados) revelaram nos pontos de 2 doses $p < 0,0001$; 5 doses $p = 0,0037$ e 30 doses $p = 0,0301$. Os pontos correspondentes as doses 10 e 25 doses não revelaram significância estatística. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student.

8.9 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IL-10, EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E

RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL

A dosagem plasmática dos níveis **de IL-10**, em camundongos durante as trintas doses iniciais com o fármaco Benzonidazol (Fig 9). O grupo representado pela cepa Y tratados (YT), foram detectados picos irregulares durante todo o decurso do tratamento, sendo níveis mais elevados no 25º dia de tratamento (32º dia pós-infecção) e, posterior decréscimo ao longo do tratamento.

A dosagem nos animais infectados e não tratados (COL-NT) a ascensão inicial deu-se a partir 23º dia de infecção se mantendo ao longo do tratamento com pico máximo detectado foi após 10 doses do Benzonidazol, correspondendo ao 30º dia de infecção. Posteriormente, o índice plasmático de IL-10 nesse grupo foi decaindo ao longo do tratamento. No grupo infectado tratado pela cepa Colombiana (COL-T), foram detectados valores mínimos durante todo o tratamento. O grupo tratado não infectado (TNI) não apresentou nenhuma alteração detectável ao longo do tratamento. Nesse grupo o nível máximo de IL-10 plasmático foi em torno de 16,43 pg/ml no 30º dia de tratamento, não sendo visível no gráfico, quando comparado com os níveis detectados nos animais infectados.

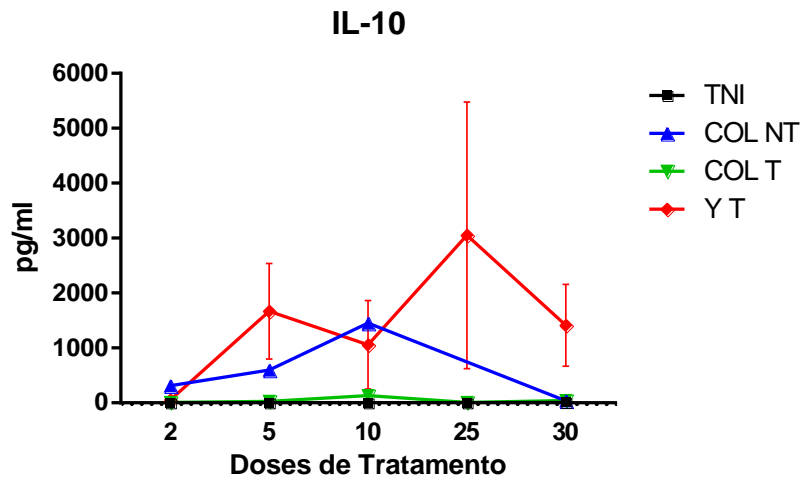


Figura 9. Níveis plasmáticos de IL-10 em camundongos tratados não infectados (TNI), infectados e tratados cepa Y (YT), infectados pela cepa Colombiana animais tratados (COL-T) e não tratados (COL-NT). Os resultados são expressos em pm/ml. A análise estatística realizada comparando os números de doses do quimioterápico revelou valores significantes comparando os grupos COL-T e COL-NT nos pontos correspondente aos números: 2 doses $p= 0,0209$; 5 doses $p< 0,0001$ e 10 doses $p= 0,0001$. Os pontos correspondentes as doses 25 e 30 doses não revelaram significância estatística. A avaliação intergrupos comparando as cepas Y e Colombiana (animais tratados) não revelaram significância estatística em nenhum dos pontos analisados. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student.

8.10 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE MCP-1, EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS DURANTE A INFEÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL

A avaliação plasmática dos níveis de MCP-1, em camundongos durante as trintas doses iniciais com o fármaco Benzonidazol, revelou ascensão precoce em todos os grupos analisados. Foram detectados níveis mais elevados nos animais infectados e tratados pela cepa Y (YT) durante todo o tratamento, quando comparados com os animais infectados e tratados pela Colombiana (COL-T). A análise nos camundongos infectados não tratados pela cepa colombiana (COL-NT) demonstrou pico máximo no 30º dia de infecção, correspondendo a 10ª dose do fármaco Benzonidazol. O grupo tratado não infectado (TNI) revelou níveis mais elevados em torno de 6,92 pg/ml, no 30º dia de tratamento, sendo levemente visível no gráfico, quando comparado com os níveis detectados nos animais infectados tratados e não tratados.

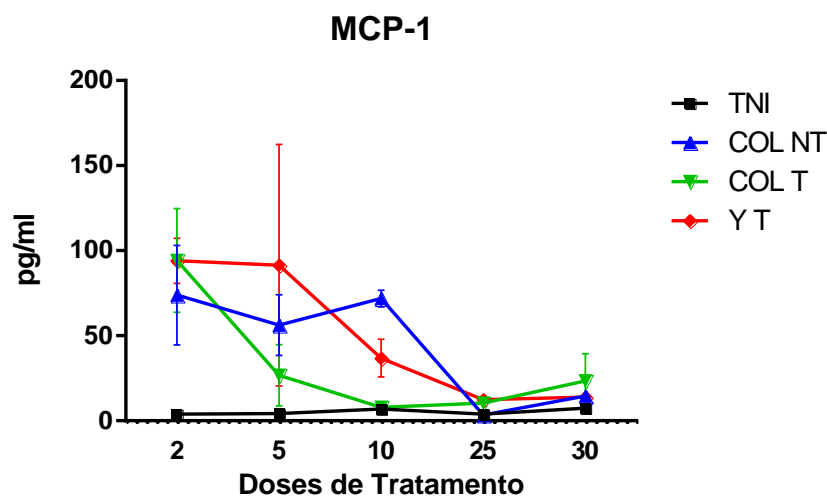


Figura 10. Níveis plasmáticos de MCP-1, em camundongos tratados não infectados (TNI), infectados e tratados cepa Y (YT), infectados pela cepa Colombiana animais tratados (COL-T) e não tratados (COL-NT). Os resultados são expressos em pm/ml.

A análise estatística realizada comparando os números de doses do quimioterápico revelou valores significantes comparando os grupos COL-T e COL-NT no ponto correspondente ao número de 10 doses com o valor de **p= 0,0002**. Os outros

pontos correspondentes as doses 2; 5; 25 e 30 doses, não revelaram significância estatística. A avaliação intergrupos comparando as cepas Y e Colombiana (animais tratados) não revelaram significância estatística em nenhum dos pontos analisados. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student.

8.11 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE IFN- γ , EM CAMUNDONGOS SUÍÇOS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL

A análise plasmática dos níveis de IFN- γ , em camundongos durante às trintas doses iniciais do fármaco Benzonidazol, demonstrou ascensão inicial em todos os grupos experimentais infectados tratados e não tratados logo no início da infecção e tratamento. O grupo representado pela cepa Y, animais infectados e tratados (YT) revelou índices maiores de IFN- γ , em relação a todos os grupos analisados em torno do 12^o dia de infecção (cinco doses de tratamento), com posterior decréscimo ao longo do tratamento.

Na cepa Colombiana a ascensão inicial deu-se entre o 18 e 23^o dias pós-infecção, com picos irregulares nos animais não tratados (COL-NT) ao longo do estudo. No grupo infectado tratado pela cepa Colombiana (COL-T) o pico máximo detectado foi após 5 doses do Benzonidazol correspondendo ao 23^o dia de infecção. A avaliação continuada demonstrou decréscimo ao longo do tratamento.

O grupo tratado não infectado (TNI) não apresentou nenhuma alteração ao longo do tratamento. Nesse grupo o nível máximo de IFN- γ plasmático detectado foi em torno de 2,47 pg/ml no 10^o dia de tratamento, não sendo visível no gráfico, quando

comparado com os níveis detectados nos animais infectados tratados e não tratados.

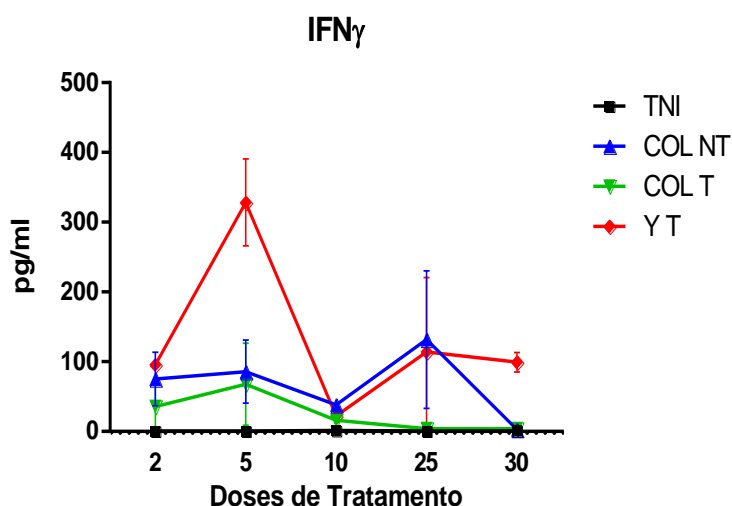


Figura 11. Níveis plasmáticos de IFN- γ , em camundongos tratados não infectados (TNI), infectados e tratados cepa Y (YT), infectados pela cepa Colombiana animais tratados (COL-T) e não tratados (COL-NT). Os resultados são expressos em pm/ml.

A análise estatística realizada comparando os números de doses do quimioterápico não revelou valores significantes comparando os grupos COL-T e COL-NT. A avaliação intergrupos comparando as cepas Y e Colombiana (animais tratados) revelaram nos pontos de 5 doses $p= 0,0383$ e 30 doses $p= 0,0025$. Os pontos correspondentes as doses 2; 10 e 25 doses não revelaram significância estatística. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student.

8.12 CINÉTICA DOS NÍVEIS PLASMÁTICOS DE TNF- α , EM CAMUNDONGOS SWISS NÃO ISOGÊNICOS DURANTE A INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR CEPA SUSCETÍVEL E RESISTENTE DO *T. CRUZI*, SUBMETIDOS AO TRATAMENTO COM BENZONIDAZOL

A cinética plasmática dos níveis de **TNF- α** , em camundongos durante as trintas doses iniciais com o fármaco Benzonidazol, revelou ascensão precoce em todos os grupos analisados. Foram detectados níveis mais elevados nos animais infectados e tratados pela cepa Y (YT) no 25^o dia de tratamento (31^o dia pós-infecção) e posterior decréscimo ao longo do tratamento.

Na cepa Colombiana animais infectados e não tratados (COL-NT) a ascensão inicial deu-se a partir 20 se mantendo ao longo do tratamento. No grupo infectado tratado pela cepa Colombiana (COL-T), o pico máximo detectado foi após 10 doses do Benzonidazol, correspondendo ao 30^o dia de infecção. Posteriormente os índices neste grupo foram caindo ao longo do tratamento.

O grupo tratado não infectado (TNI) não apresentou nenhuma alteração ao longo do tratamento. Nesse grupo o nível máximo de TNF- α plasmático detectado foi em torno de 4,9 pg/ml no 30^o dia de tratamento, não sendo visível no gráfico, quando comparado com os níveis detectados nos animais infectados tratados e não tratados.

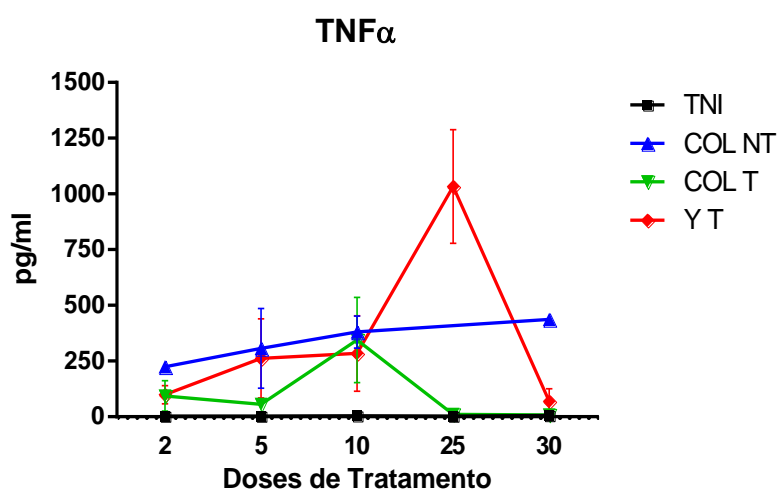


Figura 12. Níveis plasmáticos de TNF- α , em camundongos tratados não infectados (TNI), infectados e tratados cepa Y (YT), infectados pela cepa Colombiana animais tratados (COL-T) e não tratados (COL-NT). Os resultados são expressos em pm/mL.

A análise estatística realizada comparando os números de doses do quimioterápico revelou valores significantes comparando os grupos COL-T e COL-NT nos pontos correspondente ao número de 30 doses $p < 0,0001$. Os pontos correspondentes as doses 2; 5; 10 e 25, não revelaram significância estatística. A avaliação intergrupos comparando as cepas Y e Colombiana (animais tratados) revelou valores significantes no ponto de 25 doses $p= 0,016$. Os pontos correspondentes as doses 2; 5; 10 e 30 doses não revelaram significância estatística. A análise estatística foi realizada através do teste t de Student.

8.13 AVALIAÇÃO DA CELULARIDADE (HIPERPLASIA) DO BAÇO EM ANIMAIS SUÍÇOS INFECTADOS E TRATADOS COM BENZONIDAZOL, INFECTADOS E NÃO TRATADOS E TRATADOS E NÃO INFECTADOS

A avaliação do peso do baço representa a hiperplasia ou celularidade dos centros germinais em reação em consequência infecção experimental pelo *T. cruzi*. A análise do peso do baço no grupo representado pelos animais infectados com a cepa Colombiana tratados e não tratados, demonstraram tanto na fase aguda como na fase crônica, maior peso em granas quando comparado com animais tratados com a cepa Y em ambas as fases. Nos animais tratados com Benzonidazol e não infectados (TNI), não foi evidenciado aumento da celularidade ou qualquer alteração no decurso do estudo.

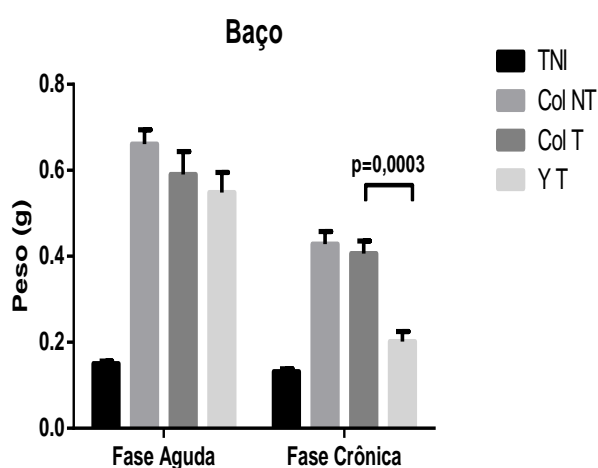


Figura 13. Avaliação do peso do baço. Peso do baço de animais não isogênicos infectados pelas cepas Y tratados e, Colombiana tratados e não tratados com Benzonidazol e tratados não infectados. A avaliação estatística pelo teste estatístico t Student (**p<0,0003**) n=12, revelou diferença estatística significativa nos animais infectados e tratados pelas cepas Y suscetível e Colombiana resistentes na fase crônica quando comparados. A mesma avaliação aplicada na fase aguda, não revelou resultado estatisticamente significativo em nenhum dos grupos avaliados.

8. 14 ANÁLISE CITOMÉTRICA

8.14.1 Avaliação quantitativa das populações de linfócitos T CD4⁺ no baço de camundongos suíços.

Podemos observar na figura 14, porcentagens de células T CD4⁺ no baço nos diferentes grupos experimentais (**Controles, TNI, Col-NT, Col T e YT**), na fase aguda e crônica da infecção. A comparação entre os grupos na fase aguda revelou uma tendência de diminuição das quantidades relativas de células T CD4⁺ com a infecção para ambas as cepas Colombiana e Y, embora não tenha apresentado diferença estatística significativa. E em relação aos animais não infectados e tratados um aumento significativo em relação à cepa Colombiana. Com a progressão da infecção para a fase crônica, observa-se um aumento da proporção de células T CD4 para a cepa Colombiana, que é acentuada pelo tratamento com o benzonidazol. O mesmo não ocorre, entretanto, para a infecção pela cepa Y. De fato, os animais infectados por esta cepa e tratados com benzonidazol apresentam proporção de células T CD4 semelhantes ao encontrado na fase aguda da infecção, e significativamente menor que os encontrados para a cepa Colombiana. (Figura 14).

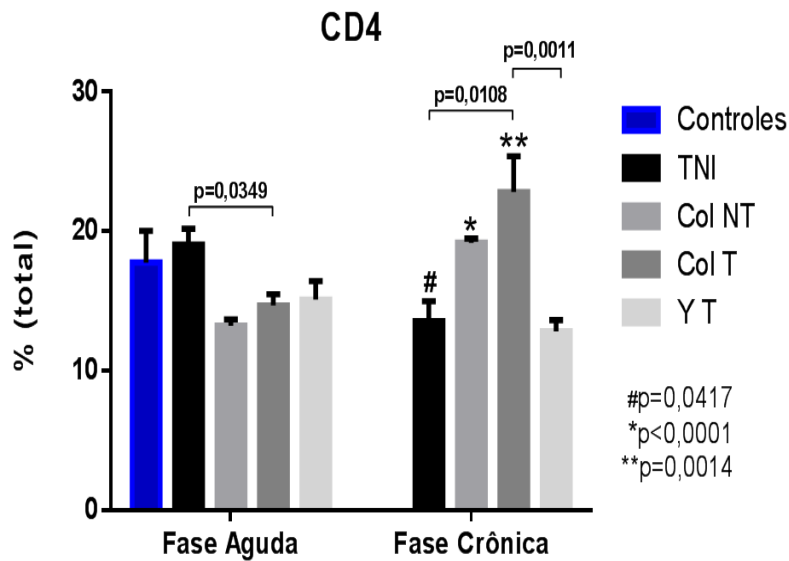


Figura 14. Proporção da população de células T CD4⁺ esplênicas na fase aguda e crônica da infecção. Nesta figura está representada a porcentagem de células nos grupos: Controles, TNI, Col NT, Col T e YT. Análise estatística pelo teste t Student aplicado na fase aguda revelou diferença significativa **p= 0, 0349**, nos animais tratados não infectados com Benzonidazol quando comparamos com o grupo COL-T. A análise estatística da fase crônica entre os grupos COL-T e YT, pelo teste t Student foi estatisticamente significativa **p=0, 0011**. Aplicando-se o mesmo teste entre os grupos **COL-T** e **TNI** obtivemos **p=0,0108**. Avaliação estatística entre os mesmos grupos comparando a fase a fase aguda e crônica revelou **#p=0, 0417 TNI**, ***p<0, 0001 COL-NT** e ****p=0, 0014 Col T**. A análise estatística foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

8.14.2 Avaliação quantitativa das populações de Linfócitos TCD8⁺ no baço de camundongos suíços tratados e não tratados

Observamos na figura 15, a porcentagens de células T CD8⁺ no baço nos diferentes grupos experimentais (Controles, TNI, COL-NT, COL-T e YT), na fase aguda e crônica da infecção. A avaliação comparativa entre os grupos na fase aguda revelou uma tendência maior das quantidades relativas de células T CD8⁺ com a infecção para a cepa Y tratada em comparação à cepa Colombiana, embora não

tenha apresentado diferença estatística significativa. A análise entre os animais tratados não infectados (TNI) revelou um aumento significativo em relação ao grupo controle (representado pelos animais sem infecção e tratamento). Observamos também, uma maior porcentagem dessa população de células (CD8+) no grupo TNI, em comparação aos grupos infectados tratados e não tratados, porém, a análise estatística não revelou diferença significativa. Por outro lado, animais infectados pela cepa Y e tratados apresentam, na fase crônica, proporções significativamente menores de células T CD8+, quando comparado àqueles infectados pela cepa Colombiana e também tratados. Tendo como parâmetro, a evolução do tratamento no grupo TNI, observamos uma diminuição significativa da porcentagem de células CD8+.

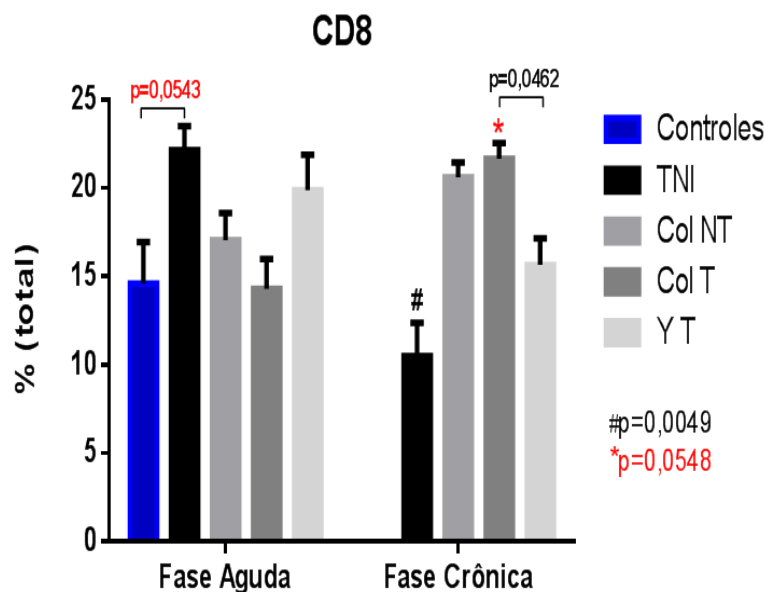


Figura 15. Porcentagem (em milhões de células) da população de células CD8 esplênicas na fase aguda e crônica da infecção nos grupos: **CI**, **TNI**, **Col-NT**, **Col-T** e **YT**. A análise entre os grupos infectados fase aguda não mostrou diferença significativa entre os tratados e não tratados. Na fase crônica observa-se aumento significativo de células CD8 nos animais infectados pela cepa Colombiana e tratados em relação aos infectados e tratados cepa Y **p= 0,0462**. Análise estatística entre os mesmos grupos, com relação à fase aguda e crônica, revela diferença significativa

$p=0,0049$ no grupo **TNI**. A análise estatística foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p<0,05$ foram considerados significantes.

8.14.3 Avaliação da frequência de células $CD4+CD62L^{neg}$ de memória efetora no baço de camundongos suíços

Na figura 16 estão representadas as porcentagens de células $CD4+$ que não expressam o marcador **CD62L**, observadas no baço de animais dos diferentes grupos experimentais (**Controles, TNI, Col-NT, Col-T e YT**), na fase aguda e crônica da infecção. A avaliação entre os grupos na fase aguda revelou maior porcentagem de $CD62L^{neg}$ nos animais infectados e tratado com a cepa Y em relação aos infectados e tratados pela cepa Colombiana. Esta tendência também foi observada durante a fase crônica. A análise entre os mesmo grupos considerando a evolução do tratamento e, das fases aguda e crônica da infecção não revelou diferenças estatisticamente significantes.

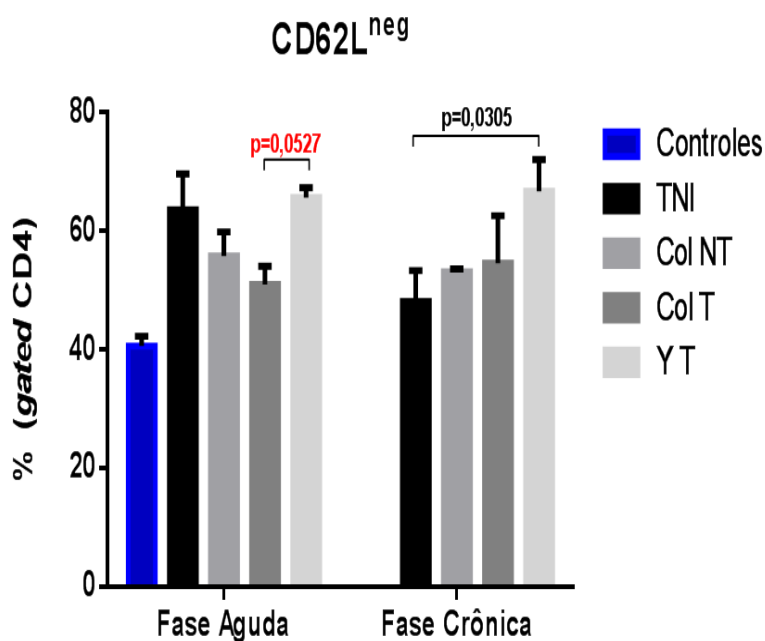


Figura 16. Porcentagem da população de células **CD62L^{neg}** esplênicas na fase aguda e crônica da infecção. Nesta figura está representada a porcentagem de células nos grupos: Controles, TNI, Col NT, Col T e YT. Análise estatística na fase aguda entre os grupos revelou uma tendência de aumento (**p= 0,0527**), nos animais infectados pela cepa Y e tratados em relação aos tratados e infectados pela cepa Colombiana. Análise realizada entre os demais grupos experimentais não revelou significância estatística, ainda que se tenha observado uma tendência no aumento dessa população no grupo tratado TNI. Na fase crônica observa-se diferença significativa apenas entre os grupos tratados não infectados e cepa Y tratados (**p= 0, 0305**). A análise estatística foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

8.14.4 Avaliação da frequência de células **CD8+CD62L^{neg} de memória efetora no baço de camundongos suíços**

Analisando o fenótipo das populações linfocitárias no baço, notamos que com a infecção e tratamento houve um aumento maior na frequência de células T de memória efetora **CD62L^{neg}** na fase aguda nos grupos TNI, COL-NT, COL-T E YT em relação a fase crônica. Na fase inicial do tratamento a comparação entre os grupos controle sem tratamento e o tratado não infectado (TNI) revelou aumento significativo no grupo (TNI) em relação aos controles sem tratamento. Entretanto o tratamento com benzonidazol na fase crônica não foi capaz, de alterar a proporção de células T CD8+ com perfil de memória efetora nos animais infectados. Observamos também que ambas as cepas Colombiana e Y induzem uma resposta imune com proporções semelhantes de células T CD8 de memória efetora.

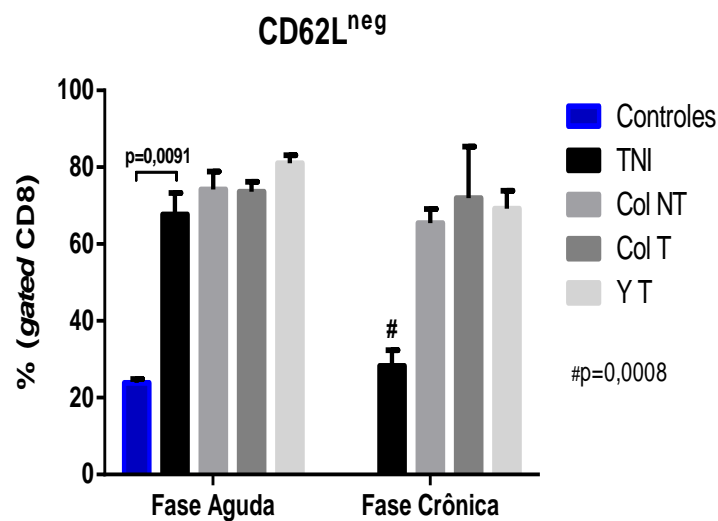


Figura 17. Frequência da população das células de memória (**CD8+CD62L^{neg}**) esplênicas na fase aguda e crônica da infecção. Análise estatística revelou diferença significativa **p= 0, 00091**, apenas nos animais tratados não infectados em relação ao grupo controle sem tratamento. As análises dos outros grupos não demonstraram diferenças estatísticas significantes. Na fase crônica a análise estatística também não revelou diferença significativa entre infectados. Entretanto a análise entre os mesmos grupos, considerando a evolução do tratamento para a fase crônica revelou diminuição significativa **p= 0, 0008**, no grupo tratado não infectado. A análise estatística foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes.

8.14.5 Avaliação da quantitativa das populações de CD11b no baço de camundongos suíços

A avaliação da frequência de células que expressavam o marcador CD11b entre os grupos revelou uma leve tendência ao aumento no grupo COL-T em relação ao grupo YT. A comparação entre os grupos não infectados revelou menor porcentagem no grupo TNI em relação ao grupo controle. A avaliação entre os grupos na fase crônica revelou que com a evolução da infecção a uma tendência maior na porcentagem dessas células no grupo YT em relação a todos os grupos COL-T e COL-NT, mas sem diferença estatística.

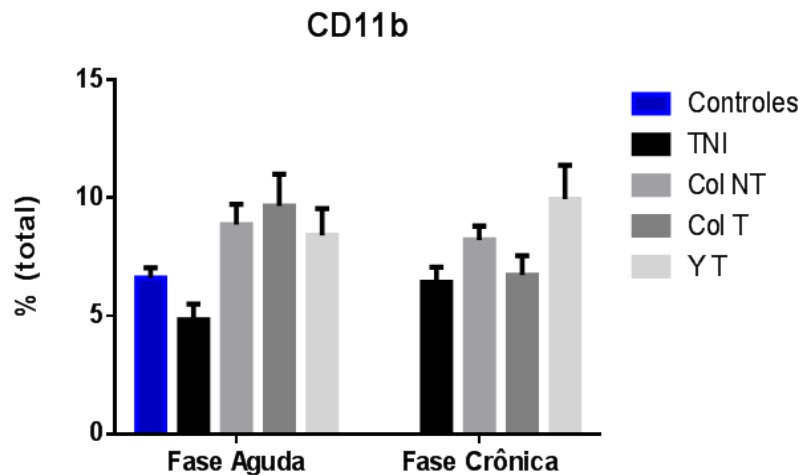


Figura 18. Análise da população de células CD11b esplênicas na fase aguda e crônica da infecção revela: leve aumento da população no grupo COL-T em relação ao YT; na fase crônica aumento no grupo YT. A análise estatística não revelou diferenças significativas em nenhum dos grupos. A análise estatística foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados relevantes.

8.14.6 Avaliação quantitativa da população de linfócitos b que expressavam o marcador B220 (CD45R), no baço de camundongos suíços

A identificação da população de linfócitos B foi feita através do marcador B220 (CD45R). A análise desta célula no baço dos animais Swiss mostrou uma redução de sua proporção tanto com o tratamento com benzonidazol, quanto com a infecção por ambas as cepas Colombianas e Y. O tratamento dos animais infectados, entretanto, não induziu alteração na proporção destas células. Por outro lado, a progressão para a fase crônica parece induzir leve aumento nos números relativos destas células, mas sem significância estatística.

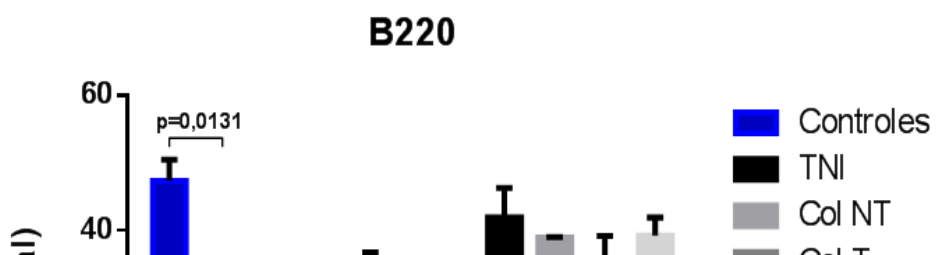


Figura 19. Frequência da população de células **B (CD220)** esplênicas. A análise dos animais não infectados mostrou diminuição significativa $p= 0,0131$ com o tratamento (TNI). O tratamento, entretanto, não induziu alteração significativa em animais infectados, tanto na fase aguda quanto na crônica. A análise estatística foi realizada com o teste *t Student bilateral*. Os valores de $p<0,05$ foram considerados relevantes.

8.15 AVALIAÇÃO DA HIPERSENSIBILIDADE TARDIA

8. 15.1 Medição da espessura da pata: cepa Y suscetível

A medição da espessura das patas representa a avaliação inflamatória através do edema em consequência a injeção intradérmica contendo antígenos do *T. cruzi* e salina tamponada PBS. A avaliação da espessura das patas no grupo representado pela cepa Y tratado demonstrou nas patas com antígenos leve diferença em todos os pontos. No ponto de 72 horas foi evidenciado um leve aumento do edema em relação aos pontos de 24 e 48 horas.

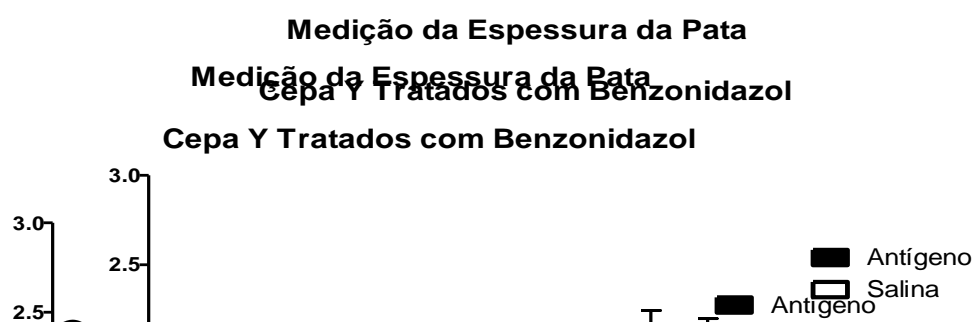


Figura 20. Medição da espessura da pata. Camundongos suíços infectados por via intraperitoneal com 10 mil formas tripomastigotas sanguícolas pela cepa Y suscetível e tratados com Benzonidazol. A avaliação estatística pelo teste não paramétrico de Mann–Whitney, não revelou diferenças significativas em nenhum dos pontos correlacionados.

8.15.2 Avaliação dos aspectos microscópicos da hipersensibilidade tardia nos animais infectados pela cepa Y e tratados com Benzonidazol

No grupo de animais infectados pela cepa Y e tratados com benzonidazol na fase crônica observou-se, com 24 horas após injeção do antígeno de *T. cruzi*, infiltrados inflamatórios discretos difusos constituídos de monucleares em tornos de anexos cutâneos. Neste tempo não foi observado no tecido conjuntivo subdérmico o envolvimento de pequenos vasos e arteríolas. Na derme observou-se infiltrado perivascular envolvendo os pequenos vasos e moderado infiltrado mononuclear difuso. A análise no tempo de **48 horas** demonstrou que havia moderada miosite e moderado infiltrado mononuclear no conjuntivo subdérmico. Na derme, foram vistos

infiltrados mononucleares em torno de pequenos vasos e focos de necrose. No tempo de **72 horas** observou-se infiltrado perivascular envolvendo os pequenos vasos e discreto infiltrado inflamatório difuso e presença de vasos congestos quadro semelhante ao tempo de 48 horas. Nos grupos controles (injeção com PBS) analisados nos tempos de 22, 48 e 72 horas após teste, não foram detectadas reações inflamatórias ou presença de alterações vasculares (lesões de arterite ou vasos congestos), apenas o edema após os respectivos tempos do teste. Os edemas estão representados no gráfico da **figura 20**. As análises histológicas dos grupos controles estão representadas na **figura 24**.

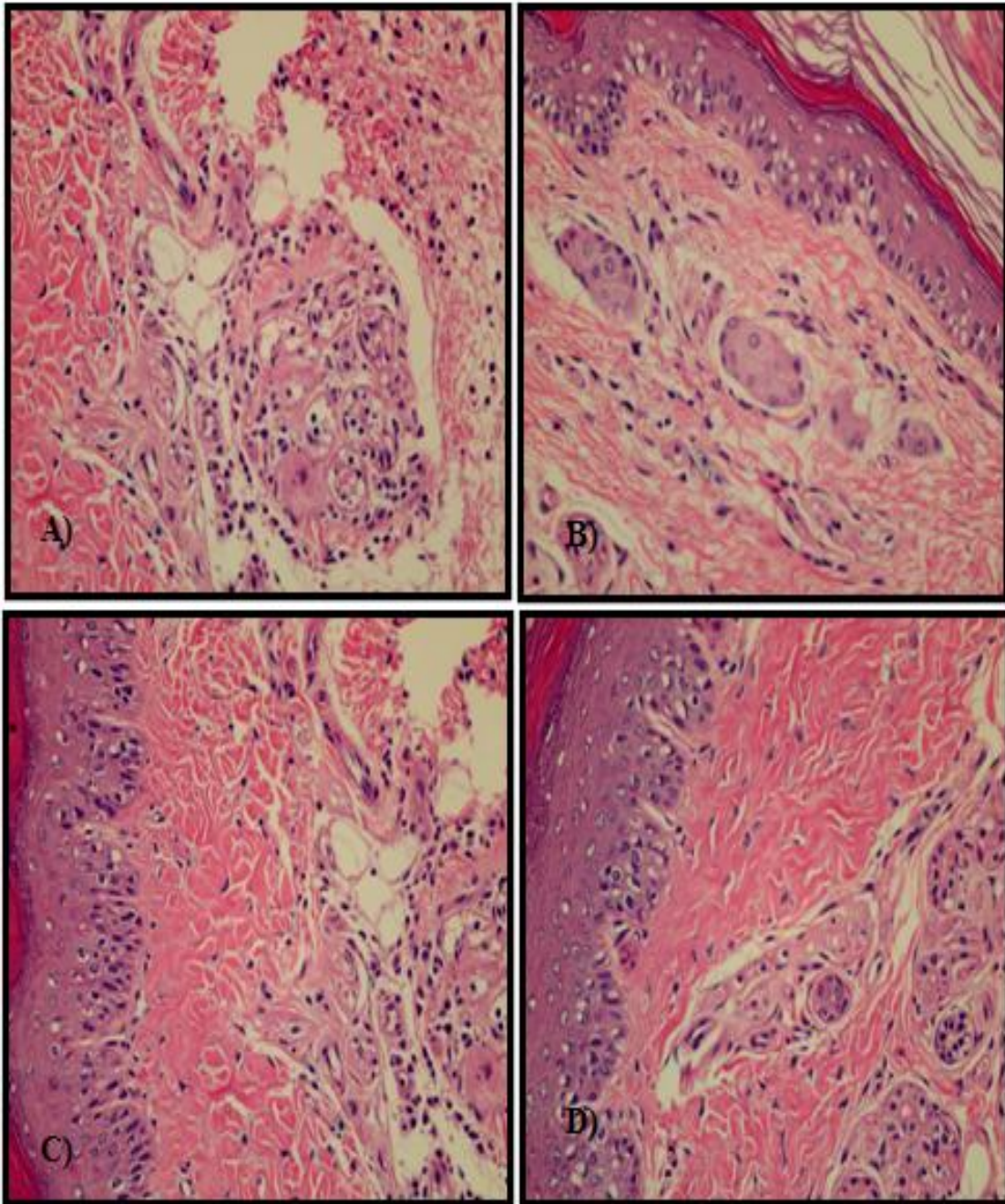


Figura 21. Secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados com a **cepa Y** e tratados com Benzimidazol no tempo de **24 horas**. **A, B (400X)**: presença de discreto infiltrado inflamatório mononuclear difuso em torno de anexos cutâneos. **C (400X)** e **D (400X)**: Infiltrados inflamatórios discretos e difusos abaixo da camada epitelial de revestimento (**400X**).

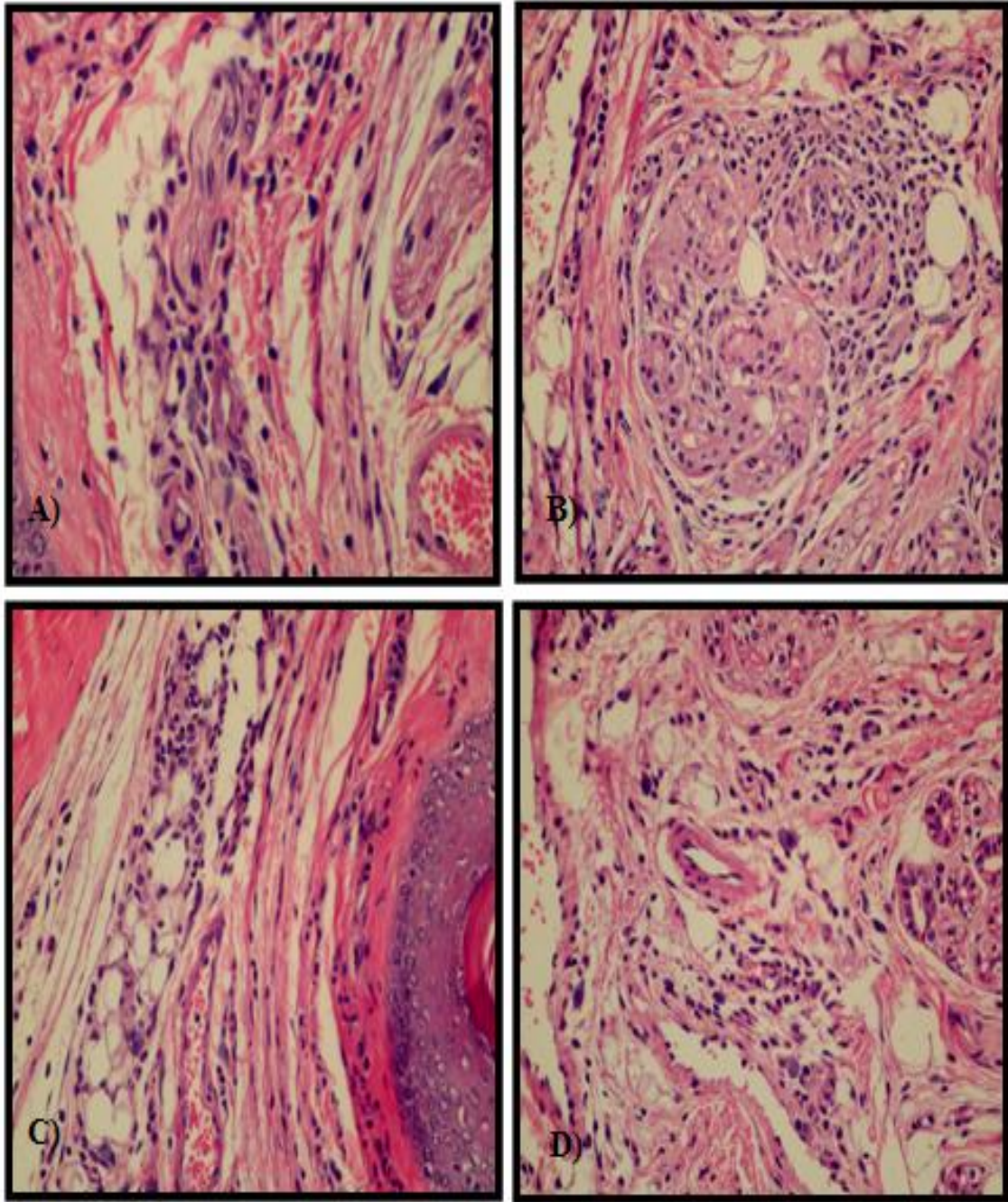


Figura 22. Secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados e com a cepa Y e tratados com Benznidazol no tempo de **48 horas**. **A (200X) e B (200X):** presença de moderado infiltrado inflamatório (++) mononuclear difuso em torno de anexos cutâneos e presença de vasos congestionados. **C (200X) e D (200X):** infiltrado inflamatório difuso e perivascular com envolvimento de pequenos vasos.

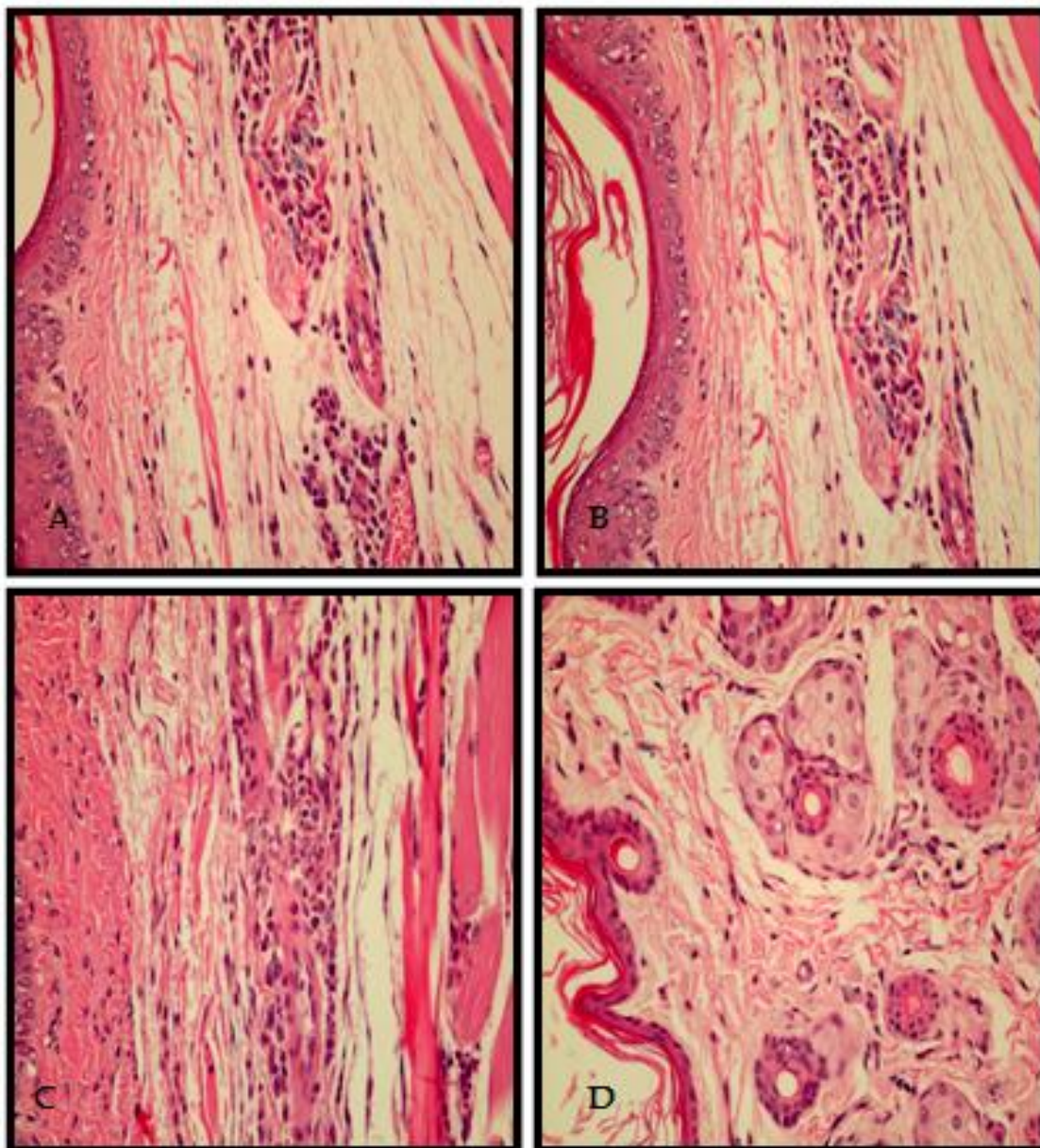


Figura 23. Secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados e com a cepa Y e tratados com Benznidazol no tempo de **72 horas**. **A (200X) e B (200X)**: presença de moderado infiltrado inflamatório mononuclear focal no tecido subepidérmico, vasos congestionados e presença de lesões de arterite. **C (200X) e D (200X)**: infiltrados inflamatórios difusos e focais por todo o tecido dérmico e no conjuntivo subdérmico.

8.15.3 Medição da espessura das patas: cepa Colombiana resistente

A medição da espessura das patas representa a avaliação inflamatória através do edema em consequência a injeção intradérmica contendo antígenos do *T. cruzi* e

salina tamponada (PBS). A avaliação da espessura das patas no grupo representado pela cepa Colombiana tratado demonstrou nas patas com antígenos leve diferença em todos os pontos em relação às patas com salina. Foi evidenciado um aumento do edma no ponto de **48 e 72 horas**. A avaliação pelo teste paramétrico t Student, não revelou diferença significativa em nenhum dos pontos avaliados.

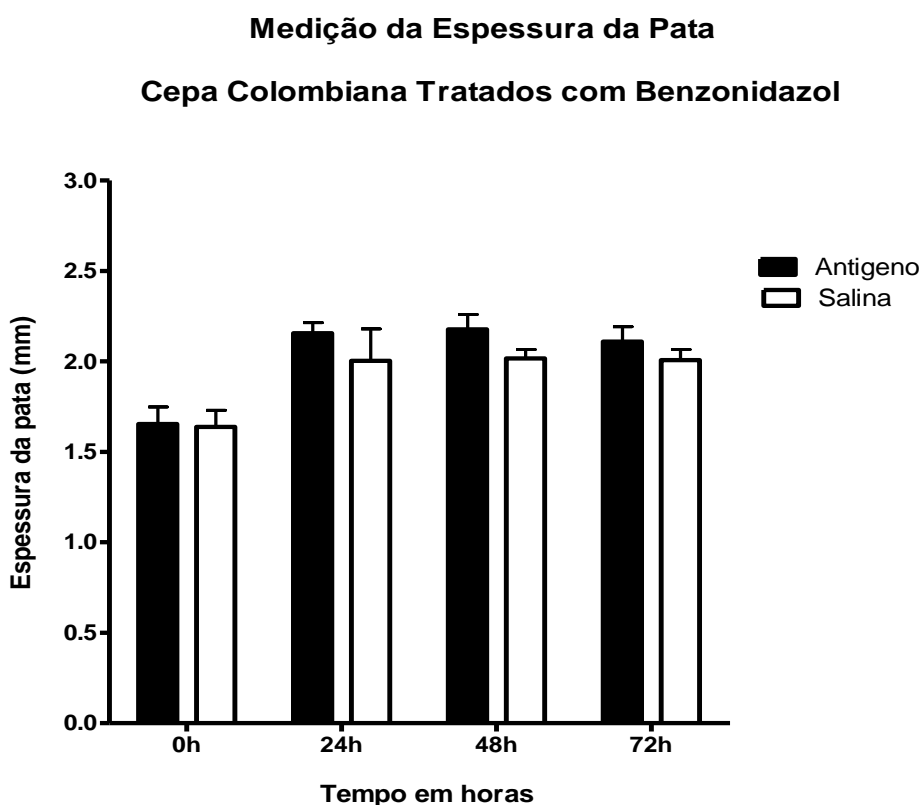


Figura 24. Medição da espessura da pata. Camundongos suíços infectados por via intraperitoneal com 10 mil formas tripomastigotas sanguícolas pela cepa Colombiana (**resistentes**) e tratados com Benzonidazol. A avaliação estatística pelo teste não paramétrico de Mann–Whitney não revelou diferenças significativas em nenhum dos pontos correlacionados.

8.15.4 Avaliação dos aspectos microscópicos da hipersensibilidade tardia nos animais infectados pela cepa Colombiana e tratados com Benzonidazol

No grupo de animais infectados pela cepa Colombiana e tratados com benzonidazol na fase crônica observou-se **24 horas** após injeção do antígeno, infiltrados inflamatórios focais (++) constituídos de polimorfonucleares que se estendem ao tecido conjuntivo subdérmico com envolvimento de pequenos vasos e arteríolas e presença de plasmócitos ao redor de anexos cutâneos. Na derme observou-se infiltrado difuso discreto perivascular. À análise no tempo de **48 horas** observou-se infiltrados focais e difusos (+++) mononucleares também foi observada moderada miosite e presença de arteriolite e vasos congestos. Na derme, foram vistos infiltrados mononucleares em torno de pequenos vasos e focos de necrose. No tempo de **72 horas** observou-se infiltrado perivascular envolvendo os pequenos vasos e discreto infiltrado inflamatório difuso e presença de vasos congestos. Nos grupos controles (injeção com PBS) não foram detectadas reações inflamatórias ou sem constituintes, apenas o edema nos tempos de 22, 48 e 72 horas pós-teste. Os edemas estão representados no gráfico da **figura 24**. A análise histológica dos grupos controles estão representadas na figura **28**.

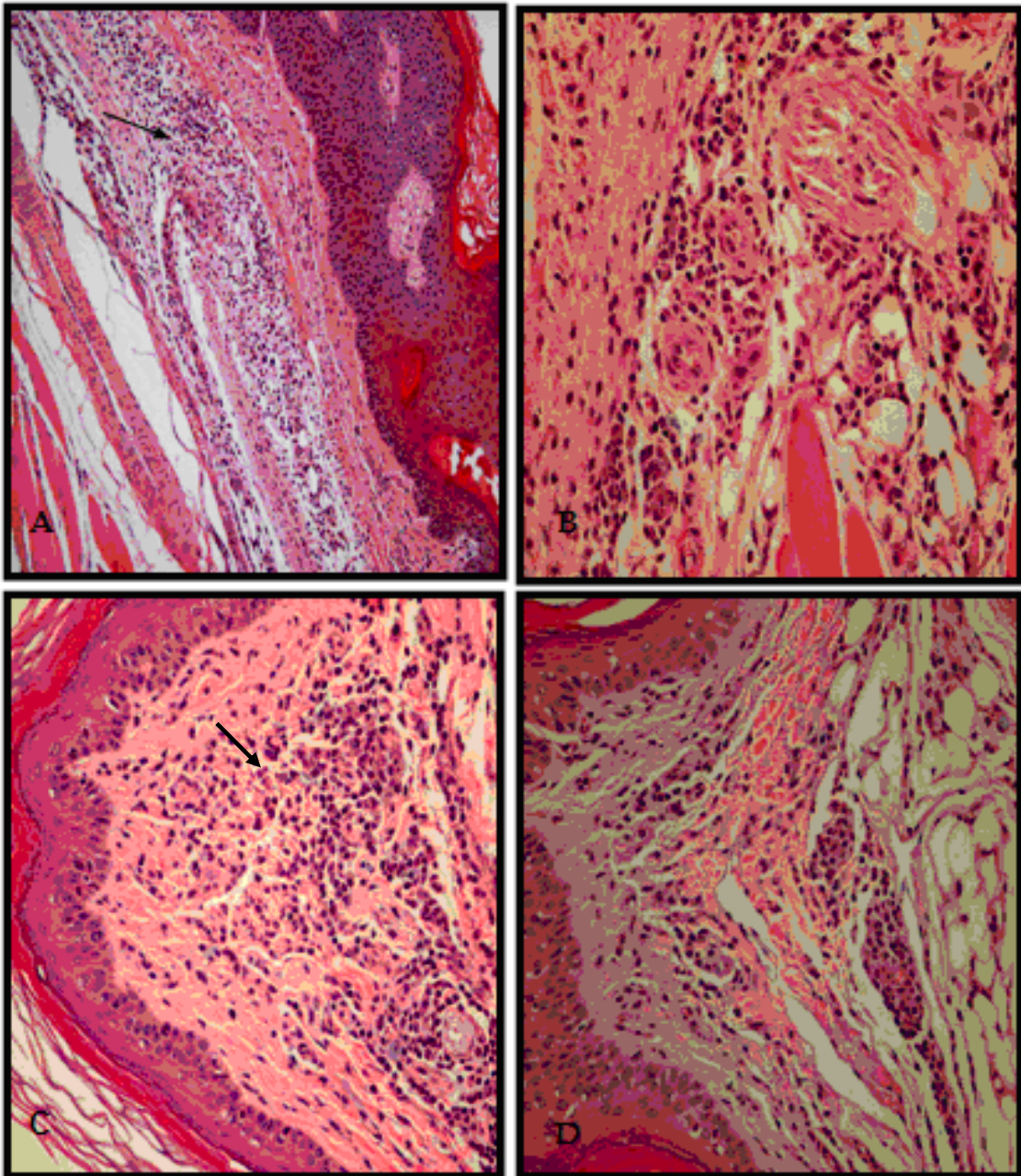


Figura 25. Secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados com a cepa **Colombiana** e tratados com Benzonidazol no tempo de **24 horas**. **A (200X)**: presença de infiltrado inflamatório mononuclear difuso (+++) em torno de anexos cutâneos. **B (400X)**: presença de moderado infiltrado inflamatório e presença de mastócitos, **C (200X)** e **D (200X)**: Infiltrados inflamatórios moderados e difusos abaixo da camada epitelial de revestimento.

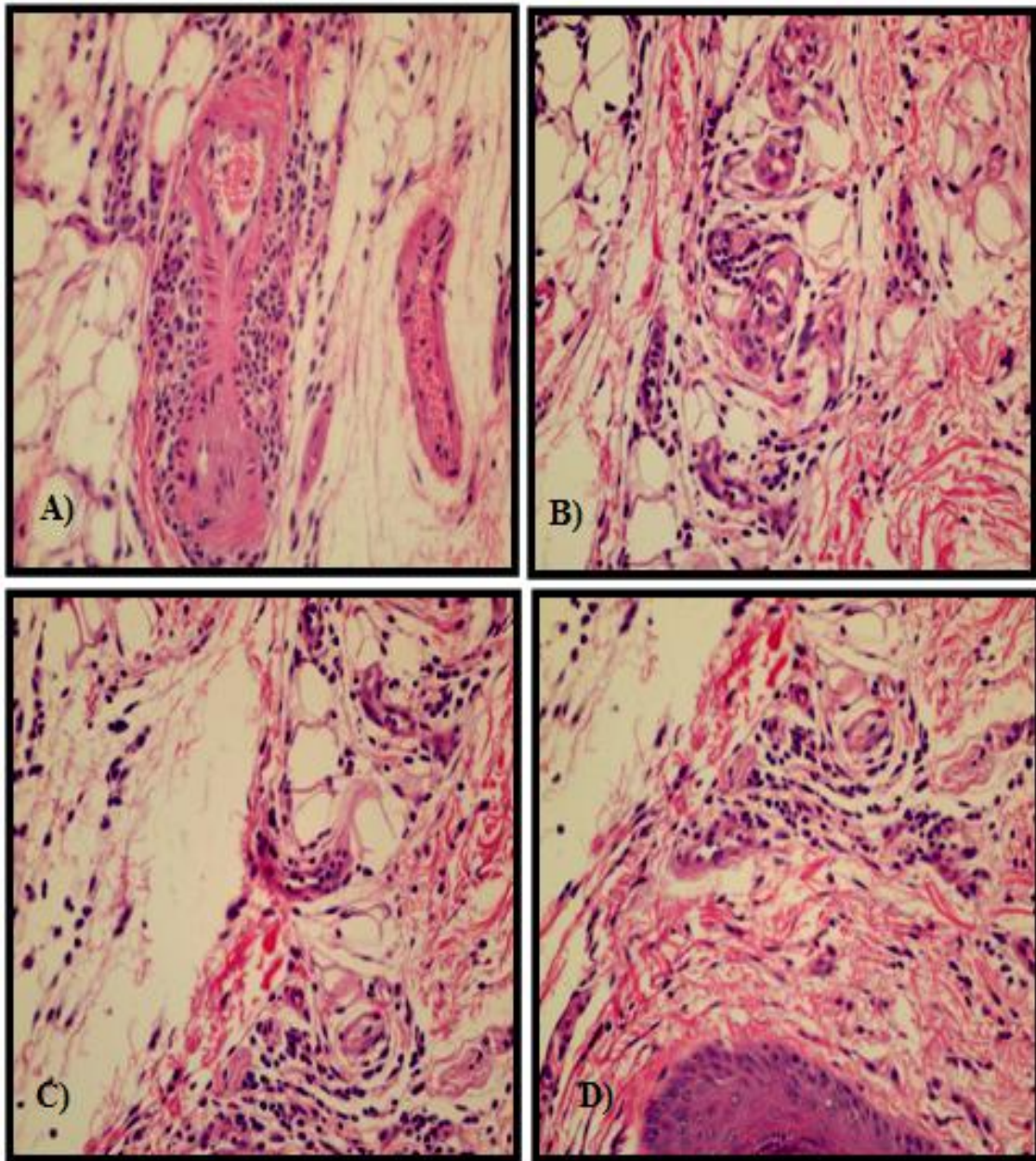


Figura 26. Secções de patas coradas pela H & E, em camundongos infectados e com a cepa **Colombiana** e tratados com Benzonidazol no tempo de **48 horas**. **A (100X) e B (400X)**: presença de infiltrado inflamatório mononuclear (++) focal no tecido subepidérmico e lesões de arterite. **C (200X) e D (200X)**: discreto infiltrado inflamatório difuso (+) ao redor de anexos cutâneos e no tecido subepidérmico.

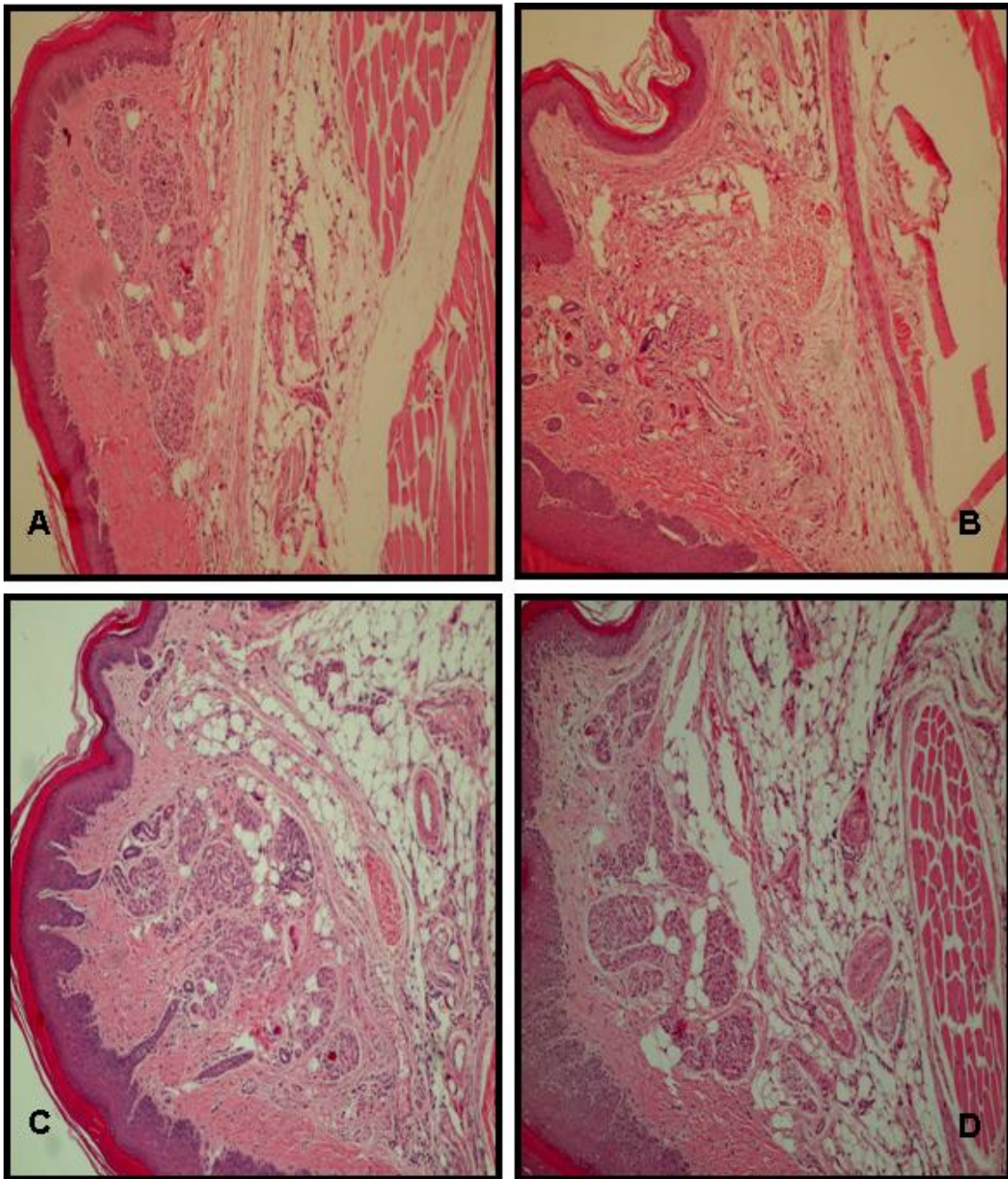


Figura 27. Secções de patas coradas pela H & E, em camundongos controles infectados pelas cepas **Y** e **Colombiana** e tratados com Benzonidazol e injetados PBS (salina tamponada). Nos cortes analisados foram detectadas reatividades como: presença de infiltrados inflamatórios, vasos congestionados e plasmócitos. **A (100X)** e **B (100X)**: cepa **Y** e **C (200X)** e **D (200X)** cepa **Colombiana**.

8.16 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

8.16.1 Avaliação histológica no miocárdio e músculo esquelético em camundongos tratados não infectados (TNI)

A avaliação do miocárdio de camundongos durante tratamento, não revelou em nenhum dos casos, processo inflamatório, necrose de miócitos ou lesões degenerativas. A avaliação dos átrios e ventrículos também não revelou alterações teciduais (**Figura A, B**). A avaliação do músculo esquelético, também não revelou nenhum tipo de alteração detectada nos cortes analisados (**Figura - C, D**).

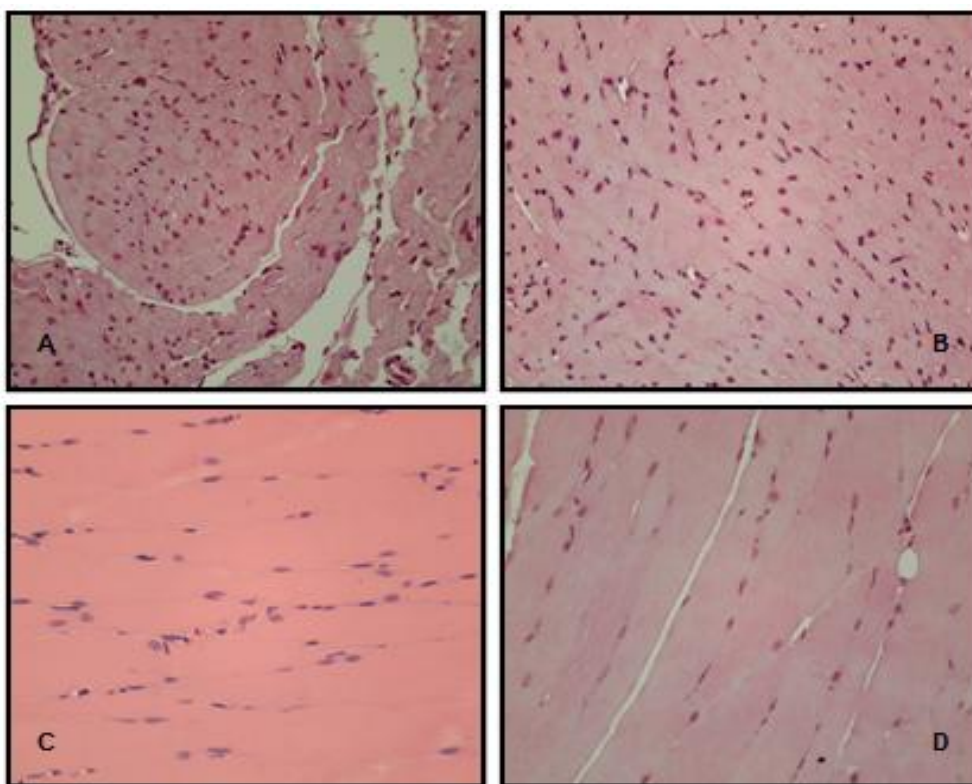


Figura 28. Secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos tratados não infectados (TNI). As figuras 28 (A) e (B), mostram secções de miocárdio e as (C) e (D) secções de músculo esquelético de camundongos normais, com estrutura preservada, sem alterações morfológicas inflamatórias ou degenerativas H & E 200X.

8.16.2 Avaliação histológica no miocárdio e músculo esquelético em camundongos controles

O estudo histológico nos camundongos controles não demonstrou nenhum tipo de alteração nos cortes de miocárdio e músculo esquelético (Figuras A e B).

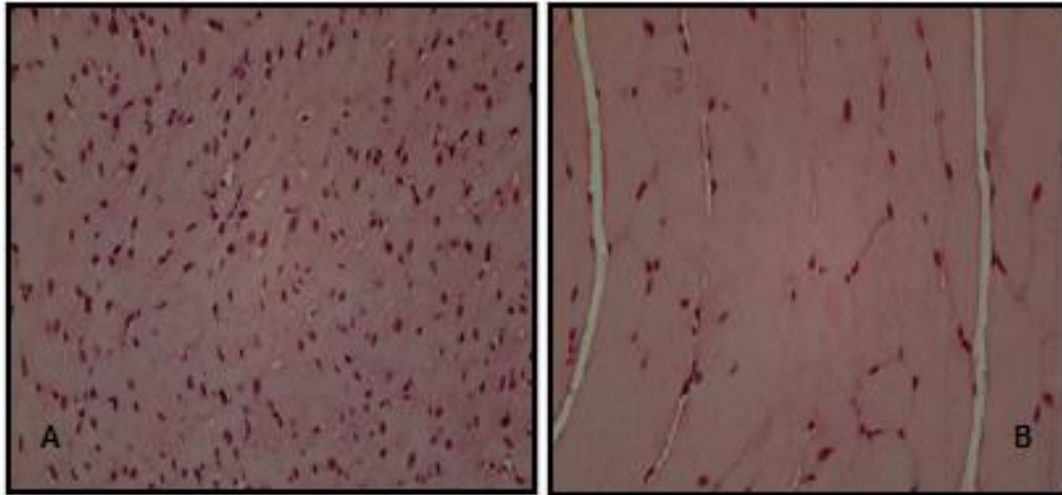


Figura 29. Secções de miocárdio e músculo esquelético em animais controles sem infecção ou tratamento intactos **(Cl)** coradas pela H & E. As figuras 29 **(A)** e **(B)**, mostram secções de miocárdio de camundongos normais, com estrutura preservada, sem alterações morfológicas inflamatórias ou degenerativas H & E – 200X.

8.16.3 Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Y (suscetível) do T. cruzi, tratados com Benzonidazol na fase aguda

O estudo do miocárdio entre o 12^o e o 20^o dia de infecção, correspondendo à fase aguda inicial nos animais infectados e tratados, revelou em 6/6 casos processo inflamatório variando de discreto (+) a moderado (++) com necrose de miócitos e substituição por infiltrado inflamatório mononuclear difuso em átrios e ventrículos **(figura 30-A,B)**. Entre o 25^o e 30^o dia de infecção, as lesões miocárdicas em 6/6 casos, tornaram-se discretas (+) com destruição de fibras cardíacas, depósitos fibrogênicos intersticiais difusos e focais e ausência de parasitos **(Figura 30- D, E)**. As lesões inflamatórias em músculo esquelético na fase inicial da infecção mostraram-se discretas (+) com infiltrados inflamatórios difusos e focais, lesões de arterite, depósitos colagênicos intersticiais e ausência de parasitos nos cortes analisados. Na fase mais tardia nos casos analisados havia miosite representada por infiltrados inflamatórios discretos (+) difusos e focais, necrose de fibras musculares e fibrose difusa e lesões de arteriolite **(Figura 30-E,F)**.

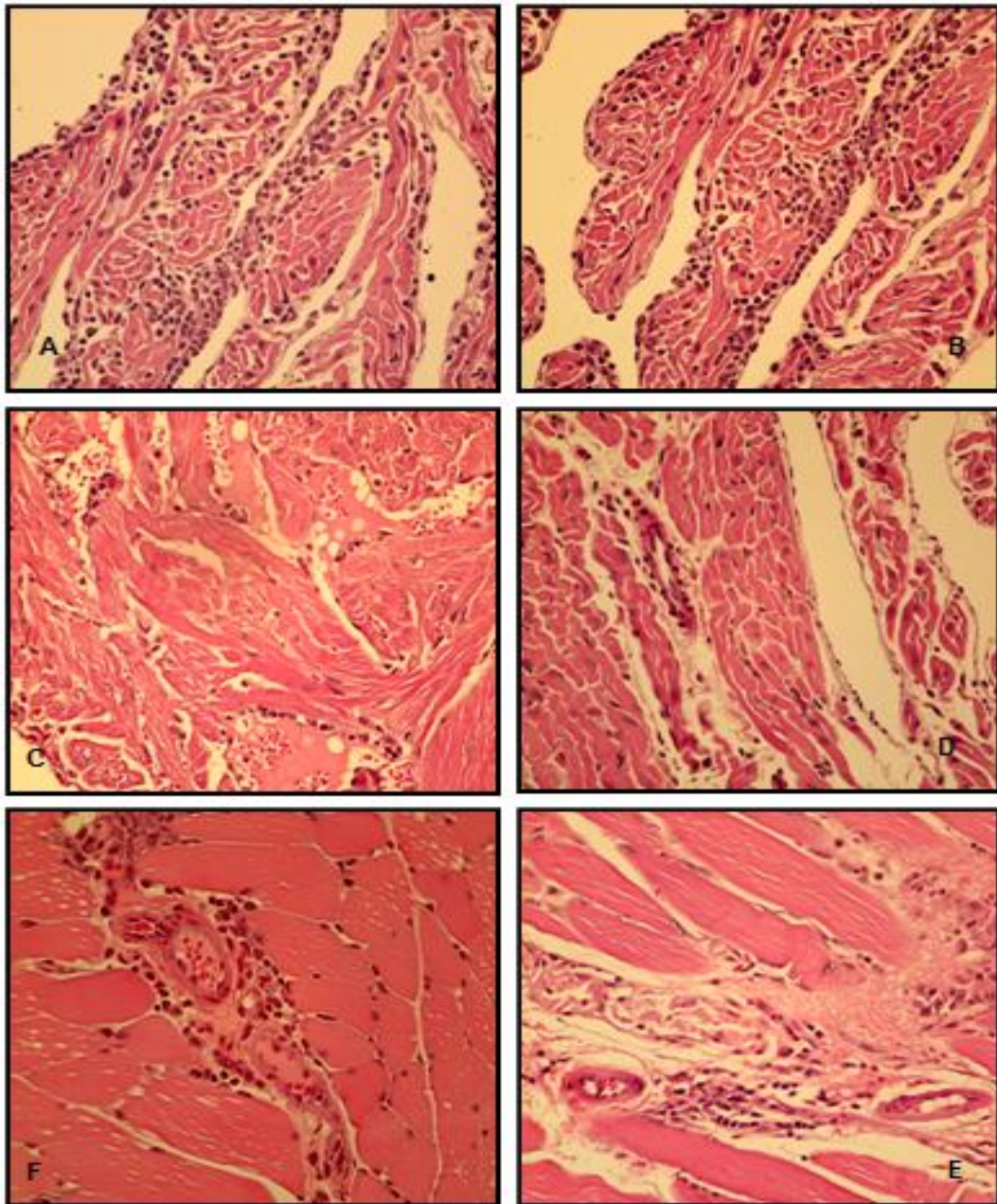


Figura 30. Secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos suíços infectados pela cepa Y e tratados com Benzonidazol na fase aguda. **A e B:** secções atriais com infiltrados inflamatórios mononucleares difusos e focais H & E – 200X; **C e D:** extensas áreas de necrose miocárdicas com lesão perivascular e presença de fibrose ventricular H & E – 200X; **F e E:** músculo esquelético com extensas necroses e lesões perivascularares H & E – 200X.

8.16.4 Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Y (suscetível) do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol na fase crônica.

Os animais cronicamente infectados com a cepa Y e tratados com Benzonidazol, entre os dias 43^o e 90^o dias de infecção em número de 15 apresentaram no miocárdio lesões inflamatórias discretas com raros infiltrados inflamatórios polimononucleares difusos em átrios na maioria dos casos 12/15. Também foram vistos depósitos colagênicos em áreas focais e finos filamentos na parede atrial, associada à presença de fibrose intersticial perivascular e depósito matricial e ausência de parasitos nos cortes analisados (**Figura 31- A,B,C e D**). O músculo esquelético apresentava miosite crônica discreta (+), com infiltrados inflamatórios focais e perivasculares, arterite presença de células adiposas. Foram também observadas áreas de miosite e de fibrose intersticial difusa e perivascular e áreas focais de fibrose. Não foi observada a presença de parasitismo nos casos estudados. No miocárdio foram vistos depósitos colagênicos em áreas difusas e focais associada à presença de fibrose intersticial perivascular e depósito matricial tanto na região atrial como nas áreas ventriculares. No músculo esquelético também foi detectada fibrose intersticial difusa e perivascular moderada. Em todos os casos selecionados a fibrose foi confirmada pelo Picro-sirius (**Figura 31- E, F**).

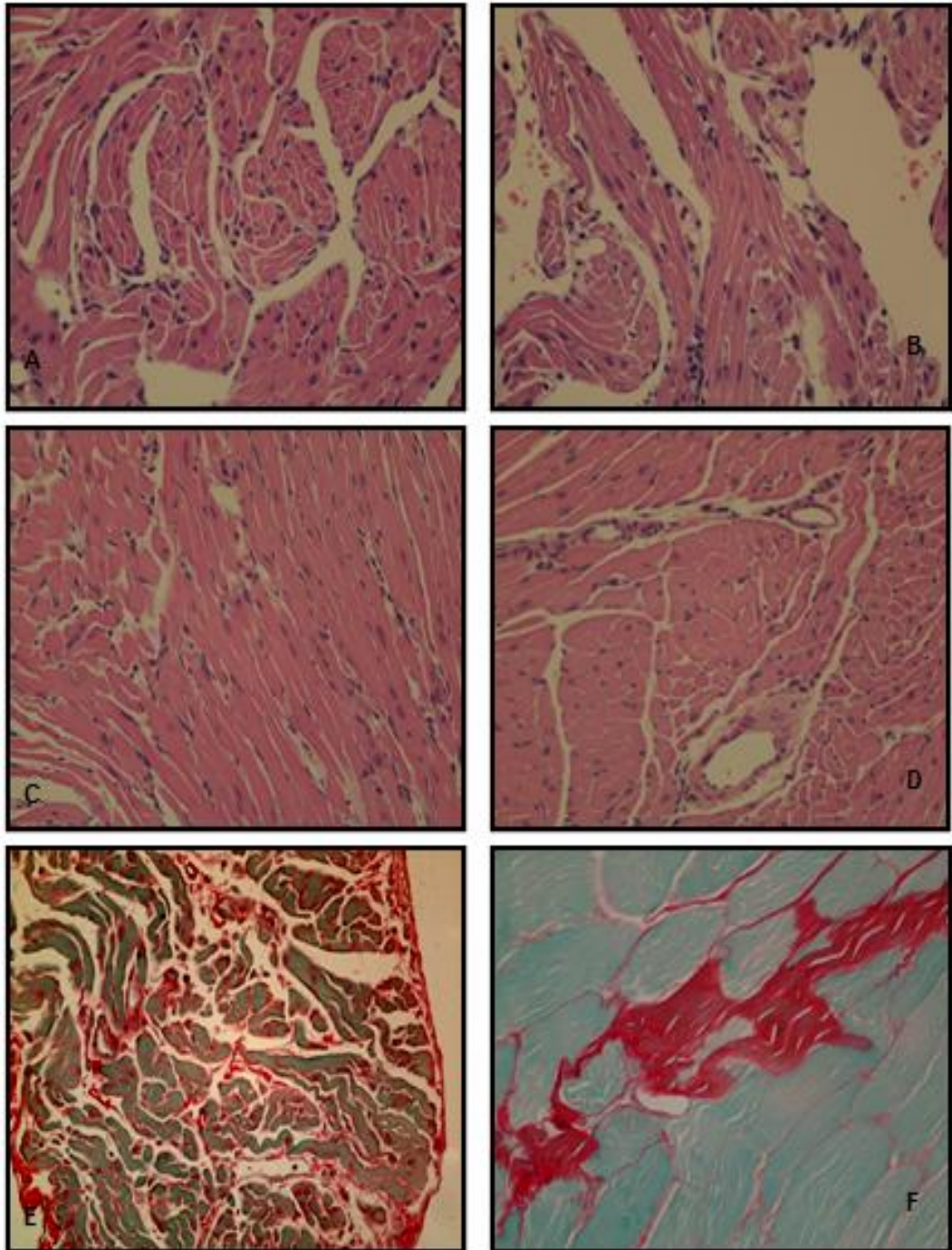


Figura 31. Secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Y e tratados com Benzonidazol na fase crônica. **A e B:** secções atriais com discretos infiltrados inflamatórios mononucleares difusos H & E – 200X; **C e D:** áreas ventriculares com infiltrados difusos com lesão perivascular e presença de fibrose ventricular H & E – 200X; secções de miocárdio e de músculo esquelético corados pelo Picro-sirius red 200X, **F:** depósitos colagênicos difusos, com finos filamentos na parede atrial e feixes colagênicos delimitando às miocélulas cardíaca **E:** músculo esquelético fibrose intersticial difusa e focal.

8.16.5 Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana (resistente) do *T. cruzi*, não tratados com Benzonidazol na fase aguda

A avaliação do miocárdio entre o 20^o e o 25^o dia de infecção, revelou em 2/6 casos processo inflamatório variando de intenso a moderado com necrose de miócitos e substituição por infiltrados inflamatórios de polimionucleares difusos e focais em átrios e ventrículos e presença de parasitos (**figura 32-A,B**). O estudo entre o 30^o e 35^o dia de infecção no miocárdio, demonstrou lesões necróticas inflamatórias em variaram de intensas a moderadas 2/6 casos com destruição de fibras cardíacas, e raros parasitos (**Figura 32- C, D**). A avaliação do músculo esquelético entre o 20^o e 30^o dia de infecção, revelou infiltrados inflamatórios difusos (++) e focais (++) que variaram de intensas a discretas 2/6 e, lesões de arterite. Também não foram evidenciados parasitos nos cortes analisados. Na fase mais tardia (25^o e 35^o dias) em 4/6 casos analisados havia infiltrados inflamatórios difusos e focais variando de moderados (++) a intensos (+++), necrose de fibras musculares, depósitos colagênicos e lesões de arterite (**Figura 32- E,F**).

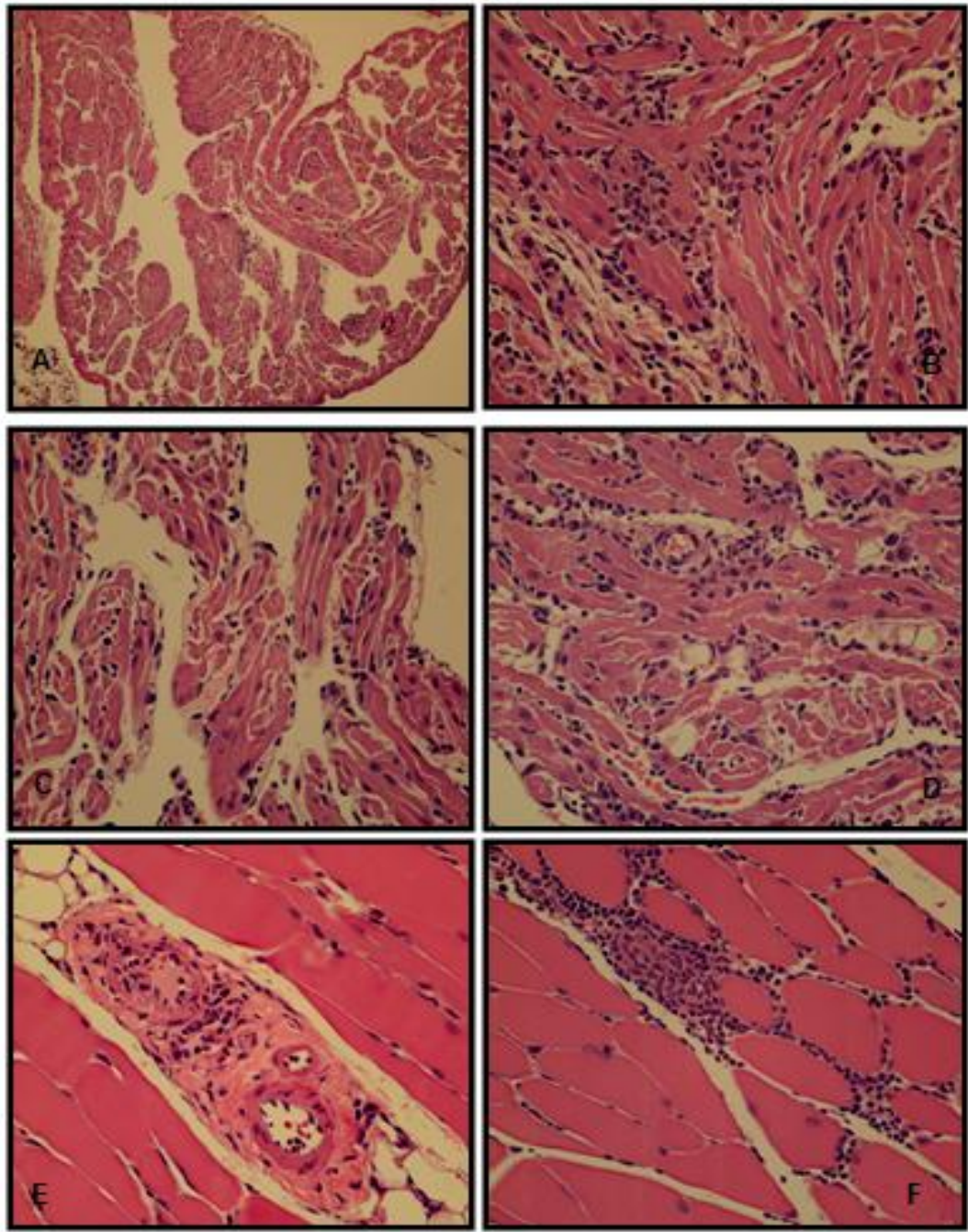


Figura 32. Secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Colombiana não tratados com Benzonidazol na fase aguda. **A:** visão panorâmica da região atrial com infiltrado inflamatório mononuclear H & E - 200X; **B:** áreas focais de destruição de miócitos com infiltrado inflamatório intersticial H & E - H & E - 200X; **C e D:** infiltrado inflamatório mononuclear difuso na região atrial com presença de necrose de miocélulas e presença de células adiposas H & E - 200X; **E:** músculo esquelético com extensa lesão inflamatória Peri-vascular e processo de arteriolite H & E - 200X; **F:** músculo esquelético com infiltrado inflamatório focal e difuso intersticial H & E - 200X.

8.16.6 Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana (resistentes) do *T. cruzi*, não tratados com Benzonidazol na fase crônica.

Os animais cronicamente infectados com a cepa Colombiana após 48 dias de infecção em número de seis (6) apresentaram no miocárdio lesões inflamatórias discretas a moderadas (+) com infiltrado inflamatório mononuclear difuso e focal 3/6 casos analisados. Também foram vistos depósitos colagênicos em áreas focais e finos filamentos na parede atrial, associada à presença de fibrose intersticial perivascular e depósito matricial **(Figura 33-A)**. O músculo esquelético apresentava miosite crônica variando entre discreta a moderada, com infiltrados inflamatórios focais e perivasculares, arterite e presença de células adiposas **(Figura 33-B)**. Foram também observadas áreas de fibrose intersticial difusa e perivascular (++), e áreas focais de fibrose. Não foi observado a presença de parasitismo nos casos estudados. No miocárdio foram vistos depósitos colagênicos em áreas difusas e focais associada à presença de fibrose intersticial perivascular e depósito matricial tanto na região atrial como nas áreas ventriculares. **(Figura 34-C,D)**. No músculo esquelético também foi detectada fibrose intersticial difusa e perivascular moderada, miosite difusa (++), presença de células adiposas e lesões de arteriolite. Em todos os casos selecionados a fibrose foi confirmada pelo Picrosirius **(Figura 33-E,F)**.

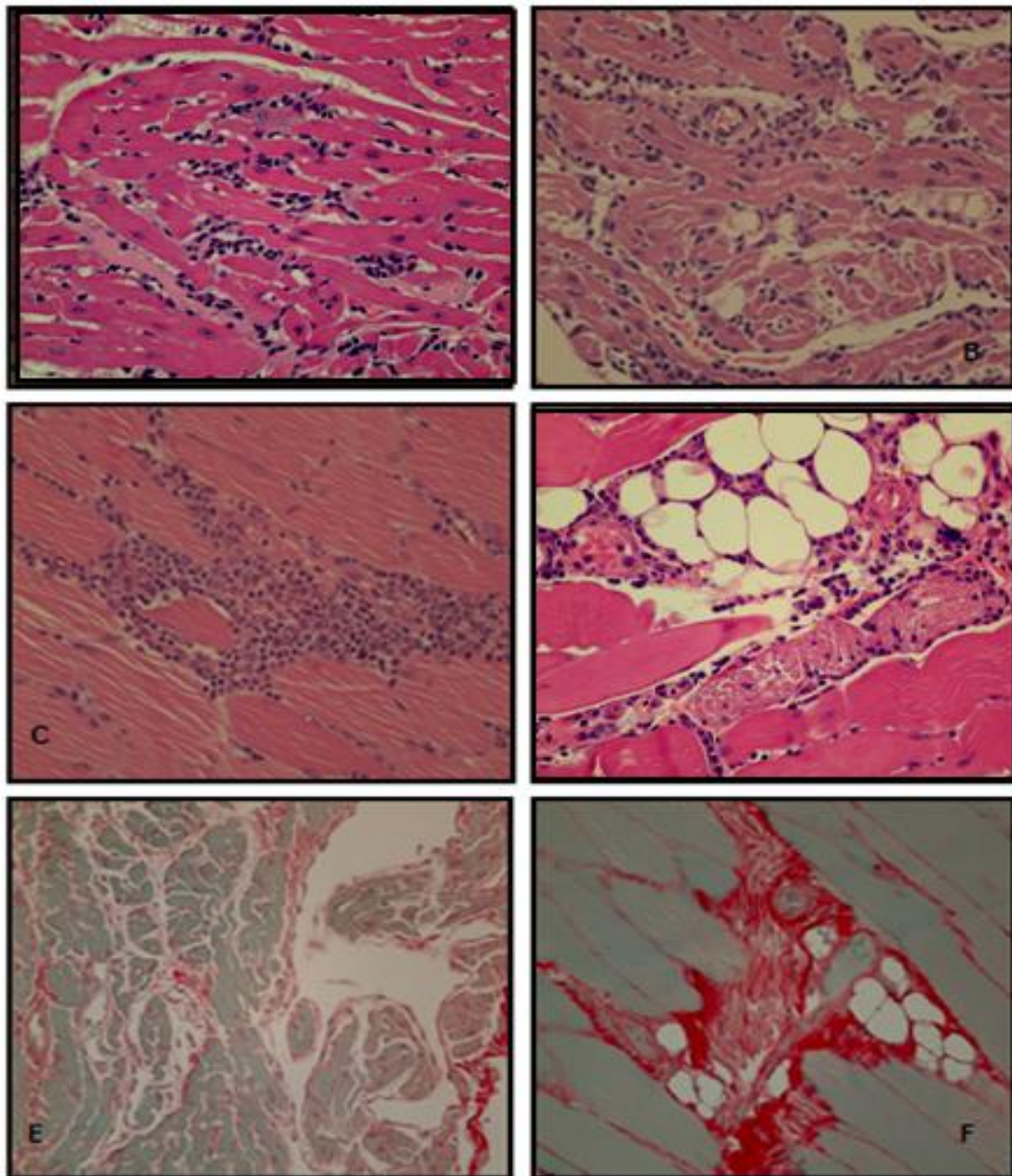


Figura 33. Secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E e, por Picro-sirius red em camundongos infectados pela cepa Colombiana não tratados com Benzonidazol na fase crônica. **A e B** H & E - 200X: infiltrados inflamatórios difusos, com áreas de destruição de miocélulas; **C**: extenso infiltrado inflamatório focal em músculo esquelético H & E - 200X; **D**: músculo esquelético com lesão inflamatória Peri-vascular e processo de arteriolite, com infiltração e oclusão da luz vascular, e presença de células adiposas H & E - 200X; **F**: depósitos colagênicos difusos, com finos filamentos na parede atrial e feixes colagênicos Picro-sirius red 200X; **E**: músculo esquelético apresentando extensa área de fibrose intersticial difusa e focal e presença de células adiposas Picro-sirius 200X.

8.16.7 Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana (resistente) do T. cruzi, tratados com Benzonidazol na fase aguda

A avaliação do miocárdio entre o 20^o e o 25^o dia de infecção, revelou em 2/6 casos processo inflamatório discreto (+) com necrose de miócitos e substituição por infiltrados inflamatórios de polimionucleares difusos e focais em átrios e ventrículos **(figura 34-A, B)**. O estudo entre o 30^o e 35^o dia de infecção no miocárdio, demonstrou lesões necróticas inflamatórias moderadas 3/6 casos com destruição de fibras cardíacas, e raros parasitas **(Figura 34- C, D)**. A avaliação do músculo esquelético entre o 20^o e 30^o dia de infecção, revelou infiltrados inflamatórios difusos e focais que variaram de discretas a moderados (++) 3/6 e, lesões de arterite. Não foram evidenciados parasitas nos cortes analisados. Na fase mais tardia (25^o e 35^o dias) em 4/6 casos analisados havia infiltrados inflamatórios difusos e focais variando de moderados (++) a intensos (+++), necrose de fibras musculares, depósitos colagênicos e lesões de arterite **(Figura 34- E,F)**.

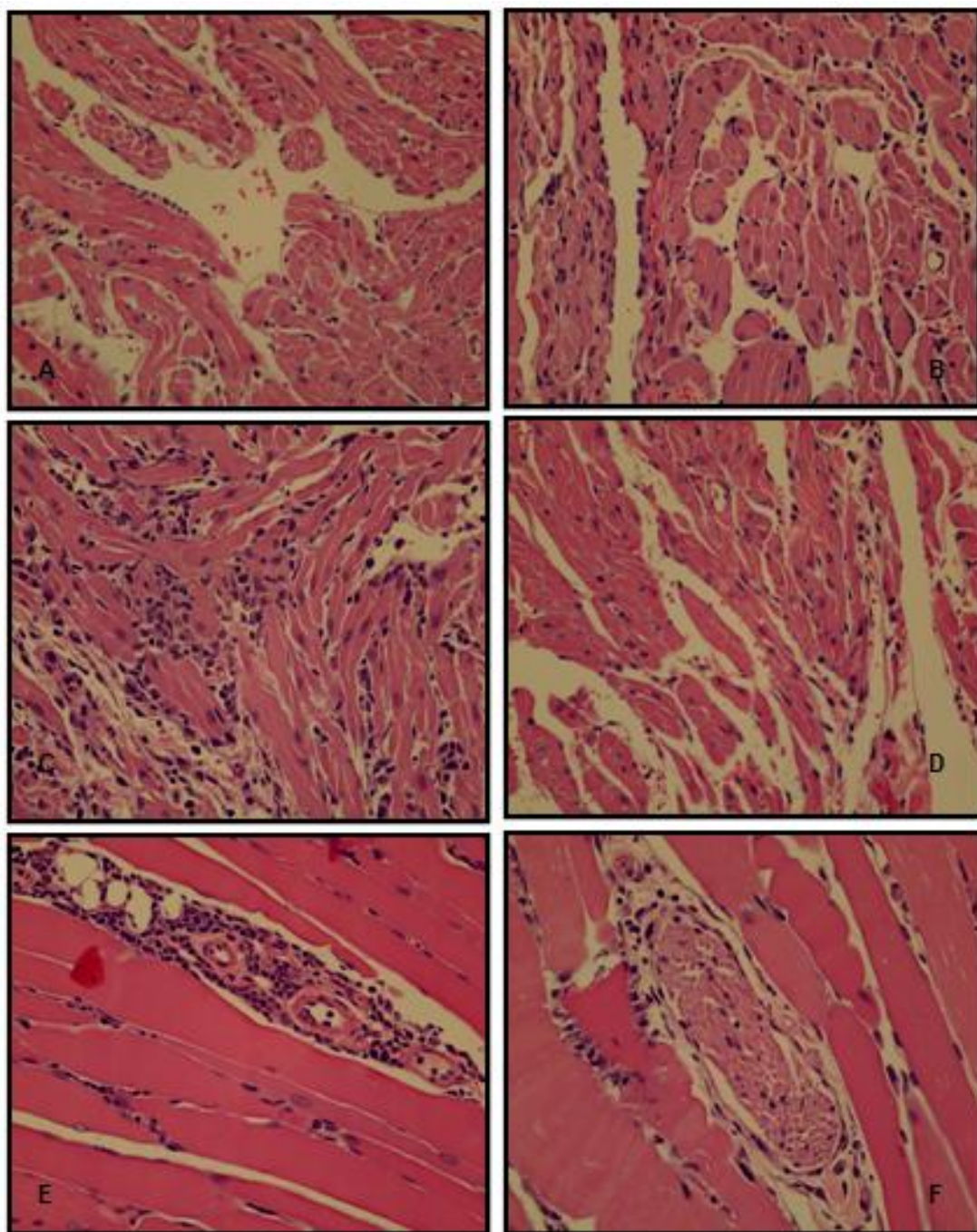


Figura 34. Secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E, em camundongos infectados pela cepa Colombiana tratados com Benzonidazol na fase aguda. A e B: região atrial com discreto infiltrado inflamatório difuso e presença plasmócitos H & E - 200X; C e D: áreas focais de destruição de miócitos com infiltrado inflamatório moderado na região ventricular H & E - 200X; E: lesão inflamatória perivascular com destruição das fibras musculares e presença de células adiposas H & E - 200X; F: músculo esquelético com áreas de necrose hialina, infiltrados inflamatórios difusos e lesão de arterite H & E - 200X.

8.16.8 Avaliação da resposta inflamatória no miocárdio e músculo esquelético em animais infectados com a cepa Colombiana (resistentes) do *T. cruzi*, tratados com Benzonidazol na fase crônica.

Os animais cronicamente infectados com a cepa a cepa Colombiana após 48 dias de infecção em número de seis (6) apresentaram no miocárdio lesões inflamatórias discretas (+) com infiltrados inflamatórios mononucleares difusos 4/6 casos analisados. No miocárdio foram vistos depósitos colagênicos em áreas difusas e focais associada à presença de fibrose intersticial perivascular e depósito matricial tanto na região atrial como nas áreas ventriculares. Também foram vistos depósitos colagênicos em áreas focais e finos filamentos na parede atrial, associada à presença de fibrose intersticial perivascular e depósito matricial **(Figura 35-A,B)**. O músculo esquelético apresentava miosite crônica variando entre discreta a moderada (++) , com infiltrados inflamatórios focais e perivasculares, arterite 2/6 casos e presença de células adiposas. Foram também observadas áreas de fibrose intersticial difusa e perivascular (++) , e áreas focais de fibrose, não sendo observado a presença de parasitismo nos casos estudados **(Figura 35-C,D)**. Em todos os casos selecionados a fibrose foi confirmada pelo Picro-sirius **(Figura 35-E,F)**.

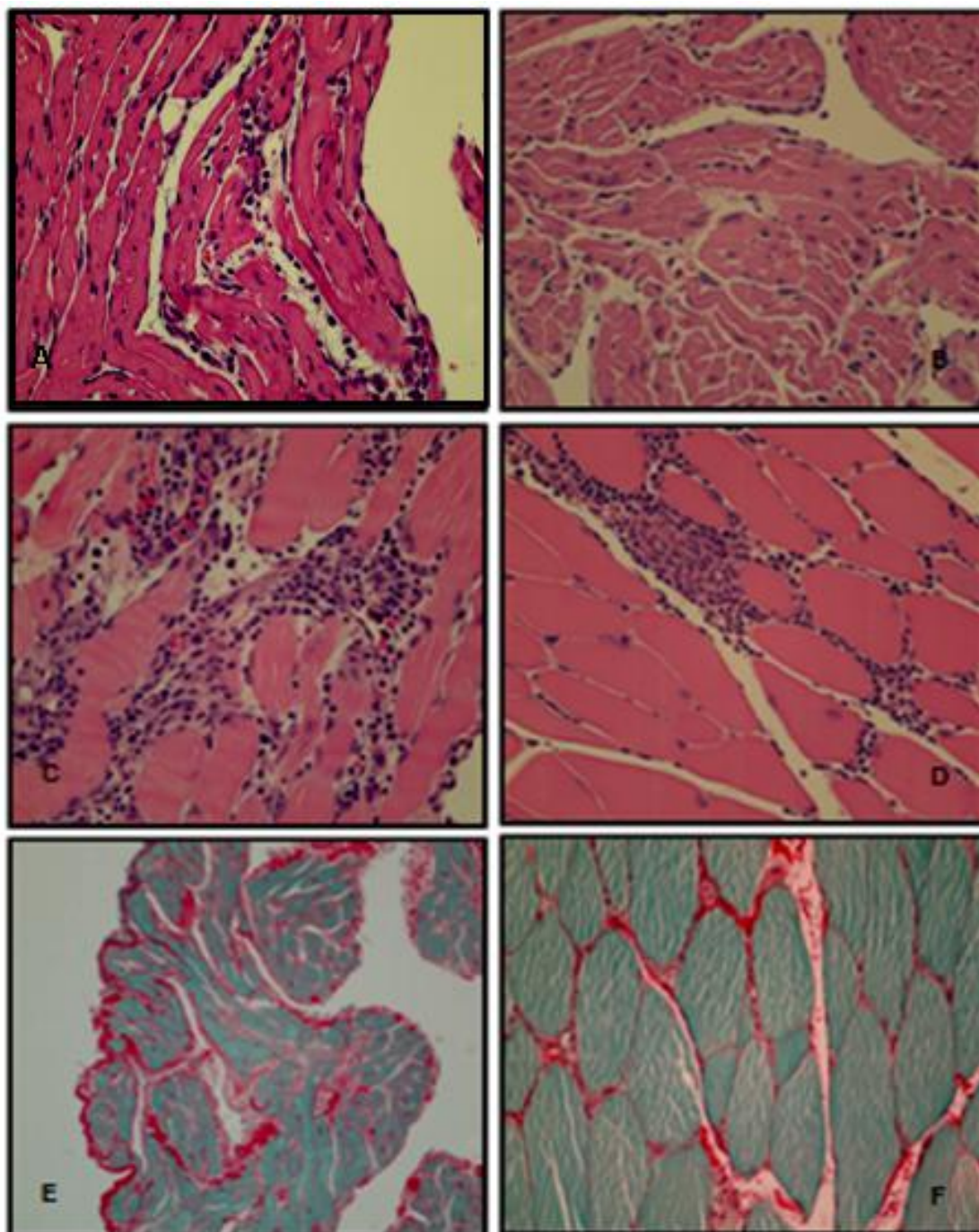


Figura 35. Secções de miocárdio e músculo esquelético coradas pela H & E e Picro-Syris, em camundongos infectados pela cepa Colombiana tratados com Benzonidazol na fase crônica. **A e B:** região atrial com discreto infiltrado inflamatório difuso H & E - 200X; **C e D:** infiltrados inflamatórios difusos e focais e presença de necrose hialina H & E - 200X; **E:** depósitos colagênicos difusos em áreas da parede atrial, Picro-siriús 100X; **F:** com áreas músculo esquelético apresentando áreas de fibrose intersticial difusa Picro-siriús 200X.

9. DISCUSSÃO

Estudos longitudinais, clínicos e experimentais, realizados por vários autores têm revelado que a manutenção da infecção experimental e humana pelo *T. cruzi* é multifatorial, onde cerca de 20% a 30% dos indivíduos infectados (camundongos ou humanos) evoluem para uma forma crônica cardíaca, sendo muitos dos fatores imunoregulatórios responsáveis por tal fenômeno, ainda são desconhecidos (ANDRADE, 1999; LAGUENS *et al.*, 1999; ANIS RASSI e MARIN-NETO, 2000; SATHLER-AVALAR *et al.*, 2009).

Diferentes modelos experimentais já foram utilizados no intuito de investigar mecanismos imunoregulatórios na infecção experimental pelo *T. cruzi*, ligados à resistência/susceptibilidade a infecção. Diversos estudos chamam a atenção para o papel sinérgico entre o tratamento com benzonidazol (*N*-benzyl-2-nitroimidazole acetamida) a resposta imunológica, mecanismos imunomodulatórios e homeostasia de subpopulações celulares (FERNÁNDEZ-VILLEGAS *et al.*, 2011; MURTA *et al.*, 1999; OLIVEIRA-BAHIA *et al.*, 2000; OLIVIERI *et al.*, 2002; OLIVIERI *et al.*, 2005 OLIVIERI *et al.*, 2010).

Estudos sobre a quimioterapia na doença de Chagas têm demonstrado nítidas diferenças de suscetibilidade/resistência ao Benzonidazol, utilizando diferentes cepas do *T. cruzi*. As essas variações já foram anteriormente caracterizadas pelo nosso grupo e relacionadas com os diferentes biotopos. Estes estudos caracterizaram as cepas de Tipo I (Y e Peruana) como de alta suscetibilidade, as de Tipo II (cepas de São Felipe e Mambai) como de média suscetibilidade e as de Tipo III (Colombiana e Montalvânia) como de alta resistência. (ANDRADE *et al.*,

1985a; CAMANDAROBA *et al.*, 2001; CAMANDAROBA *et al.*, 2004; CAMPOS *et al.*, 2005).

Na presente investigação buscamos compreender a influência do tratamento com o Benzonidazol (Benz) sobre a resposta imunológica em camundongos infectados com cepas do *Trypanosoma cruzi* de diferentes Biodemas, suscetíveis e resistentes ao quimioterápico. Para essa avaliação infectamos camundongos Swiss não isogênicos e tratamos com 60 doses do fármaco Benzonidazol. Animais não infectados e tratados, e animais controles sem tratamento também compuseram nossa investigação para servir de grupo comparativo.

Deste modo a investigação para o referido estudo foi conduzida, tendo como alvo avaliar a influência do Benz sobre os mecanismos imunoregulatórios, na infecção experimental com as cepas Y e Colombiana do *T. cruzi*. Os resultados do presente trabalho permitiram demonstrar a influência do tratamento com Benz na resposta imunológica quando correlacionamos os resultados dos diversos grupos experimentais submetidos e não submetidos ao tratamento quanto: à parasitemia, taxa de mortalidade, intensidade das lesões necrótico-inflamatórias do miocárdio e de músculo esquelético, concentração plasmática de anticorpos, quimiocina e citocinas, resposta celular através do teste cutâneo de hipersensibilidade tardia utilizando antígenos do *T. cruzi*, e da quantificação de subpopulações celulares associadas à resposta imunológica na doença de Chagas experimental no modelo murino.

A taxa de mortalidade dentro dos vários grupos variou paralelamente com as curvas parasitêmicas, sendo menos elevadas na cepa Y tratada. Essa baixa

mortalidade (11%) no grupo tratado e de alta mortalidade 100% nos não tratados, apresentada pela cepa suscetível ao quimioterápico, foi concordante com os dados da literatura e, de estudos anteriores do nosso grupo (ANDRADE *et al.*, 2006; ANDRADE *et al.*, 2008). O grupo representado pela cepa Y submetido ao tratamento, o qual apresentou menor parasitemia e menor índice de mortalidade durante todo o decurso da infecção, foi também a que apresentou na fase aguda da infecção maior expressão fenotípica das células CD4+ e CD8+ efetoras em relação aos animais infectados com a cepa Colombiana tratados e não tratados ainda que não tenha sido estatisticamente significativa. Entretanto, quando comparamos com o grupo não infectado e tratado, os dados revelaram uma tendência de diminuição das quantidades relativas de células T CD4+ e CD8+ com a infecção para ambas as cepas (Colombiana e Y) e, no grupo controle sem tratamento. Estudos anteriores já demonstraram o importante papel dessas populações celulares no controle da carga parasitária na fase aguda e crônica e, na sobrevivência de camundongos infectados pelo *T. cruzi* (ALBAREDA *et al.*, 2006; OLIVIERI *et al.*, 2005; MARTIN *et al.*, 2010; SUN e TARLETON *et al.*, 1998). O estudo da influência dessas populações celulares em animais (*nude*) revelou incapacidade de controlar a infecção, alta carga parasitária e morte precoce dos animais (KIERSZENBAUM e PIZZIMENTI, 1979).

TARLETON *et al.* (1992), estudando o papel das células CD8+ em camundongos deficientes para essa população celular, demonstraram alta parasitemia e mortalidade nesses animais. PADILLA *et al.* (2010), estudando o papel das células T CD4+ e T CD8+, em camundongos C57BL/6 demonstraram que as células T CD8+ estavam participando de maneira efetiva na imunidade celular mesmo na ausência de células T CD4+. PORTELLA & ANDRADE, 2013, avaliando a

participação das células dendríticas em camundongos de diferentes linhagens, resistentes e suscetíveis à infecção pela cepa Colombiana, demonstraram ser a maior expansão de linfócitos T CD4+ no baço e nos tecidos, um fator responsável pela maior resistência dos camundongos DBA/1 à infecção experimental. A literatura não é concordante sobre a principal célula (CD4+ ou CD8+) responsável pela resistência à infecção experimental pelo *T. cruzi*. Assim, pode-se afirmar que mesmo havendo diferenças na predominância fenotípica de células T CD8+ ou células T CD4+, é necessária a presença dessas duas populações durante a infecção pelo *T. cruzi*, para que haja uma resposta imune efetora, pois, é sabido que as células T, independentemente da população desempenham importantes funções relacionadas resistência/susceptibilidade à infecção (ALBAREDA *et al.*, 2006; ARAUJO *et al.*, 1989; CARDILLO *et al.*, 2007; PADILLA *et al.*, 2004; PADILLA *et al.*, 2009; PEREZ *et al.*, 2012; RIBEIRO DOS SANTOS *et al.*, 2001; TEIXEIRA *et al.*, 2002).

Em revisão sobre o controle genético da infecção pelo *T. cruzi*, De TITTO (1994), chama a atenção que, embora a resposta imune tenha importante papel na resistência e susceptibilidade à infecção, a sobrevivência das diferentes linhagens de animais está intrinsecamente mais relacionada com o padrão genético de cada espécie, do que com os produtos dos locus H-2 (sistema de antígenos de histocompatibilidade do camundongo). Desta forma, a resistência do camundongo à infecção aguda pelo *T. cruzi* é governada por múltiplos componentes genéticos, e por diversos circuitos imunológicos dentro e fora do H-2 (PADILLA *et al.*, 2007; MARTIN *et al.*, 2010). Pela análise dos nossos resultados quanto à parasitemia e mortalidade, podemos inferir que os animais quando tratados com Benz diminuem a carga parasitária e, conseqüentemente aumentam a expansão e a eficácia dos

mecanismos efetores das células CD4+ e CD8+ tanto na fase aguda como na fase crônica, o que conseqüentemente proporcionou as menores taxas de mortalidade e parasitemia na cepa suscetível.

Em paralelo, quando correlacionamos a celularidade do baço (Fig 13), com as populações celulares (CD4+ / CD8+ e B, Fig 14 e 15) percebemos uma hiperplasia em todos os grupos infectados na fase aguda da infecção, porém sem nenhuma diferença estatística significativa entre os animais infectados com as cepas Y e Colombiana, o que confirmam ser a infecção pelo *T. cruzi*, responsável por uma ativação policlonal na fase inicial da infecção. Vários estudos demonstraram que na infecção de camundongos por *T. cruzi*, ocorre ativação policlonal de células T e B (CORSINI e COSTA, 1981; MINOPRIO *et al.*, 1986; OLIVIERI *et al.*, 2010).

Entretanto a análise da fase crônica revelou diferença significativa entre os animais infectados e tratados com a cepa Colombiana em relação a Y. A análise do tratamento com Benz em camundongos não infectados e tratados não revelou aumento significativo da celularidade quando correlacionamos o início do tratamento e a fase tardia. Todavia, tanto na fase inicial como na fase tardia do tratamento, observamos que os animais não infectados e tratados com Benz, revelaram uma maior porcentagem de células memória T CD4+CD62L^{neg}/T CD8+CD62L^{neg} efectoras em relação ao grupo controle sem tratamento. O que nos permite sugerir um papel sinérgico entre o quimioterápico e a resposta imune nesses animais. Esses achados corroboram os achados de OLIVIERI *et al.*, 2002 e de HENRIQUES-PONS *et al.*, 2005, que estudando à influência do Benz sobre o sistema imune demonstraram que animais quando tratados tem uma maior expansão de células T CD8+ e T duplo positivas.

Esse quadro descrito acima pode ser explicado, pois, investigações já demonstraram que experimentalmente a infecção pelo *T. cruzi*, independentemente da cepa determina uma resposta celular do baço, linfonodos e órgãos linfóides, que apresentam na fase aguda da infecção uma ativação policlonal de linfócitos CD4+, CD8+ e B (D'IMPERIO *et al.*, 1986; MINOPRIO *et al.*, 1988, MINOPRIO *et al.*, 1989; OLIVIERI *et al.*, 2006; SATHLER-AVELAR *et al.*, 2009; OLIVIERI *et al.*, 2010), traduzida morfológicamente por uma evidente esplenomegalia, linfadenomegalia e com alterações na sua estrutura e celularidade.

No presente estudo a pesquisa de anticorpos IgG pelos métodos indiretos imunofluorescência indireta (sorologia) e ELISA (Enzyme Linked ImmunoSorbent Assay), nos soros dos animais correspondente aos vários grupos (YT, COL-T e COL-NT, Tratados Não Infectados e Controles sem Tratamento) revelou que os animais infectados com cepa Colombiana (resistente) apresentaram títulos mais elevados na fase crônica independentemente do tratamento em relação a cepa Y suscetível.

Desta forma, pela análise geral das concentrações de anticorpos, detectamos níveis menores de IgM, IgG1, IgG2a e IgG total na fase aguda em todos os grupos experimentais, em relação à fase crônica. Os animais não infectados e tratados e os controles sem tratamento não apresentaram níveis significantes durante a fase inicial do tratamento, entretanto, nos animais não infectados e tratados, com decorrer do tratamento, detectamos elevação significativa dos níveis de IgG2a.

O estudo da resposta imunológica em seis diferentes linhagens isogênicas de camundongos e, a avaliação quanto à variação dos níveis de IgG durante o curso

da infecção, revelaram que a infecção por diferentes cepas de *T. cruzi*, leva a variações nos níveis de IgG, e que a diminuição dos níveis de anticorpos circulantes na fase inicial da infecção é precoce, observando-se um aumento no decurso da infecção (25 a 30 dias) nas cepas de média e alta resistência aos quimioterápicos (ANDRADE *et al.*, 1985a). É sabido que a ativação policlonal na infecção pelo *T. cruzi*, corresponde a uma imunossupressão inicial que se traduz pela baixa resposta de anticorpos específicos na fase aguda e, elevação das imunoglobulinas inespecíficas: IgG1, IgG2a, IgG2b, IgM, mais tardiamente (ANDRADE *et al.*, 1985b), resultados que corroboraram com os achados da presente investigação.

Estudos têm demonstrado que as cepas de *T. cruzi*, diferem no padrão de multiplicação parasitária, sendo mais precoces nas cepas suscetíveis (Y e Peruana) e mais tardiamente, nas cepas resistentes (Colombiana e Montalvania) (ANDRADE *et al.*, 1985a, ANDRADE e MAGALHÃES, 1997; ANDRADE *et al.*, 2006; CAMANDARROBA *et al.*, 2004). Dados da literatura revelam que padrão de multiplicação parasitária difere entre cepas, podendo ser um fator que venha explicar a menor concentração de anticorpos circulantes nos animais infectados pela cepa Y, levando em consideração que os camundongos infectados por essa cepa, independentemente de linhagens apresentam uma fase aguda precoce com mortalidade total em torno do 10^o ao 12^o dia pós infecção, período coincidente com a imunossupressão inicial da infecção chagásica, onde são detectados baixos níveis desses anticorpos (ANDRADE *et al.*, 1985a, ANDRADE, 2000; ANDRADE e MAGALHÃES, 1997; DOS SANTOS *et al.*, 2009).

Entretanto, à avaliação intra e intergrupos, correlacionando a fase aguda e crônica da infecção, demonstrou diferenças significativas de IgM, IgG1 e IgG2_a nos camundongos infectados com a cepa Colombiana e não tratados, em relação aos animais infectados e tratados com a cepa Colombiana e Y, na fase mais tardia da infecção. Esses achados são concordantes com os achados de MORGAN *et al.* (1996), que avaliando as concentrações plasmáticas de anticorpos em pacientes com cardiopatia crônica chagásica, demonstraram altos títulos de IgM e IgG2 nesses pacientes, em relação ao grupo controle ou aos pacientes infectados na fase indeterminada.

A correlação dos níveis de Ig com achados da parasitemia e do estudo histopatológico nos vários grupos, revelaram que os animais infectados com a cepa Colombiana e não tratados, foram os que apresentaram níveis mais elevados de IgM, IgG1 e IgG2_a, maior número de parasitos circulantes e nítida exacerbação das lesões necrótico-inflamatórias, no miocárdio e no músculo esquelético, em relação aos outros grupos infectados e tratados em ambas as cepas.

Recentemente PINTO *et al.* (2013), em um estudo clínico de coorte avaliando a resposta ao tratamento com Benzonidazol em paciente na fase aguda no Estado da Amazônia, demonstraram que após o tratamento há um decréscimo significativo dos níveis circulantes de IgG e IgM. Esses achados ratificam os achados encontrados quando a resposta imunológica foi investigada em seis diferentes linhagens de camundongos infectados por diferentes cepas do *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 1985a). Pela análise em conjuntos desses dados, podemos sugerir que nossos achados estejam ligados a processos imunoregulatórios complexos, muito provavelmente relacionados com o envolvimento de citocinas, que podem

influenciar a expressão de isotipos de anticorpos durante o curso da infecção e doença.

Diversos estudos em pacientes chagásicos e em modelos experimentais, chamam a atenção para o papel das citocinas e sua influência nos mecanismos imunoregulatórios, na ativação de circuitos imunológicos e nas lesões inflamatórias associados à resposta imune inata e adaptativa na infecção pelo *T. cruzi* (BELKAID e OLDENHOVE, 2008; FERREIRA *et al.*, 2003; ANDRADE e MAGALHÃES, 2005; HOVSEPIAN *et al.*, 2013; TSANG *et al.*, 2006; TOSELO *et al.*, 2012; VITELLI-AVELAR *et al.*, 2006).

Após analisarmos a cinética das concentrações circulantes das citocinas (IL-6, IL-10, MPC-1, TNF- α e IFN- γ) nos diversos grupos experimentais, observamos picos irregulares durante o decurso da infecção e tratamento em todos os grupos infectados, exceto no grupo representado pelos animais não infectados e tratados, os quais apresentaram índices não representativos em torno de 20 a 50 pg/mL. Entretanto a cepa Y, considerada de alta virulência apresentou concentrações superiores de todas citocinas analisadas durante todo o curso da investigação e tratamento.

Correlacionando os níveis circulantes das citocinas pró-inflamatórias (IL-6; TNF- α e IFN- γ) e da quimiocina MCP-1, encontrados nos animais infectados pela cepa Y classificada como macrofagotrópica (ANDRADE *et al.*, 2008), com o dos animais infectados com cepa Colombiana tratados e não tratados e, suas respectivas populações de CD8+, e de memória efetora CD4+CD62L^{neg}/CD8+CD62L^{neg}, no baço, observamos que essas populações celulares estavam em maior porcentagem nos animais infetados e tratados com a cepa Y, em relação aos

infectados pela cepa Colombiana tratados e não tratados na fase aguda da infecção e tratamento, embora somente a população de CD4+CD62L^{neg} tenha sido estatisticamente significativamente. Esses dados explicam a maior concentração plasmática das referidas citocinas desde a fase precoce da infecção na cepa Y. Também podemos inferir que os níveis mais elevados dessas citocinas inflamatórias seriam responsáveis pela mortalidade precoce (100% no 12^a dia pós-infecção) no grupo não tratado e infectado pela cepa Y. Já foi demonstrado que o IFN- α é uma citocina capaz de induzir macrófagos e células dendríticas a ativação de células T e a hiperexpressão de MHC de classe II, pois, estudos imunopatológicos avaliando essas populações celulares (CD4+, CD8+ e macrófagos) em pacientes e em camundongos revelaram que as lesões miocárdicas na fase aguda e crônica da infecção tinham predominância de células mononucleares (ANDRADE *et al.*, 2000; ANDRADE *et al.*, 2008; MARTIN e TARLETON, 2004; REIS *et al.*, 1993).

MARTIN e TARLETON (2005), em revisão sobre a funcionalidade das células T CD8+, chamam a atenção para serem essas células fundamentais para o controle da infecção pelo *T. cruzi* e, que provavelmente agem através de vários mecanismos, sendo o mais importante a produção de IFN- α , juntamente com as granzinas e perforinas. O interferon gama (IFN- γ), é considerado uma citocina protetora, especialmente na fase aguda pela capacidade de ativar a expressão da síntese do óxido nítrico em macrófagos (GAZZINELLI *et al.*, 1992; OSWALD *et al.*, 1992; PISSETTI *et al.*, 2009). É sabido que um dos principais mecanismos imunológicos que utiliza a produção de IFN- γ , é a infecção de macrófagos por tripomastigotas e, conseqüentemente a produção de moléculas oxidativas como radicais de oxigênio e nitrogênio.

Desta forma, sozinho ou associado ao TNF- α , o IFN- γ é um dos melhores indutores da atividade microbicida de macrófagos em várias infecções por parasitas intracelulares, incluindo *T. cruzi* (CARDILLO *et al.*, 1996; HOVSEPIAN *et al.*, 2013; MUNOZ-FERNANDEZ *et al.*, 1992; SARAIVA *et al.*, 2009; SHER e COFFMAN, 1992; WENDY *et al.*, 2003). Esses estudos corroboram os nossos achados, os quais revelaram que os animais quando infectados com a cepa suscetível macrofagotrópica (Y) e tratados, possuíam maiores quantidades MCP-1, TNF- α , IFN- γ e de células que expressavam o marcador CD11b, levando a diminuição da carga parasitária e a baixa taxa de mortalidade, o que conseqüente permitiu uma ação mais eficaz das citocinas e da atividade microbicida de macrófagos e células efectoras.

Buscando entender esse perfil modulatório apresentado pela cepa Y descrito acima, correlacionamos os níveis de IL-10 com o índice de mortalidade e perfil necrótico inflamatório nos grupos infectados pelas cepas Y e Colombiana tratados e não tratados e, observamos que os animais infectados com a cepa Y e tratados, apesar de apresentarem os maiores índices de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , e IFN- γ) foram também os que apresentavam maiores índices de IL-10 e, conseqüentemente menor taxa de mortalidade (11%) e menores lesões necrótico-inflamatórias em músculo esquelético e miocárdio, tanto na fase aguda como na crônica.

Investigações em humanos e, em modelos experimentais (camundongos, macacos e cães) já demonstraram a importância da citocina IL-10 na imunoregulação da infecção pelo *T. cruzi* tanto na fase aguda como na fase crônica (HOVSEPIAN *et*

al., 2013; PISSETTI *et al.*, 2009). Essa citocina é produzida por diversas subpopulações celulares tem uma ação antiinflamatória (RIVINO *et al.*, 2010; SARAIVA *et al.*, 2009).

GUEDES *et al.* (2009), estudando a evolução da cardiopatia crônica no modelo canino e a influência das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, demonstraram *in vitro* e *in vivo* que os animais não tratados produziam altas concentrações de IFN- γ , TNF- α , os quais apresentavam maiores índices de miocardite, cardiomegalia e fibroses, tanto na fase aguda como na fase crônica, e baixos níveis de IL-10. PISSETTI *et al.* (2009), verificando a associação dos níveis plasmáticos das citocinas IFN- γ , TNF- α e IL-10, em pacientes com diferentes formas clínicas, revelaram que os pacientes que apresentavam maiores concentrações de IFN- γ , TNF- α , também possuíam maiores concentrações de IL-10. Essas investigações confirmam nossos achados com relação aos animais infectados com a cepa Y, os quais apresentavam maiores índices de IFN- γ , TNF- α e concomitantemente maiores índices de IL-10.

Avaliação histopatológica nos animais infectados com as cepas Y e Colombiana, tratados e não tratados revelaram lesões no miocárdio e no músculo esquelético que variaram de discretas a moderadas na fase aguda e crônica nos animais infectados com cepa Y e tratados; e de discretas a intensas nos animais infectados com a cepa Colombiana e tratados; e de moderadas a intensas, nos animais não tratados. Esses achados quando correlacionados a parasitemia, mortalidade e com os níveis de anticorpos, foram concordantes, pois no grupo infectado e não tratado com a cepa colombiana, os animais apresentaram maior predomínio de lesões intensas, maior taxa de mortalidade e parasitemia, bem como, maiores

concentrações plasmáticas de anticorpos IgM, IgG1 e IgG2a, o que sugeri uma Citotoxicidade mediada por anticorpos.

A hipersensibilidade tardia tem sido considerada como sendo um dos mecanismos imunoregulatórios responsáveis pela patogenia das lesões da fase crônica da infecção chagásica (ANDRADE Z, 1999; DOS REIS, 1997; THE *et al.*, 2013). Uma das maneiras de se avaliar este tipo de resposta é através do teste cutâneo, pela injeção de antígenos do *T. cruzi*, e posterior avaliação histopatológica das patas submetidas à injeção exposição dos antígenos. O estudo histopatológico das patas submetidas ao teste permite analisar as populações celulares envolvidas na resposta inflamatória. No presente estudo, os animais na fase crônica da infecção, infectados com as cepas Y e Colombiana tratados, foram desafiados e avaliados no período de 24 e 48 e 72 horas após a injeção do antígeno. A avaliação da resposta inflamatória demonstrou infiltrado predominantemente mononuclear, presença de polimorfonucleares e plasmócitos (Fig 23, A e B). Com relação à intensidade das lesões investigadas a partir da injeção intra-dérmica contendo antígenos do *T. cruzi*, essas se mostraram mais intensas no tempo de 48 horas para os animais infectados pela cepa Y na fase crônica em relação aos animais infectados com a cepa Colombiana em todos os outros pontos (24, 48 e 72 horas pós desafio).

A hipersensibilidade tardia pode ser explicada através das células especializadas na apresentação de antígenos (dendríticas), que ao reconhecerem os antígenos do *T. cruzi* mantêm a estimulação da resposta celular em camundongos cronicamente infectados (ANDRADE *et al.*, 2000). A importância dessas células e o seu papel na miocardite crônica chagásica já foram descrita no modelo do cão nas fases aguda,

crônica e indeterminada da infecção pelo *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 2000). PORTELLA e ANDRADE (2009), investigando o papel dos antígenos parasitários na patogenia da miocardite crônica no modelo do camundongo infectado com cepas suscetíveis e resistentes do *T. cruzi*, e a importância das células dendríticas intersticiais do miocárdio (DCM), demonstraram que essas células estão envolvidas na apresentação de antígenos do *T. cruzi*, bem como pela manutenção da resposta celular e humoral em camundongos infectados e tratados, independentemente da cepa do parasita. THE *et al.*, (2013), estudando o efeito do tratamento com ciclofosfamida em baixas doses sobre a hipersensibilidade tardia (DTH) em camundongos BAL/C cronicamente infectados com a cepa Colômbia do *T. cruzi*, e a participação das células dendríticas intersticiais (IDCs), demonstraram através do teste cutâneos e por métodos Imunohistoquímicos, predominância de lesões mais intensas e presença predominante de linfócitos CD8+ nos infiltrados inflamatórios nos animais tratados, sugerindo ser esse mecanismo um fator agravantes das lesões inflamatórias característica da fase crônica doença de Chagas. Esses dados em conjunto, explicariam nossos achados histopatológicos e sorológicos, pois, os camundongos infectados pela cepa Colombiana e não tratados, manteriam uma concentração constante de antígenos parasitários sendo apresentados pelas células dendríticas às múltiplas populações celulares o que levaria a manutenção dos infiltrados inflamatórios e das altas concentrações sorológicas.

A influência do tratamento com Benz sobre a resposta imunológica em camundongos não infectados e tratados foi realizada pela avaliação citométrica em conjunto com os níveis circulantes de anticorpos, citocinas, quimiocina, hiperplasia do baço e pela análise histopatológica em comparação com animais controles sem

infecção e tratamento. Pela avaliação citométrica detectamos nos animais tratados e não infectados (TNI), porcentagens significativamente maiores de linfócitos T CD4+, T CD8+, CD4+ CD62L^{neg}, CD8+ CD62L^{neg}.

Nossos achados revelaram que o tratamento com BENZ foi capaz de aumentar a frequência de forma significativa das células T CD4+, T CD8+, CD4+CD62L^{neg}, CD8+CD62L^{neg}, em camundongos não infectados e tratados em relação aos controles sem tratamento. Esses achados suportam nossa hipótese de que o tratamento com o Benzonidazol é capaz de ativar e modular a expansão fenotípica de subpopulações de linfócitos efetores e de memória.

Estudos avaliando a ação do Benz em camundongos submetidos ao tratamento revelaram que animais quando tratados com BENZ, tem um aumento na frequência de linfócitos T CD4+, CD8+ e duplo positivos, sendo essa expansão ligada há menor diminuição das taxas de apoptose em órgãos linfóides. Esta correlação direta entre a cinética da resposta de células T e a dinâmica do número de células do tecido linfóide é uma constante em infecções agudas geradas por patógenos como *T. cruzi* (OLIVIERI *et al.*, 2010; HENRIQUES-PONS *et al.*, 2005)

BERTOCCHI *et al.* (2008), avaliando em pacientes chagásicos o efeito do benzonidazol sobre as populações de células T de memória produtoras de TNF- γ , revelaram que os pacientes submetidos ao tratamento passaram a apresentar um aumento significativo dessas populações. FERNÁNDEZ *et al.* (2010), investigando em camundongos C3H infectados com *T. cruzi* e submetidos ao tratamento, um aumento das populações celulares de linfócitos memória CD62L^{neg}, sugerindo que esse aumento estava ligado a ação do BENZ sobre a resposta imune.

Os achados da presente investigação demonstram que o Benzonidazol é capaz de ativar e modular a resposta imunológica tanto em camundongos infectados como nos não infectados e tratados. Este fato poderá ajudar de forma somatória na melhor interpretação dos estudos clínicos e experimentais, com relação ao papel do benzonidazol na resposta imunológica.

10 CONCLUSÕES

- 1) Animais infectados com a cepa Colombiana resistentes e não tratados apresentaram maior numero de parasitas circulantes, bem como, intensificação das lesões necrótico-inflamatórias quando comparados com os camundongos dos grupos tratados;
- 2) Os animais infectados com a cepa Colombiana e tratados com Benzonidazol, apresentaram maior expansão das células T CD4+ e TCD8+ em relação aos animais infectados não tratados;
- 3) O tratamento com Benzonidazol em camundongos não infectados e tratados (TNI) foi capaz de influenciar na maior expansão de células T CD4+, CD8+, CD4+ CD62L^{neg}, CD8+ CD62L^{neg} na fase inicial do tratamento;
- 4) A análise da hipersensibilidade tardia pelo infiltrado inflamatório nas patas dos camundongos tratados com Benzonidazol, revelou aumento da resposta celular nos animais infectados com a cepa Colombiana em relação a cepa Y suscetível;
- 4) Os animais infectados pela cepa Colombiana resistente apresentaram maiores concentrações plasmáticas de todos os anticorpos (IgM, IgG1, IgG2a e IgG total) avaliados tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção;
- 5) O tratamento com Benzonidazol foi capaz de estimular a produção da quimiocina MPC-1 em camundongos tratados não infectados (TNI), mas não das citocinas (TNF, INF, IL-6 e IL-10);

6) O tratamento com Benzonidazol não foi capaz de estimular a resposta imunológica na produção de citocinas em camundongos não infectados e tratados;

7) O tratamento com Benzonidazol foi capaz de estimular a expansão de linfócitos B em camundongos não infectados e tratados na fase tardia do tratamento;

Concluimos que o tratamento com Benzonidazol tem uma ação sinérgica com a resposta imunológica em camundongos infectados e tratados, quanto nos não infectados e também tratados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBAREDA, M. C. et al. *Trypanosoma cruzi* modulates the profile of memory CD81 T cells in chronic Chagas' disease patients. **Int. Immunol.**, v. 18, n. 3, p. 465-471, 2006.

ALIBERTI, J.C. et al. beta-Chemokines enhance parasite uptake and remote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.**, v. 67, p. 4819–4826, 1999.

ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. **Rev. Patol. Trop.**, v. 3, p. 121-165, 1974.

ANDRADE, S. G. Tentative for grouping different *Trypanosoma cruzi* strains in some types. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 18, p. 140-141, 1976.

ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic myocardopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 85, p. 17-27, 1990.

ANDRADE, S. G. *Trypanosoma cruzi*: Clonal Structure of Parasite Strains and the Importance of Principal Clones. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 185-187, 1999.

ANDRADE, S. G. Patologia experimental da doença de Chagas. In: ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 177-196.

ANDRADE, S.G. et al. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains. **Am. J. Trop. Med. Parasitol.**, v. 79, p. 397-407, 1985.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 10, p. 180-187, 1968.

ANDRADE, S.G. et al. Reinfections with different strain of *Trypanosoma cruzi*, as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 39, n. 1, p. 1-8, 2006.

ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M. Caracterização morfo-biológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Gaz. Méd. Bahia**, v. 70, p. 32-42, 1970.

ANDRADE, S.G.; CARVALHO, M.L.; FIGUEIRA, R.M.; ANDRADE, Z.A. Recuperação e caracterização de Tripanosomas inoculados em animais imunes (Reinoculação com diferentes cepas do *T. cruzi*). **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 12, p. 395-402, 1970.

ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M.; ANDRADE, S.G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 18, p. 499-506, 1985.

ANDRADE, V.; BARRAL-NETTO, M.; ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, J.B. Aspectos imunológicos da infecção de seis linhagens isogênicos de camundongos por três diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 203-211, 1985.

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.**, v. 77, p. 796 -799, 1983.

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.**, v. 30, p. 27-35, 1997.

ANDRADE, S.G.; MAGALHÃES, L. dos A.; PESSINA, D.H. Importance of TNF-alpha in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz.**, v. 103, p. 1, p. 21-26, 2008.

ANDRADE, S.G. e MAGALHÃES-SANTOS, I.F. Participation of cytokines in the necrotic-inflammatory lesions in the heart and skeletal muscles of *Calomys callosus* infected with *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 100, n. 5, p. 555-561, 2005.

ANDRADE, S.G.; PIMENTEL, A.R.; DE SOUZA, M.M.; 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.**, v. 63, p. 64-70, 2000.

ANDRADE, S.G. et al. O. Specific chemotherapy of Chagas disease: a comparison between the response in patients and experimental animals inoculated with the same strains. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 86, p. 624-626, 1992.

ANDRADE, S.G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A.S.; GRIMAUD, J.A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 86, n. 2, p. 187-200, 1991.

ANDRADE, Z.A. Immunopathology of Chagas disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, Suppl. 1, p. 71-80, 1999.

ANDRADE, Z.A. The canine model of Chagas' disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 79, Supl., p. 77-83, 1984.

ANDRADE, Z.A. A patogenia da doença de Chagas. **Rev. Ciên. Cult.**, v. 31, Supl, p. 55-59, 1979.

ANIS, R.J.; MARIN-NETO, J.A. Cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Cardiol.**, v. 10, n. 4, p. 6-22, 2000.

ANONYMUS. Recommendations from a satellite Meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, n. 1, p. 429-432, 1999.

ARIAS, A.R.; DIAS, J.C.P. Social, epidemiological, and control determinants of Chagas disease in American Southern Cone Working group. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 102, p. 11-18, 2007.

ÁVILA, H., BELOSCAR, J. S., BOTTASSO, O. A.; MORINI, J. C. Alteraciones electrocardiográficas en individuos infectados *Trypanosoma cruzi* com distinto tiempo de residência em áreas de alta endemicidad. **Medicina, Buenos Aires**, v. 47, p. 154–158, 1987.

BARRETT, T.V. et al. An outbreak of acute Chagas'disease in the São Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*, **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 73, n. 6, p. 703-709, 1979.

BELKAID, Y.; OLDENHOVE, G. Tuning Microenvironments: Induction of Regulatory T Cells by Dendritic Cells. **Immunity**, v. 29, n. 3, p. 62-71, 2008.

BORGES, C. R. et al. Role of nitric oxide in the development of cardiac lesions during the acute phase of experimental infection by *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 2, p. 170-174, 2009.

BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas**. Tese. Belo Horizonte, 1961.

BRENER, Z. Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 9, p. 233-238, 1967.

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.**, v. 63, n. 2, p. 215-220, 1969.

BRENER, Z.; CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 16, p. 39-46, 1963.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R.T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int. Arch. Allergy Immunol.**, v. 114, p. 103-110, 1997.

BRUMPT, E. Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi*, transmission de ce trypanosome par cimex rotundus. Rôle régulateur des hotes intermédiaires. Passage à travers la peau. **Bull. Soc Pathol. Exot.**, v. 6, p. 172-176, 1913.

BUSTAMANTE, J.M. et al. *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. **Int. J. Parasitol.**, v. 32, p. 889-896, 2002.

BUSTAMANTE, J.M. et al. Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. **Clin. Sci.**, v. 104, n. 4, p. 415-20, 2003.

CABRINE-SANTOS, M. et al. *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). **Exp. Parasitol.**, v 99, p. 160-7, 2001.

CARDILLO, F. et al. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK cells. **Infection and Immunity**. v. 64, p. 128-134, 1996.

CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schyzotrypanum cruzi* , agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. **Mem Inst.Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CAMANDAROBA, E.P. **Análise fenotípica e genotípica de clones da cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*, isolados na fase aguda, precoce e avançada da infecção. Investigação da resposta à quimioterapia.** 2004. Tese (Doutorado)- Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004.

CAMANDAROBA, E.L.P. et al. Clonal structure of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain (biodeme Type III): biological, isoenzymic and histopathological analysis of seven isolated clones. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 34, p. 151-157, 2001.

CAMANDAROBA, E. L. et al. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* Colombian strain clones isolated from the acute phase of murine infection. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. v 101, p. 613-5, 2006.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the diagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v 8; 227-234, 1966.

CAMPOS, F.C. et al. Comparative analysis by Polymerase Chain Reaction amplified minicircles of kinetoplast DNA of a stable strain of *Trypanosoma cruzi* from São Felipe, Bahia, its clones and subclones:possibility of predominance of a principal clone in this area. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 23-29, 1999.

CAMPOS, R.M.F.; ANDRADE, S.G. Characterization of Subpopulations (Clones and Subclones) of the 21 SF Strain of *Trypanosoma cruzi* after Long Lasting Maintenance in the Laboratory. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 795-800, 1996.

CAMPOS, R.F. et al. Response to chemotherapy with benznidazole of clones isolated from the 21SF strain of *Trypanosoma cruzi* (biodeme Type II, *Trypanosoma cruzi* II) **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 38, n. 2, p. 142-146, 2005.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Rev. Inst. Med. Trop.** v, 44 p. 29–37, 2002.

CARDILLO, F. et al. B cells modulate T cells so as to favour T helper type 1 and CD8+ T-cell responses in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunology**, v. 122, n. 4, p. 584-595, 2007

CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK cells. **Infect. Immun.**, v. 64, p. 128-134, 1996.

CORLISS, J.O. An interrim utilitarian (user-friendly) hirarchical classification and characterization of the protist. **Acta Protozool.**, v. 33, p. 1-51, 1994.

CARCAVALLO, R. U. et al. Atlas dos Vetores da doença de Chagas nas Américas. 2º ed. Rio de Janeiro: Fiocruz, 1997. 393 p.

CORSINI, A.C.; COSTA, M.G. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). II--Trypomastigote crude extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v, 3. p. 122-126, 1981.

COURA, J.R.; CASTRO, S.L. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 1, p. 3-24.654, 2002.

DA SILVEIRA, P. A.; DE LANA M, BRITTO C, BASTRENTA B, TIBAYRENC M. Experimental *Trypanosoma cruzi* biclonal infection in *Triatoma infestans*: detection of distinct clonal genotypes using kinetoplast DNA probes. **Int J Parasitol.** v, 30 p. 843-8, 2000.

DE CASTRO, A.M. et al. Detection of parasitemia profiles by blood culture after treatment of human chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Res.**, v. 99, n. 4, p. 379-383, 2006.

DEVERA, R.; FERNANDES, O.; COURA, J.R. Should *Trypanosoma cruzi* be called "cruzi" complex? a review of the parasite diversity and the potential of selecting population after in vitro culturing and mice infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 1, p. 1-12, 2003.

DE TITTO E. Bases genéticas. Em: Storino R., Milei J. **Enfermedad de Chagas**. Mosby-Doyma, 75-86, 1994.

DIAS, E. Os efeitos da super-infecção sobre a evolução da cardiopatia crônica chagásica. **Rev. Goiana Méd.**, v. 9, p. 233-239, 1962.

DIAS, J.C.P. Epidemiologia. In: BRENER, A.; BARRAL NETTO. (Eds.) ***Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas***. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara & Koogan, 2000. p. 48-74.

DIAS, J.C.P.; SILVEIRA, A.C.; SCHOFIELD, C.F. The impact of Chagas Disease Control in latin America. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 97, p. 603-612, 2002.

D'IMPERIO LIMA, M.R. et al. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas'disease. **J.Immunol.**, v. 137, p. 353-356, 1985.

DOS SANTOS, M.S. et al. *Trypanosoma cruzi*: genetic diversity influences the profile of immunoglobulins during experimental infecccion. **Exp. Parasitol.**, v. 211, p. 8-14, 2009.

DOS REIS, M.G. Cell mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol. Today**, v. 13, p. 335-340, 1997.

DVORAK, J.A. Single cell isolates of *Trypanosoma cruzi*: How and why? **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, supl, p. 29-38, 1985.

ENGLUND, P.T. et al. Kinetoplast DNA: structure and replication. In: SMITH, D.F.; PARSONS, M. **Molecular biology of parasitic protozoa**. Oxford: IRL Press, 1996. p. 75-87.

FEDERICI, E.E.; ABELMAN, W.E.; NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Amer. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 13, p. 272-280, 1964.

FERREIRA, R. C. et al. Increased plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v, 98: p. 407-411, 2003.

FERNANDES, J.F.; CASTELLANI, O.; OKUMURA, M. Histopathology of the heart and muscles in mice immunized against *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 8, p. 151-156, 1964.

FERNANDES, O. et al. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from human and triatomines clasificatend into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequence. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 58, p. 807-811, 1998.

FERNANDES, O. et al. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the Mini-exon and ribosomal spacers. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 94, p. 195-197, 1999.

FILARDI, L.S.; BRENER, Z. Nitroimidazole-thiadiazole derivative with curative action in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 76, p. 293-297, 1982.

GAZZINELLI, R. T. et al. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor-beta. **Eur. J. Immunol.**, v 10, p. 2501-6, 1992.

GORLA, D.E.; DUJARDIN, J.P.; SCHOFIELD, C.J. Biosystematics of Old World Triatominae. **Acta Trop.**, v. 63, p. 127-140, 1997.

GRIMAUD, J.A.; ANDRADE, S.A. *Trypanosoma cruzi*: intracellular host-parasite relationship in murine infection. **Cell. Mol. Biol.**, v. 30, p. 1, p. 59-65, 1984.

GUEDES, P.M. et al. Development of chronic cardiomyopathy in canine Chagas disease correlates with high IFN-gamma, TNF-alpha, and low IL-10 production during the acute infection phase. **Vet. Immunol. Immunopathol.**, v. 130, p. 1-2, p. 43-52, 2009.

HECKER, H.; BETSCHART, B.; BURRI, M.; SCHLIMME, W. Functional morphology of trypanosome chromatin. **Parasitol. Today**, v. 11, p. 79 -83, 1995.

HENRIKSSON, J.; ASLUND, L.; PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, v. 12, n. 3, p. 108-14, 1996.

HENRIQUES-PONS, A. et al. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* increases the population of CD8(+), but not CD4(+), immunoglobulin G Fc receptor-positive T lymphocytes. **Infect Immun.**, v. 73, n. 8, p. 5048-5052, 2005.

HIGO, H. et al. Genotypic variation among lineages of *Trypanosoma cruzi* and its geographic aspects. **Parasitology**, v. 4, p. 337-344, 2004.

HOVSEPIAN. E. et al. IL-10 Inhibits the NF- κ B and ERK/MAPK-Mediated Production of Pro-Inflammatory Mediators by Up-Regulation of SOCS-3 in

Trypanosoma cruzi-Infected Cardiomyocytes. **PLoS One**, v. 18, n. 11, p. 79445, 2013.

KIERSZENBAUM, F.; PIZZIMENTI, M.M. Thymus-dependent control of host defense mechanism against infection whit Trypanosoma cruzi. **Infect. Immun.** v. 24, n. 1, p. 117-120, 1979.

KOOY, R.F. et al. On the DNA content of *Trypanosoma cruzi*. **Mol. Biochem. Parasitol.**,v. 36, p. 73-76, 1989.

LANA, M. et al. Trypanosoma cruzi: infectivity of clonal genotype infections in acute and chronic phases in mice. **Exp. Parasitol.**, v. 96, n. 2, p. 61-66, 2000.

LARANJA, F.S. Clinical aspects of Chagas' disease. **Rev. Bras. Med.**, v. 10, p. 482-491, 1953.

LAGUENS, R.P.; CABEZA MECKERT, P.M.; VIGLIANO, C.A. Pathogenesis of human chronic chagasic myocarditis. **Medicina, B. Aires**, v. 59, Suppl 2, p. 63-68, 1999.

LAUCELLA, S.A.; ROTTENBERG, M.E.; DE TITTO, E.H. Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. **Rev Argent. Microbiol.** , v. 28, n. 2 p. 99-109, 1996.

LAURIA-PIRES, L.; TEXEIRA, A.R. Superinfections with genetically characterizend *Trypanosoma cruzi* clones did not aggravate morbidity and mortality in BALB/c mice. **J. Parasitol.**, v. 83, p. 819-824, 1997.

LIMA, E.S; ANDRADE, Z.A.; ANDRADE, S.G. TNF α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi* . **Int. J. Exp. Pathol.** v, 82 p. 327-336, 2001.

LISBOA, C.V. et al. Stable infection of primates with *Trypanosoma cruzi* I and II. **Parasitology**, v. 133, n. 5, p. 603-611, 2006.

LISBOA, C.V. et al. *Trypanosoma cruzi* (Kinetoplastida, Trypanosomatidae) genotypes in neotropical bats in Brazil. **Vet Parasitol.**, v. 156, n. 3-4, p. 314-318, 2008.

LUQUETTI, A.O. et al. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Trans. Roy. Soc. Trop. Méd. Hyg.**, v. 80, p. 462-470, 1986.

LUMSDEN, W.H.R. Problems in characterization and nomenclature of the trypanosome populations. **Adv. Soc. Belge Med. Trop.**, v. 57, p. 361-368, 1977.

MACEDO, V. Influência da exposição à reinfecção na evolução da doença de Chagas. **Rev. Patol. Trop.**, v. 5, p. 33-116, 1976.

MACEDO, A.M.; PENA, S.D.J. Genetic Variability of *Trypanosoma cruzi*: Implications for the Pathogenesis of Chagas Disease. **Parasitol. Today**, v. 14, n. 3, p. 119-124, 1998.

MACEDO, A.M. et al. DNA fingerprinting reveals relationships between strains of *Trypanosoma rangeli* and *Trypanosoma cruzi*. **EXS.** v. 67, p. 321-329, 1993.

MACHADO, E.M. et al. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 65, n. 6, p. 958-965, 2001.

MAGALHÃES, J.B.; PONTES, A.L.; ANDRADE, S.G. Comportamento das cepas Y e Peruana do *Trypanosoma cruzi* no camundongo, após passagem em diferentes meios. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 80, p. 41-50, 1985.

MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G. Behavior of *Trypanosoma cruzi* strains after passage in different triatominae species. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 24, n. 4, p. 209-216, 1991.

MAGALHÃES, J.B.; ANDRADE, S.G. Estudo do comportamento de cepas de *Trypanosoma cruzi* após passagem em diferentes espécies de triatomíneos. **Rev. Soc. Brás. Med. Trop.**, v. 24, p. 209-216, 1991.

MARIANO, F.S. et al. The involvement of CD4+CD25+ T cells in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes Infect.**, v. 10, n. 7, p. 825-833, 2008.

MARTIN, D. L.; MURALI-KRISHNA, K.; TARLETON, R. L. Generation of *Trypanosoma cruzi* specific CD8+ T- cell immunity is unaffected by the absence of type I interferon signaling. **Infect. Immun.**, v. 78, n. 7, p. 3154-3159, 2010.

MARTIN, D.; TARLETON, R. Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol. Rev.**, v. 201, p. 304-17, 2004.

MARTIN, D.L.; TARLETON, R. L. Antigen-specific T cells maintain an effector memory phenotype during persistent *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.**, v. 174, n. 3, p. 1594-1601, 2005.

MCDANIEL, J.P.; DVORAK, J.A. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. **Mol. Biochem. Parasitol.**, v. 57, n. 2, p. 213-222, 1993.

MICHAILOWSKY, V. et al. Interleukin-12 enhances in vivo parasitocidal effect of Benznidazole during acute experimental infection with a naturally drug-resistant strain of *Trypanosoma cruzi*. **Antimicrobial Agents and Chemoterap.** v, 42. p. 2549-2556, 1998.

MICHAILOWSKY, V. et al. Pivotal role of interleukin-12 and interferon-gamma axis in controlling tissue parasitism and inflammation in the heart and central nervous system during *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Pathol.** v,159. p, 1723-1733, 2001.

MENNA-BARRETO, R. F. et al. Different cell death pathways induced by drugs in *Trypanosoma cruzi*: an ultrastructural study. **Micron**, v. 40, n. 2, p. 157-168, 2009.

MEDRANO-MERCADO, N. et al. Acute-phase proteins and serologic profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 54, n. 2, p. 154-161, 1996.

MILES, M.A. et al. Isozyme heterogeneity and numerical taxonomy of *Trypanosoma cruzi* stocks from Chile. **Trans. Roy Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 526-535, 1984.

MILES, M.A.; CEDILLOS, R.A.; POVOA, M.M.; SOUZA, A.A.; PRATA, A.; MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zimodemes) cause Venezuelan and Cardiac forms of Chagas' disease? **Lancet**, v. 1, p. 1338–1340, 1981.

MILES, M.A.; CIBULSKIS, R.E. The heterogeneity of *Trypanosoma cruzi*: zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol. Today**, v. 2, p.94-97, 1986.

MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; POVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 74, p. 221-237, 1980.

MILES, M.A.; SOUZA, A.; PÓVOA, M.; SHAW, J.J.; LAINSON, R.; TOYÉ, P.J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. **Nature**, v. 272, p. 819-821, 1978.

MILES, M.A.; TOYÉ, P.J.; OSWALD, S.C.; GODFREY, D.G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. **Trans. R. Soc. Med. Trop. Hyg.**, v. 71, p. 217-225, 1977.

MINOPRIO, P.; COUTINHO, A. Lymphocyte subpopulations and clonal repertoires participate in immune response to acute *T. cruzi* infection. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. v. 83 Suppl 1, p. 356-359, 1988.

MINOPRIO, P. M. et al. policlonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T. **Scand. J. Immunol.**, v. 24, n. 6, p. 669-679, 1986.

MINOPRIO, P. et al. Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol. Rev.** v.112, p.183-207, 1989.

MOREL, C.; CHIARI, E.; PLESSMANN, C. E.; MATTEI, D.M.; ROMÂNHA, A.J.; SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of kinetoplast DNA minicircles. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 77, n. 11, p. 6810-6814, 1980.

MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 29, n. 5, p. 1070-1074, 1980.

MOREL, C.M.; DEANE, M.P.; GONÇALVES, A.M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. **Parasitol. Today**, v. 2, n. 4, p. 97-101, 1986.

MORGAN, J. et al. Anti-*Trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 55, n. 4, p. 355-359, 1996.

MUNOZ-FERNANDEZ, M.A.; FERNANDEZ, M.A.; FRESNO, M. Activation of human macrophages for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* by TNF-alpha and IFN-gamma through a nitric oxide-dependent mechanism. **Immunol. Letters**, v. 33, p. 35-40, 1992.

MURTA SMF, ROPERT C, ALVES RO, GAZZINELLI RT, ROMANHA AJ. In-vivo treatment with benznidazole enhances phagocytosis, parasite destruction and cytokine release by macrophages during infection with a drug-susceptible but not with a derived drug-resistant *Trypanosoma cruzi* population. **Parasite Immunology** v, 21 p. 535–544, 1999.

MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.A.; FERNÁNDEZ, M.A.; FRESNO, M. Synergism between tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur J Immunol.** v 22, n. 2, p. 301-7, 1992

MYLER, P.J. Molecular variation in trypanosomes. **Acta. Trop.**, v. 53, p. 205-225, 1993.

NOGUEIRA, N. F. et al. *Trypanosoma cruzi*: involvement of glycoinositolphospholipids in the attachment to the luminal midgut surface of *Rhodnius prolixus*. **Exp. Parasitol.**, v. 2, p. 120-128, 2007.

OLIVIERI, B. P. et al. A comparative study of posaconazole and benznidazole in the prevention of heart damage and promotion of trypanocidal immune response in a murine model of Chagas disease. **Int. J. Antimicrob. Agents.**, v. 36, p. 79–83, 2010.

OLIVIERI, B.P.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; ARAÚJO-JORGE, T. Benznidazole treatment following acute *Trypanosoma cruzi* infection triggers CD8+ T-cell expansion and promotes resistance to reinfection. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 46, n. 12, p. 3790-3796, 2002.

OLIVIERI, B. P. et al. *Trypanosoma cruzi*: alteration in the lymphoid compartments following interruption of infection by early acute benznidazole therapy in mice. **Exp Parasitol.**, v., 114, n. 3, p. 228-234, 2006.

OSWALD, I.P.; WYNN, T.A.; SHER, A.; JAMES, S.L. Interleukin 10 inhibits macrophage microbicidal activity by blocking the endogenous production of tumor necrosis factor alpha required as a costimulatory factor for interferon gamma-induced activation. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 89, n. 18, p. 8676-80, 1992.

PADILLA, A.M.; BUSTAMANTE, J.M.; TARLETON, R. L. CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 21, n. 4, p. 385-390, 2010.

PADILLA, A.; XU, D.; MARTIN, D.; TARLETON, R. Limited Role for CD4+ T-Cell Help in the Initial Priming of *Trypanosoma cruzi*-Specific CD8+ T Cells. **Infect. Immun.**, v. 75, p. 231–235, 2007.

PÉREZ, A. R. *et al.* Extrathymic CD4+CD8+ lymphocytes in Chagas disease: possible relationship with an immunoendocrine imbalance. **Ann. N. Y. Acad. Sci.**, v 1262, p. 27-36, 2012.

PINTO, A. Y. *et al.* Clinical follow-up of responses to treatment with benznidazol in Amazon: a cohort study of acute Chagas disease. **PLoS One**. v. 27, n. 5, p. 64450, 2013.

PINTO, A. Y. *et al.* Urban outbreak of acute Chagas disease in Amazon region of Brazil: four-year follow-up after treatment with benznidazole. **Rev. Panam. Salud Publ.**, v. 25, n. 1, p.77-83, 2009.

PISSETTI, C. W. *et al.* Association between the plasma levels of TNF-alpha, IFN-gamma, IL-10, nitric oxide and specific IgG isotypes in the clinical forms of chronic Chagas disease. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 42, n. 4, p. 425-430, 2009.

PORTELLA, R.S. **Investigação sobre o papel dos antígenos parasitários na patogenia miocardite crônica, em camundongos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*: a importância das célula dendríticas intersticiais do miocárdio.** 2006. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2006.

POSTOL, E.; MENGEL, J.; AROEIRA, L.S; CARDILLO, F. Increased Inflammatory response ins skeletal muscle of gene knockout B cell deficient mice during early chronic T. cruzi infection. **Scand. J. Immunol.**, v. 54, n. 1, 2001.

REIS, D. D. *et al.* Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 49, n. 2, p, 192-200, 1993.

REY, L. **Parasitologia**. 3ª ed., Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan, 2002.

RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. et al. A heart-specific CD4+ T-cell line obtained from a chronic chagasic mouse induces carditis in heart-immunized mice and rejection of normal heart transplants in the absence of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** v. 23, n. 2, p. 93-101, 2001.

RIVINO, L. et al. CCR6 is expressed on an IL-10-producing, autoreactive memory T cell population with context-dependent regulatory function. **J. Exp. Med.**, v. 15, n. 3, p. 565-577, 2010.

ROCHA E SILVA, E.O.; WANDERLEY, D.M.V.; RODRIGUES, V.L.C.C. *Triatoma infestans*: importância, controle e eliminação da espécie no Estado de São Paulo, Brasil. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 73-88, 1998.

ROMANHA, A. J. et al. Experimental chemotherapy against *Trypanosoma cruzi* infection: essential role of endogenous interferon-gamma in mediating parasitologic cure. **J. Infect. Dis.**, v. 186, n. 6, p. 823-828, 2002.

ROMANHA, C.; TERRACINI, E. Compartimiento de lãs infecciones de lauchas por *S. cruzi*, segun La concentración de parasitos inoculados (infecciones crônicas iniciales). **An. Inst. Med. Reg.**, v. 1, p. 141-164, 1945.

SANOJA C.; CARBAJOSA S.; FRESNO M.; GIRONÈS N. Analysis of the Dynamics of Infiltrating CD4+ T Cell Subsets in the Heart during Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **PLoS One.**, v 8(6), p. 65820, 2013.

SANTOS, S.S. et al. The genetic diversity of brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates and the phylogenetic positioning of zimodeme 3, based on the internal transcribed spacer of ribosomal gene. **Ann. Trop. Med. Parasitol.**, v. 96, p. 755-764, 2002.

SARAIVA, M. et al. Interleukin-10 production by Th1 cells requires interleukin-12-induced STAT4 transcription factor and ERK MAP kinase activation by high antigen dose. **Immunity**, v. 31, n. 2, p. 209-219, 2009

SATHLER-AVELAR, R. VITELLI-AVELAR,DM. TEIXEIRA-CARVALHO, A. MARTINS-FILHO, A.O. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, Suppl. I, p. 246-251, 2009.

SCHAUB, G.A. *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies o development of two strains in small instestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. **Exp. Parasitol.**, v. 68, p. 260-273, 1989.

SHER, A.; COFFMAN, R. L. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Annual Rev. Immunol.**, v 10, p. 385-409, 1992.

SHERLOCK, I.A. Vetores. In: BRENER, Z.; ANDRADE, Z.; BARRAL-NETTO, M. ***Typanosoma cruzi e doença de Chagas***. 2^a. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. p. 21-40.

SHERLOCK, I.A. **Vectors of Chagas disease and vector distribution. WHO. Expert committee on the control of Chagas disease.** Buenos Aires. CHA/WP/89.5, 1989. p. 14.

SOARES, M.B.; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet. **An. Acad. Brás. Cienc.**, n. 4, p. 547-559, 2001

SOLARI, A.J. The 3-Dimensional fine structure of the mitotic spindle in *Trypanosoma cruzi*. **Chomosoma**, v. 78, p. 239-255, 1980.

SOUTO, R.P.; ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Tripanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. **Mol. Bioch. Parasitol.**, v. 62, p. 45-52, 1993.

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.**, v. 83, p. 141-152, 1996.

STEINDEL, M. et al. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagn. Microbiol. Infect. Dis.** v. 1, p. 25-32, 2007.

TARLETON, R.L. Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. **Int. J. Parasitol.**, v. 31, p. 550-554, 2001.

TARLETON, R.L. et al. Susceptibility of beta 2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature**, v. 356, n. 6367, p. 338-340, 1992.

TEIXEIRA, M.M.; GAZZINELLI, R.T.; SILVA, J.S. Chemokins, inflammation and *Trypanosoma cruzi* infection. **Trends Parasitol.**, v. 18, p. 262-265, 2002.

TIBAYRENC, M.; AYALA, F.J. Isozyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease:genetical,taxonomical, and epidemiological significance. **Evolution** v. 42, n. 2, p. 277-292, 1988.

TIBAYRENC, M. et al. The microdistribution of isoenzymic strains of *Trypanosoma cruzi* in southern Bolivia; new isoenzyme profiles and further arguments against mendelian sexuality. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 78, p. 519-525, 1984.

TIBAYRENC, M.; MILES, M.A. A genetic comparison between Brazilian and Bolivian zymodemes of *Trypanosoma cruzi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 77, n. 1, p. 76-83, 1983.

TIBAYRENC, M. et al. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 90, p. 1335-1339, 1993.

TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A.; AYALA, F.J. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. **Proc. Natl. Acad. Sci.**, v. 83, p. 115-119, 1986.

TOSELLO BOARI, J. *et al.* IL-17 signaling reduces inflammation and mortality during *Trypanosoma cruzi* infection by recruiting suppressive IL-10-producing neutrophils. **PLoS Pathog.**, v 8, p. 1002 -1017, 2012.

TOYÉ, P.J. Isoenzymic differences between culture forms of *Trypanosoma rangeli*, *T. cruzi*, and *T. lewisi*. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.**, v. 68, n. 4, p. 266, 1974.

TSANG, J.Y. *et al.* Altered proximal T cell receptor (TCR) signaling in human CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells. **J. Leukoc. Biol.**, v. 80, p. 145-151 2006.

VITELLI-AVELAR, D, M. *et al.* Are increased frequency of macrophage-like and natural killer (NK) cells, together with high levels of NKT and CD4⁺ CD25^{high} T cells balancing activated CD 8⁺T cells, the key to control Chagas' disease morbidity? **Clin. Exp. Immunol.**, v. 145, p. 81–92, 2006.

VIOTTI, R. *et al.* Impact of Aetiological Treatment on Conventional and Multiplex Serology in Chronic Chagas Disease. **PLoS Negl Trop Dis.**, v. 5, n. 9, p. 1314, 2011.

WARREN, L.G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **J. Parasitol.**, v. 46 p. 529-239, 1960.

WHO. Proposals for the nomenclature of salivaria trypanosomes and for the maintenance of reference collections. **Bull. Wrld. Hlth. Org.**, v. 56, p. 476-480, 1978.

ZHANG, L.; TARLETON, R.L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **J. Infect Dis.**, v. 180, p. 480-486, 1999.

ZHENG, S, G.; WANG, J, H.; GRAY, J, D.; SOUCIER, H.; HORWITZ, D.A.; Natural and induced CD4⁺CD25⁺ cells educate CD4⁺CD25⁻ cells to develop

suppressive activity: the role of IL-2, TGF-beta, and IL-10. **J. Immunol.**, v. 172, p. 5213-522, 2004.

ZINGALES, B. et al. Molecular epidemiology of American Trypanosomiasis in Brazil. Basis on dimorphism of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int. J. Parasitol.**, v. 28, p. 105-112, 1998.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051-1054, 2009.