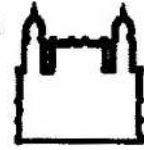




UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FACULDADE DE MEDICINA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
CENTRO DE PSQUISAS GONÇALO MONIZ



FIOCRUZ

Curso de Pós-Graduação em Patologia

TESE DE DOUTORADO

***Calomys callosus* RENGER 1830, (RODENTIA-CRICETIDAE): UM
MODELO PARA O ESTUDO DA FIBROGÊNESE E DA FIBROCLASIA
ESPONTÂNEA NA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma Cruzi*.**

ISIS FERNANDES MAGALHÃES SANTOS

SALVADOR - BA - BRASIL

2003

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**

Curso de pós-graduação (Doutorado) em Patologia

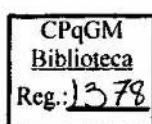
***Calomys callosus* Renger 1830, (RODENTIA-CRICETIDAE): UM
MODELO PARA O ESTUDO DA FIBROGÊNESE E DA FIBROCLASIA
ESPONTÂNEA NA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma Cruzi*.**

ISIS FERNANDES MAGALHÃES SANTOS

Professor-orientador: Dra. Sonia Gumes Andrade

Tese apresentada para obtenção do grau de
doutor em Patologia (Área de concentração:
Patologia Experimental).

Salvador – Bahia, 2003



Na pausa não há música, mas a pausa ajuda a fazer a música.

Na melodia da nossa vida a música é interrompida aqui e ali por pausas, e nós sem refletirmos, pensamos que a melodia terminou.

Deus nos envia um tempo de parada forçada, de planos fracassados, de esforços frustrados, e faz uma pausa repentina no coral de nossa vida.

E nos lamentamos que a nossa voz tenha de calar-se, e tenha de faltar a nossa parte na música que sobe constantemente aos ouvidos do Criador.

Mas, como é que o maestro lê a pausa? Ele continua a marcar o compasso com a mesma precisão e toma a nota seguinte com firmeza, como se não tivesse havido interrupção alguma.

Deus segue um plano ao escrever a música das nossas vidas.

A nossa parte deve ser aprender a melodia, e não desanimar nas pausas.

Elas estão ali para serem passadas por alto ou serem omitidas, nem para atrapalhar a melodia ou alterar o tom.

Se olharmos para cima, Deus marcará o compasso para nós.

Com os olhos nEle, vamos ferir a próxima nota com toda clareza.

Se murmurarmos tristemente: "Na pausa não há música", não nos esqueçamos, contudo, de que "ela ajuda a fazer a música".

Compor a música da nossa vida é geralmente um processo lento e trabalhoso.

Com paciência Deus trabalha para nos ensinar!

E quanto tempo Ele espera ate que aprendamos a lição!

Ruskin (Subtraído)

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha família

Ao meu esposo Altemar, pelo companheirismo, paciência e principalmente pelo estímulo dado nos momentos de dificuldade enfrentados por mim durante o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus filhos Alan e Hugo, que são as minhas melhores produções da vida. Que este trabalho represente na vida de vocês o exercício da busca de um dos sonhos do ser humano: a realização profissional.

AOS ÓRGÃOS E INSTITUIÇÕES:

Os meus agradecimentos aos Órgãos e Instituições que contribuíram de forma direta ou indireta no desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação do Curso de Pós-graduação em Patologia, por viabilizar a compra de alguns monoclonais para realização de testes de imunomarcagem que complementaram e enriqueceram este trabalho. E também por patrocinar viagens a congressos científicos, fornecendo passagens aéreas e hospedagem, o que me permitiu apresentar de pelo menos dois trabalhos científicos.

Ao Centro de Pesquisas Goncalo Moniz-FIOCRUZ pela concessão de bolsa de doutorado no período de 1999 a 2002.

AGRADECIMENTOS:

Agradecimento especial:

Primeiramente a Deus, pois somente Ele pode nos proporcionar o verdadeiro ensinamento de sabedoria plena.

A minha orientadora:

Dra. Sonia Gumes Andrade, pelo sublime exemplo de pesquisadora dedicada, competente e sempre disponível aos seus orientandos. Pelo entusiasmo e paciência, principalmente durante os ensinamentos das análises histopatológicas. E o mais importante, pelo amor de mãe que me foi dedicado durante momentos difíceis da minha vida pessoal. Muito obrigada!

Aos pesquisadores:

Dr. Zilton de Araújo Andrade, por disponibilizar o seu Laboratório para utilização de equipamentos e reagentes, bem como permitindo que fizesse parte da família LAPEX quando tive oportunidade de colaborar com trabalhos desenvolvidos no seu Laboratório.

Dra. Fabíola Cardillo, pelas sugestões feitas na parte prática deste trabalho, na correção de um dos manuscritos, e pela gentileza de disponibilizar reagentes para a quantificação de citocinas no soro dos *Calomys* infectados.

Dr. José Mengel pela gentileza de disponibilizar as células L-929 e anticorpo monoclonal anti TGF- β para Imunohistoquímica, citocina imprescindível a qualquer estudo sobre fibrose.

A Dr. Eduardo Ramos, por disponibilizar o microscópio de seu laboratório para realização de fotografias de lâminas coradas em Picrossírius, analisadas em luz polarizada.

Aos amigos e colegas:

LAPEX

Márcia Maria de Sousa, pela amizade consolidada nestes quatro anos de convivência. Pelas palavras sábias em momentos delicados da minha vida. Pelo companheirismo e solidariedade emocional e apoio técnico dispensados no decorrer do desenvolvimento deste trabalho.

Queli Teixeira Lemos, pela amizade constante, pela disponibilidade para ajudar em etapas da parte prática deste trabalho e pelo exemplo de dedicação e compromisso no desenvolvimento de trabalhos científicos.

Bárbara Cristina Alves de Assis, pelo carinho dispensado a mim e pela paciência durante a acessoria referente à utilização do sistema computadorizado para elaboração das análises morfométricas.

Elisângela Trindade Santos, pela solidariedade nos momentos em que precisei de apoio técnico na finalização de algumas etapas deste trabalho.

LAB. CHAGAS

À mestra Elianita Suzart de Lima, pela amizade e disponibilidade de ensinar o que aprendeu sobre o *Calomys callosus*, mesmo estando no momento mais turbulento de um aluno de pós-graduação, que é o final do seu trabalho propriamente dito.

As amigas Renata Siqueira Portella, Karina de Souza Sobral, pela cumplicidade profissional e solidariedade dispensadas durante etapas críticas da conclusão desta tese

Carolina Silva Costa Lima, pela colaboração em uma das etapas deste trabalho e principalmente pela oportunidade que sua vida me deu de co-orientar um aluno de iniciação científica.

Aos colegas Edson Luiz Paes Camandaroba, Torriceli The, Marcos Lázaro, Daniel Pessina e Joyce M. Oliveira pelos bons momentos compartilhados na convivência diária.

Juracy Barbosa Magalhães, Fátima Magalhães, Dinalva França de Jesus e Rita Palma da Cunha Lima, pela amizade constante e apoio diário.

Presciano da Silva Correia, que muito contribuiu para este trabalho, com sua experiência na manipulação de animais de laboratório, sendo responsável pelo acasalamento do *Calomys callosus*.

Ariane Ramos Pimentel pelo indispensável auxílio na padronização de todos os ensaios de Imunohistoquímica, principalmente na fase final destas reações, em que sua disponibilidade foi indiscutível.

Aos funcionários do CPqGM-FIOCRUZ:

Sra. Ana Christina C. de Campos, pela organização das citações bibliográficas e ficha catalográfica que constam nesta tese.

Sra. Edite Silva Santos, Evany de Araújo, Adelvani Boa Morte e Ana Maria Fiscina Sampaio pela atenção e gentileza no atendimento aos serviços da biblioteca que foram por mim solicitados.

Mário Coelho Cordeiro Neto e Hugo V. Gonçalves pelo apoio no uso do *Data Show* e na edição das fotos desta tese e das fotos do primeiro trabalho publicado em 2002.

Agradeço a todos os outros colegas e amigos do CPqGM-FIOCRUZ que direta ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho.

RESUMO

CALOMYS CALLOSUS, RENGER, 1830 (*RODENTIA CRICETIDAE*): UM MODELO PARA O ESTUDO DA FIBROGÊNESE E DA FIBROCLASIA ESPONTÂNEA, NA INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI*.

ISIS FERNANDES MAGALHÃES-SANTOS

INTRODUÇÃO: O *Calomys callosus* é um animal silvestre, reservatório natural do *Trypanosoma cruzi*, que tem sido utilizado como modelo experimental para o estudo da infecção com este parasito. O *C. callosus* difere do modelo murino na resposta a diferentes cepas do *T. cruzi*, controla a infecção, com negatificação da parasitemia e com mortalidade nula. No presente estudo, investigamos a influência de cepas do *T. cruzi* pertencentes aos diferentes Biodemas (Tipos I, II e III), na evolução da infecção e das lesões histopatológicas, no histotropismo e na patogenicidade para o *C. callosus*. Subseqüentemente, avaliamos através imunofluorescência, utilizando anticorpos monoclonais específicos, contra os componentes da matriz extracelular, a presença dos tipos genéticos do colágeno, de fibronectina e laminina, nas diferentes fases da infecção. Foi também investigada por imunomarcção *in situ* a participação de citocinas pró-inflamatórias e pró-fibrogênicas na patogênese das lesões necrótico-inflamatórias no *C. callosus* infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi*. **MATERIAL E MÉTODOS:** Os animais foram infectados com as cepas de Biodema tipo I (Y), tipo II (21SF) e tipo III (Colombiana) e sacrificados em diferentes períodos pós-infecção de acordo com a cepa, de 7 a 70 dias. Para cada grupo, foram mantidos controles normais, intactos. A parasitemia e mortalidade foram acompanhadas durante o curso da infecção. Secções de coração e de músculo esquelético foram fixadas para avaliação histopatológica e criopreservadas para estudo imunohistoquímico dos colágenos tipo I, III, IV, laminina e fibronectina e das citocinas IFN- γ , TGF- β e TNF- α . **RESULTADOS:** Neste modelo, a resposta peculiar observada, indica uma influência dos diferentes Biodemas na evolução da infecção. As cepas de Biodema tipos I e II (Y e 21SF) determinaram lesões moderadas principalmente no miocárdio, com baixo parasitismo tissular e regressão rápida e total das lesões aos 60 dias de infecção. Diferentemente, a cepa Colombiana (Tipo III), apresentou maior patogenicidade, determinando lesões necrótico-inflamatórias no coração e músculo esquelético, correspondendo ao parasitismo intracelular. Os componentes da matriz presentes na fase inicial da infecção foram predominantemente fibronectina, laminina e colágenos tipos I, III, IV no coração. No músculo esquelético predominaram os colágenos tipos III e IV. No 40^o dia de infecção, predominou o colágeno tipo IV no coração e na fase tardia da infecção (60 a 70 dias) observou-se fragmentação e reabsorção desta matriz. Os resultados da imunomarcção de citocinas demonstrou a presença de TNF α , IFN γ e TGF β desde o 15^o dia até o 40^o dia de infecção e desaparecimento total com 65 dias de infecção, exceto o IFN- γ que esteve presente em células de focos residuais da inflamação nesta fase. **CONCLUSÃO:** Estes resultados indicam que na infecção experimental, o comportamento do *C. callosus*, reflete uma afinidade por cepas do tipo III (Zimodema; *T. cruzi* I), modulando o processo inflamatório, com regressão espontânea da fibrose, independente dos tipos genéticos do colágeno presentes no interstício. Estas observações sugerem que citocinas como TNF α e IFN γ estão ativamente participando da destruição de parasitas intracelulares e o TGF- β possivelmente participando da precoce fibrogênese descrita neste modelo, bem como na modulação deste processo, controlando a infecção e resolvendo as lesões fibrótico-inflamatórias.

PALAVRAS-CHAVE: *Calomys callosus*, cepas do *Trypanosoma cruzi*, Biodemas, Colágeno, Citocinas.

ABSTRACT

CALOMYS CALLOSUS, RENGER, 1830 (RODENTIA CRICETIDAE): A MODEL TO STUDY THE PROCESS OF FIBROGENESIS AND SPONTANEOUS FIBROCLASIA IN THE INFECTION WITH TRYPANOSOMA CRUZI.
ISIS FERNANDES MAGALHÃES - SANTOS

INTRODUCTION: The *Calomys callosus*, a silvatic reservoir of *Trypanosoma cruzi*, biologically described and adapted to laboratory, has been used in the study of experimental infection with this parasite. The *C. callosus* differs from the murine model in the response to the infection with different strain of *T. cruzi*, controlling the infection, with negativation of the parasitemia and null mortality. In the present study we investigated the influence of the infection with strains of the different Biomes (Types I, II and III) on the evolution of the infection, the histopathological lesions, the histotropism and the pathogenicity, in the model of *C. callosus*. Subsequently, *Calomys callosus* infected with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi* were studied with the objective of to characterize by immunofluorescence, using specific monoclonal antibodies, the presence of the different genetic types of collagen, fibronectin and laminin in different phases of the infection. The participation of pro-inflammatory and pro-fibrogenic cytokines in the pathogenesis of the necrotic-inflammatory lesions were also investigated. **MATERIAL AND METHODS:** *C. callosus* were infected respectively with the strains representatives of the three different Biomes: Type I - Y strain, Type II-21SF strain (*T. cruzi* II) and Type III -Colombian strain (*T. cruzi* I) and sacrificed at different periods post-infection, according with the strain, from 7 to 70 days. For each group, normal *C. callosus* were also used as controls and parasitemia and mortality of infected groups were evaluated. Sections of the heart and skeletal muscle were processed for histopathologic examination. Immunohistochemical test were performed using cryostat sections incubated with specific antibodies against collagen type I, III, IV, laminin and fibronectin. The cytokines such as IFN- γ , TGF- β and TNF- α were also tested by immunolabelling *in situ* in cryostat sections of the heart and skeletal muscle. **RESULTS:** In this model, the peculiar responses observed, points to the influence of different biomes in the evolution of the infection. The strains Types I and II (Y and 21SF) determined moderate degree of lesions mostly in the myocardium, with low parasitism, a rapid course and total regression of the lesions until 60 days. Differently, the Colombian strain (Type III), was highly pathogenic and determined necrotic inflammatory lesions in the skeletal muscle and myocardium, corresponding to intracellular parasitism. The immunotyping of matrix components showed in the early phase, positive deposits of the matrix components, with predominance of fibronectin, laminin and collagens types I and III in the myocardium and the presence of collagen types III and IV in the skeletal muscle. From the 40th day, type IV collagen predominates in the heart. At the late phase of the infection (60th to 90th days), a clear fragmentation and decrease of all the matrix components were observed. The immunohistochemistry staining, revealed the presence *in situ* of TNF α , IFN γ , and TGF β , detected from 15th to 45th days post-infection, decreasing of intensity until complete disappearance in the 65th day, except for the IFN- γ , which was present into the cells of residual foci of inflammation. **CONCLUSION:** Findings of the present study indicate that the peculiar behavior of *C. callosus* when infected with the Colombian strain, could reflect an affinity of Type III strain, Z1 (*T. cruzi* I), with modulation of the inflammatory process, leading to spontaneous regression of fibrosis independent of the genetic types of collagen involved in this process. This observations suggest an active participation of cytokines in the destruction of intracellular parasites with the participation of TNF α and IFN γ . The early fibrogenesis is possibly mediated by the TGF β , that also controls the infection, with resolution of the inflammation and of fibrosis.

KEY-WORDS: *Calomys callosus*, *Trypanosoma cruzi* strains, Biomes, Collagen, Cytokines

LISTA DE ABREVIATURAS:

FUNASA – Fundação Nacional de Saúde

NK – Natural Killer

CICL – Ciclofosfamida

CD4+ - Linfócitos T CD4+

CD8+ - Linfócitos T CD8+

NO – Nitric Oxide (Óxido Nítrico)

BCG – Bacile Calmette-Guèrin

MMP – Matrix Metalloproteinase (Metaloproteinase)

TIMP – Tissue Inhibitor Metalloproteinase (Inibidor de Metaloproteinase)

IFN- γ – Interferon Gamma (Interferon Gama)

TNF- α – Tumoral Necrosis Factor (Fator de Necrose Tumoral)

TGF- β – Transforming Growth Factor (Fator de Transformação do Crescimento)

IL-10 – Interleukin-10 (Interleucina-10)

INDICE:

1. INTRODUÇÃO	1
1.1. ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS	1
1.2. FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS	2
1.3. PATOLOGIA E PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS	4
1.4. PATOLOGIA EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE CHAGAS	7
1.5. O <i>Calomys callosus</i>	11
1.6. COMPONENTES DA MATRIZ EXTRA CELULAR	16
1.7. A FIBROSE NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL	18
1.8. CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E FIBROGÊNICAS	21
1.8.1. Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)	23
1.8.2. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)	25
1.8.3. Interferon gama (IFN- γ)	26
2. OBJETIVOS	29
3. JUSTIFICATIVA	30
4. MANUSCRITO 1	31
5. MANUSCRITO 2	50
6. MANUSCRITO 3	58
7. DISCUSSÃO	79
8. CONCLUSÕES	92
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	93
10. ANEXOS	110

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS DA DOENÇA DE CHAGAS

A doença de Chagas é uma doença endêmica que foi descoberta e descrita pela primeira vez por Carlos Chagas. É causada por um Tripanosomatídeo, do gênero *Trypanosoma*, cuja espécie *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) pode parasitar uma variedade de vertebrados, incluindo a espécie humana. Em recente revisão sobre o impacto do controle da doença de Chagas na América Latina, DIAS et al., (2002) relataram que, no início da década de 90, a tripanossomíase foi considerada a mais preocupante doença parasitária. Também relatam que, no início daquela década, o número de infectados estaria estimado entre 16 a 18 milhões de pessoas, com registro de queda progressiva para 11 milhões até o final de 1999. Este fato ocorreu devido à implantação de um programa de controle da doença, baseado na eliminação do triatomíneo doméstico, bem como de controles rigorosos nos bancos de sangue e de investigação da transmissão congênita.

Os autores ainda relatam que, no final dos anos 90, países como Uruguai e Chile foram oficialmente declarados livres da doença de Chagas, e também alguns estados brasileiros, como Goiás, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Paraíba, Rio de Janeiro e São Paulo. Mesmo com a eficácia do programa de controle da doença em alguns países da América Latina, os mesmos autores chamam atenção para a questão da erradicação completa, porque existem áreas, que foram submetidas ao programa, onde há registros do reaparecimento do vetor doméstico.

Um outro ponto, que também deve ser considerado, refere-se às regiões do cerrado e charco brasileiro onde existem vetores silvestres que passam a domiciliar áreas outrora livres de triatomíneos domésticos. COURA et al., (2000), recentemente, retrataram a atual situação epidemiológica da doença de Chagas no Brasil, demonstrando que um fator agravante a ser considerado é o relato de espécies secundárias e terciárias, particularmente na região Amazônica, onde pelo menos 10 espécies silvestres de triatoma já foram encontradas infectadas pelo *T. cruzi*. Por isso, embora o programa de controle seja considerado eficaz, recomenda-se a manutenção da vigilância epidemiológica por conta do exposto acima e da persistência de focos de *Triatoma infestans* descritos em alguns estados brasileiros e países adjacentes.

1.2. FORMAS CLÍNICAS DA DOENÇA DE CHAGAS

Durante o processo evolutivo da infecção pelo *T. cruzi*, manifestações clínicas são evidenciadas e caracteristicamente descritas em duas etapas distintas, denominadas de fase aguda e fase crônica.

A fase aguda pode se apresentar na forma aparente (sinal de Romaña ou chagoma de inoculação) e na forma inaparente (sem feição clínica exuberante como na forma anterior).

A fase crônica, de acordo com características distintas, foi dividida na forma crônica indeterminada e crônica cardíaca e/ou digestiva.

Fase aguda: A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada pela proliferação do parasito e sua disseminação pelo sangue ou vasos linfáticos,

afetando muitos tipos celulares, principalmente fibras musculares, resultando no recrutamento de células inflamatórias em grande intensidade (HIGUCHI, 1997). Esta forma compreende fenômenos clínicos clássicos que, embora sejam na maioria das vezes oligoassintomáticos, se manifestam nos primeiros quatro meses de infecção, o que, do ponto de vista laboratorial se confirma pela demonstração do parasito no sangue periférico através de exame direto. Atualmente é bem descrito que o período de incubação na infecção humana ou experimental varia entre 4 e 10 dias, o que corresponde aproximadamente a um período de desenvolvimento de duas gerações de parasito (RASSI et al., 2000).

Na clínica, já está bem estabelecido que a infecção se inicia com um conjunto de manifestações como o sinal de Romaña, descrito desde 1935, que ocorre na porta de entrada do parasito e que consiste na formação de um edema bipalpebral, unilateral, classificado como elástico, indolor e com congestão conjuntival. Outras manifestações gerais, descritas por Chagas em 1916, podem ser evidenciadas, como o aparecimento de febre, acompanhada de mal-estar geral, cefaléia, astenia e hiporexia. Outras alterações sistêmicas ou localizadas como edema subcutâneo, aumento do volume dos linfonodos, e hepato e esplenomegalia, também podem ser observados.

Fase crônica indeterminada: A denominação "forma crônica indeterminada" foi aplicada por Chagas em 1916, quando observou indivíduos infectados pelo *T. cruzi* que não apresentavam o quadro clínico considerado clássico da doença. No sentido de melhor caracterizar esta fase, a I Reunião de Pesquisa Aplicada em Doença de Chagas (1985) referendou o conceito de forma indeterminada, que também tem sido reafirmado por outros autores

(DIAS, 1989 e OLIVEIRA et al., 1986), e que nesta fase o paciente apresenta positividade em exames sorológicos e/ou parasitológicos, com ausência de sintomas e/ou sinais da doença, com eletrocardiograma convencional normal, apresentando coração, esôfago e cólons radiologicamente normais.

Fase crônica cardíaca/digestiva: Na fase crônica pode-se observar, de acordo com a expressão clínica, a forma crônica cardíaca e a forma crônica digestiva. A forma cardíaca manifesta-se em torno de 30% dos indivíduos soropositivos e representa a fase mais tardia e grave da doença, que se caracteriza pela presença de lesões miocárdicas progressivas e miocardite fibrosante (MARIN-NETO, 2000). Segundo dados da Fundação Nacional de Saúde - FUNASA (2000), a forma cardíaca é considerada a principal causa de morte, na qual o paciente apresenta um quadro de insuficiência cardíaca fulminante ou manifesta arritmias graves com morte súbita. Na forma crônica digestiva, o paciente apresenta alterações ao longo do trato digestivo, com lesões dos plexos nervosos (destruição neuronal para-simpática), com conseqüentes alterações da motilidade e morfologia, sendo o megaesôfago e o megacólon as manifestações mais comuns.

1.3. PATOLOGIA E PATOGENIA DA DOENÇA DE CHAGAS

As diferentes formas clínicas da doença de Chagas correspondem a diferentes quadros anatomopatológicos, envolvendo a participação de mecanismos patogênicos complexos. O parasito tem grande importância na fase aguda da doença, pela presença de formas parasitárias no interior das miocélulas cardíacas, determinando a sua destruição e rotura com o

envolvimento de resposta inflamatória decorrente da liberação dos produtos parasitários. Nesta fase o estudo ultraestrutural revelou o papel de células imunes efetoras como os linfócitos granulados (células NK) e os macrófagos que aderem aos miócitos cardíacos levando à sua destruição, e adesão ao endotélio de capilares, determinando uma microangiopatia (ANDRADE et al., 1994). Na forma indeterminada, as lesões são focais e auto-resolutivas, com apoptose de células do infiltrado inflamatório (ANDRADE et al., 1997), o que caracteriza o seu curso benigno. A forma crônica cardíaca se caracteriza pelo desenvolvimento de uma miocardite crônica fibrosante, levando à insuficiência cardíaca congestiva de evolução progressiva e fatal. Os mecanismos envolvidos nas lesões teciduais têm sido ligados à presença de populações celulares envolvidas na resposta imune contra o *T. cruzi* e os processos imunorregulatórios podem estar envolvidos na progressão da forma indeterminada para a forma cardíaca (GAZZINELLI e BRENER, 1991). Foi demonstrado em cães na forma indeterminada que o tratamento com ciclofosfamida (CICL) em baixas doses determina o desenvolvimento de uma miocardite grave, com alterações eletrocardiográficas, sem exacerbação da parasitemia ou do parasitismo tecidual, indicando que este tratamento é capaz de inibir mecanismos supressores da hipersensibilidade tardia (ANDRADE et al., 1987).

Os mecanismos patogênicos na doença de Chagas envolvem fatores ligados ao parasito que estimulam e mantêm as lesões inflamatórias, como tem sido demonstrado por diversos autores (HIGUSHI et al., 1993; JONES et al., 1993). De acordo com DOS REIS, 1997, a presença de parasitos nos tecidos pode ser decisiva para a secreção de citocinas inflamatórias e para a rotura

dos mecanismos de tolerância. Em investigação no modelo canino, foi demonstrada a presença de antígenos parasitários seqüestrados em células dendríticas intersticiais do miocárdio (ANDRADE et al. 2000), as quais, através a sua função de células apresentadora de antígenos ligados ao complexo MHCII, potencializa a estimulação de células T CD4+ do baço na determinação do processo inflamatório do miocárdio.

Apesar destas evidências que demonstram o papel do parasito e de seus antígenos na determinação das lesões na doença de Chagas, os mecanismos de autoimunidade têm sido propostos por diversos autores como importantes na patogênese das lesões determinadas pelo *T. cruzi*. SADIGURSKY et al., (1982) verificaram reação cruzada entre os antígenos do *T. cruzi* e a ATPase do retículo sarcoplásmico do miocárdio de camundongos, sugerindo a sua participação nos mecanismos de autoimunidade. HONTEBEYRIE - JOSKOWICKZ, et al., (1987) demonstraram a transferência por meio de linfócitos T de camundongos cronicamente infectados, de lesão inflamatória de nervo periférico e de reação cutânea de hipersensibilidade tardia, para camundongos singenéticos. Foi descrita por RIBEIRO DOS SANTOS et al., (1992) a rejeição de transplante de coração de camundongos recém-nascidos, implantando na orelha de camundongos singenéticos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, mediada por linfócitos CD4 auto-reativos. TARLETON e ZHANG (1997) postulam, entretanto, que a rejeição só ocorreria na presença do parasito, quer seja injetado no local do transplante, ou infectando o animal após o transplante. Também foi demonstrada reação cruzada entre antígenos do parasito e antígenos próprios do hospedeiro, por CUNHA NETO et al. (1995 e 1996), os quais identificaram um epitopo do *T.*

cruzi, o B13, que mostrou reação cruzada com cadeia pesada da miosina cardíaca, tendo sido testada com resultados positivos de imunoestimulação, em linfócitos cardíacos de pacientes chagásicos. Recentemente, PONTES DE CARVALHO et al., (2002), investigaram o papel de antígenos do coração na miocardite chagásica crônica. Os resultados demonstraram que camundongos tolerizados com antígenos do coração, na presença do adjuvante de Freund e de anticorpo anti-CD4, quando infectados, desenvolviam miocardite menos intensa que os animais não tolerizados.

Deste modo, os fatores patogênicos são ainda controversos, podem estar centrados no parasito e na resposta imune contra os mesmos, ou nos mecanismos de autoimunidade, ou em ambos.

1.4. PATOLOGIA EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE CHAGAS

No sentido de melhor compreender a doença de Chagas em seres humanos, atualmente, a utilização do modelo experimental do camundongo tem mostrado que existem muitos aspectos evolutivos da doença que se assemelham aos do homem. Outros modelos experimentais também têm sido utilizados no sentido de compreender os aspectos anátomo-clínicos da doença de Chagas, a exemplo do cão, que também apresenta manifestações da doença semelhantes às do homem (ANDRADE et al., 1980; ANDRADE, 1984).

Utilizando o modelo murino na doença de Chagas, foi possível sugerir que fatores inerentes ao parasito, como o tipo de cepa, podem determinar uma relação com o quadro histopatológico, o que permitiu a ANDRADE (1974) classificar cepas do *Trypanosoma cruzi* em diferentes biotipos: os Tipos I, II e

III. Foi demonstrado que as alterações teciduais predominantes mantêm uma relação com o tropismo da cepa, determinando um maior grau de parasitismo em diferentes setores do organismo. Assim as cepas do tipo I cujo protótipos são a Y e a Peruana, no 10^o dia de infecção, que corresponde ao dia de maior pico parasitêmico, encontra-se parasitando macrófagos em vários setores do organismo, principalmente no baço, no fígado e nos linfonodos. Na fase mais avançada da infecção aguda, observa-se miotropismo e lesões inflamatórias no coração e músculo esquelético. As cepas de tipo II tendo como protótipos a 12SF e a 21SF, apresentam pico parasitêmico entre os 12^o e 20^o dias de infecção, com lesões predominantes no miocárdio na sua fase aguda, seguido da destruição de fibras parasitadas com conseqüente necrose destas fibras, desencadeando um intenso processo de miocardite. As cepas de tipo III representadas pela cepa Colombiana, apresentam uma parasitemia que evolui lentamente com pico parasitêmico elevado no 30^o dia de infecção e com nítido miotropismo, principalmente em músculo esquelético e miocárdio. As lesões de músculo esquelético apresentam intenso infiltrado inflamatório com necrose de fibras e de parede vascular. Embora fatores inerentes ao parasito sejam importantes na patogenia da doença de Chagas, o papel do hospedeiro deve ser considerado, uma vez que diferentes linhagens de camundongo infectados pela mesma cepa do *T. cruzi* podem apresentar um padrão de maior ou menor susceptibilidade à infecção (ANDRADE et al., 1985c).

Aspectos da fase aguda, no modelo murino, mostram que o rompimento de células parasitadas desencadeia o recrutamento de infiltrado inflamatório de polimorfonucleares e de células mononucleares como monócitos e macrófagos,

caracterizando uma resposta imune inata pelo seu caráter inespecífico (ABRAHAMSOHN, 1998).

Esta resposta inflamatória também é caracterizada por uma ativação policlonal, envolvendo todas as classes de linfócitos TCD4+, TCD8+ e células B, em consequência da exposição ao *T. cruzi* (MINOPRIO et al., 1989c). Tem sido descrito que, na fase aguda da infecção, esta ativação policlonal pode ser responsável por subsequente mecanismo de imunossupressão, o que torna o sistema imune vulnerável, favorecendo, consequentemente, a disseminação e invasão do parasito em novas células (MOSCA et al., 1991).

Na fase aguda, o camundongo desenvolve uma resposta inflamatória com predomínio de infiltrado mononuclear, em que o tipo celular mais abundante é o macrófago. Com o progresso da infecção, estas células são ativadas por diferentes citocinas, a exemplo do IFN- γ , que estimula a síntese de H_2O_2 e metabólitos do óxido nítrico, considerados fortes destruidores de parasitos intracelulares (WIRTH, et al., 1985). Embora os macrófagos desempenhem papel importante no controle da parasitemia, nem sempre eles controlam a infecção, e os parasitos entram na microcirculação sendo novamente fagocitados ou penetrando ativamente em células não-fagocíticas como as células do coração (ANDRADE, 2000). No músculo cardíaco e esquelético os parasitos multiplicam-se formando grandes ninhos parasitários, mantendo inicialmente as estruturas celulares da célula parasitada, até o momento em que os parasitos rompem a célula para invadir novas fibras musculares (GRIMAUD e ANDRADE, 1984). Estudos têm mostrado que a desintegração do parasito no interior da fibra determina alterações na célula levando a um processo de necrose o que estimula o aparecimento de um

infiltrado inflamatório que varia em intensidade e distribuição. Esta necrose de miocélulas foi melhor avaliada quando animais na fase aguda da infecção foram tratados com quimioterápico específico, resultando na destruição do parasito intracelular. Estas alterações progredem para a rotura da célula parasitária, com conseqüente recrutamento de infiltrado inflamatório de células mononucleares e polimorfonucleares (ANDRADE e FREITAS, 1987).

A miocardite chagásica crônica experimental tem sido investigada nos aspectos anátomo-patológicos e na resposta terapêutica (ANDRADE e ANDRADE, 1976). Porém foi minuciosamente descrita por ANDRADE (1990), quando avaliou o papel de diferentes cepas do *T. cruzi* em diferentes linhagens de camundongos, na determinação de lesões na fase crônica da infecção. Este estudo mostrou que as cepas do Biodema tipo III determinaram maior incidência e intensidade das lesões fibrótico-inflamatórias.

ANDRADE e GRIMAUD (1986), avaliando as lesões do miocárdio através de estudo ultraestrutural, puderam identificar os tipos celulares presentes no infiltrado inflamatório, descrevendo a presença de componentes matriciais e demonstrando alterações dos miócitos cardíacos na fase crônica da infecção. Neste estudo, os tipos celulares predominantes foram fibroblastos e macrófagos, que além de estarem em plena atividade fagocitária, apresentavam pontos de junção com cardiomiócitos, apontando uma importância especial do macrófago como célula efetora das alterações miocárdicas. Segundo os autores, estes achados sugerem que a presença de macrófagos no infiltrado inflamatório está associada à destruição focal de miócitos não parasitados, bem como relacionada com os aspectos de fibrogênese.

Posteriormente, ROSSI e SILVA (1990) demonstraram que macrófagos, em contato com miócitos, promoviam permeabilidade na membrana sarcolemal destas células, determinando sua morte. O predomínio destes macrófagos, na fase crônica da infecção, na resposta inflamatória, caracteriza um processo que se assemelha à reação de hipersensibilidade do tipo tardia.

1.5. O *Calomys callosus*

Em revisão feita por ANDRADE (2000) sobre a patologia experimental da doença de Chagas, foram referidos diferentes modelos que são utilizados para responder às questões referentes ao processo evolutivo, mecanismos patogênicos e imunopatologia da doença. Muitos modelos experimentais têm sido utilizados no estudo da doença de Chagas, como o camundongo, o cão, o rato, o coelho, os primatas, o cobaio e animais silvestres como o *Calomys callosus*.

O *Calomys callosus* RENGER, 1830 (Rodentia-Cricetidae) é um gênero autóctone da região sul-americana de porte semelhante ao camundongo e podendo ser encontrado na Argentina, na Bolívia, no Paraguai e nas regiões norte, sul e centro-oeste do Brasil. Estudos comportamentais desta espécie têm demonstrado que o *Calomys* tem ampla importância, pois participa do ciclo de transmissão de microrganismos patogênicos para o homem (apud, MELLO e TEIXEIRA, 1984). O *Calomys callosus* é um modelo que vem sendo utilizado em estudos de infecções virais, uma vez que esta espécie é o principal reservatório e disseminador do vírus Machupo, responsável pela febre hemorrágica na Bolívia (JUSTINES e JOHNSON, 1969). Sua utilização em

infecções experimentais com *Plasmodium bergeri*, *Leishmania amazonensis*, *Hymenolepis nana* e *Schistosoma mansoni* está bem descrita na literatura (MELLO, 1979; MELLO e TEIXEIRA, 1984, LENZI et al., 1995). Esta espécie também já foi descrita como reservatório natural de cepas silvestres do *Trypanosoma cruzi* (RIBEIRO, 1973 e MELLO e TEIXEIRA, 1977) e, atualmente é um modelo que vem sendo empregado em estudos de infecção experimental com diferentes cepas do *T. cruzi* (MELLO et al., 1979; BORGES et al., 1982, BORGES et al., 1992).

Estudos referentes à resposta do *Calomys callosus* infectado com *T. cruzi* foram inicialmente realizados com cepas silvestres (MELLO e TEIXEIRA, 1977; BORGES e MELLO, 1980). Um dos trabalhos pioneiros, referente ao estudo comparativo da evolução da infecção causada pelo *T. cruzi* no *C. callosus* e em camundongos infectados com a cepa Y e Berenice, demonstrou que ambos apresentaram alterações características da miocardite chagásica, diferindo contudo na mortalidade que foi de 100% no camundongo e nula no *C. callosus* (BORGES et al., 1982).

A resposta inflamatória na evolução da infecção pelo *T. cruzi* no *C. callosus* tem apresentado o macrófago como o tipo celular predominante, que possui um papel crítico no controle e na eliminação do parasito, sugerindo haver uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (ANDRADE et al., 1994). Estudos *in vitro* com macrófagos peritoneais do *C. callosus* infectado com o *T. cruzi* demonstraram que quando ativados, liberam grandes quantidades de H₂O₂, semelhante aos de camundongo (BORGES et al., 1992; (BORGES et al., 1994).

Considerando-se a importância do IFN- γ na ativação de macrófagos, BORGES et al. (1994) avaliaram, através de ensaio de inibição, os níveis séricos de IFN- γ de *Calomys* infectado com a cepa M226 do *T. cruzi*. Os resultados demonstraram que o IFN- γ apresentou concentração mais elevada (3.500 U/ml) no 14^o dia de infecção, período este que precedeu o pico parasitêmico (17^o dia). Posteriormente, BORGES et al. (1995), tentando compreender alguns mecanismos imunorregulatórios envolvidos na infecção pelo *T. cruzi* em animais silvestres, avaliaram os níveis de IFN- γ no soro destes animais na fase aguda e na fase crônica na infecção com as cepas F, Y, Costalimai e M226. Verificaram que, na fase aguda, os níveis séricos de IFN- γ no *Calomys* foram bastante elevados e na fase crônica o IFN- γ foi ausente. Os autores ainda avaliaram comparativamente, em *Calomys* e camundongos suíços infectados com quatro cepas de *T. cruzi*, os níveis de IFN- γ e a liberação de H₂O₂ por macrófagos peritoneais mantidos em placas de cultura. Os resultados mostraram que a resposta do *Calomys* mantinha uma correlação positiva entre os níveis de IFN- γ e a liberação de H₂O₂ bem como a capacidade de controlar lesões teciduais, o que não foi observado nos camundongos, pois as lesões teciduais foram progressivas. Estes dados sugerem que o *Calomys* desenvolve um mecanismo de adaptação na relação parasito-hospedeiro que pode ser importante para avaliar o seu papel como reservatório natural do *T. cruzi*.

Estudos *in vivo* e *in vitro* têm mostrado que macrófagos de camundongos quando ativados pelo IFN- γ expressam grandes quantidades de óxido nítrico (NO) e este produto possui um papel importante na eliminação de diversos parasitos intracelulares (MURRAY et al., 1985).

Em um estudo comparativo referente à síntese de NO, macrófagos de camundongo ou de *Calomys*, infectados com as cepas F e M226 do *T. cruzi*, foram estimulados *in vitro* com IFN- γ e verificou-se que, diferentemente do camundongo, o *calomys* não produziu NO. Para confirmar estes dados as duas espécies foram inoculadas intraperitonealmente com Tioglicolato, BCG (Bacile Calmette-Guèrin) e periodato (ativadores inespecíficos de macrófago) e que apenas os macrófagos de camundongos responderam positivamente, aos diferentes estimuladores, com níveis elevados de NO. Estes dados sugeriram que o *C. callosus* provavelmente apresenta um mecanismo de controle da infecção distinto do camundongo, que independe da síntese de NO (de OLIVEIRA et al., 1997).

O *C. callosus* apresenta uma peculiar capacidade de controlar infecções causadas por diferentes patógenos. Na infecção pelo *Schistosoma mansoni*, por exemplo, apresentam pequenos granulomas situados no espaço porta e no parênquima hepático, com necrose focal e poucos depósitos de matriz extracelular. O infiltrado inflamatório e a fibrose portal, observados no *C. callosus*, são mínimos ou mesmo ausentes, quando comparados ao observado no modelo murino (LENZI et al., 1995). Na infecção pelo *T. cruzi*, foi demonstrada por ANDRADE et al. (1994), esta mesma capacidade de controlar a infecção, bem como de resolver as lesões fibrótico-inflamatórias determinadas pelo parasito. Os autores mostraram que o *Calomys* infectado com a cepa F apresenta pico parasitêmico no 21^o, dia que vai decaindo até ficar negativo no 40^o dia, e este período de negativação ocorre igualmente com outras cepas do *T. cruzi* (BORGES et al., 1992). O estudo demonstrou que o infiltrado inflamatório foi predominantemente de macrófagos, com poucos

parasitos intracelulares presentes e as lesões variaram de moderadas a muito intensas, atingindo principalmente músculo esquelético. Embora este estudo tenha demonstrado que o *C. callosus*, quando infectado com a cepa F, desenvolve lesões teciduais e fibrose intensas, foi observada regressão espontânea destas lesões, mesmo com a permanência da infecção, comprovada por testes parasitológicos positivos (ANDRADE et al., 1994).

Comparado ao camundongo, o *C. callosus* tem sido descrito como um modelo de resistência à infecção pelo *T. cruzi*. Pode sobreviver com altos inóculos de cepas consideradas virulentas ou patogênicas, controlam a infecção e apresentam padrão nulo de mortalidade (BORGES et al., 1992). Entretanto, este animal mostra também alta suscetibilidade à infecção, pois desenvolve intenso parasitismo e extensas lesões de músculo esquelético quando infectado com cepas do Biodema Tipo III, como a F e a Colombiana (ANDRADE et al., 1994, MAGALHÃES-SANTOS et al., 2002). Como o *C. callosus* apresenta peculiaridades referentes à capacidade de controlar a parasitemia e modular a fibrose de forma espontânea (ANDRADE et al., 1994, LENZI et al., 1995), torna-se um modelo interessante para o estudo dos possíveis mecanismos imunomodulatórios que podem estar envolvidos na fibrogênese da miocardite chagásica crônica.

1.6. COMPONENTES DA MATRIZ EXTRACELULAR

A matriz extracelular pode apresentar variações morfológicas importantes dependendo da quantidade de tecido conjuntivo elástico ou fibroso depositado no interstício (ANDRADE, 1992). Está bem descrito que existe inicialmente um acúmulo de proteínas fibrosantes e depósitos de colágeno, que se dispõem nas áreas de lesão tecidual no sentido de reconstituir espaços teciduais danificados. Inicialmente se verifica que o colágeno III é um dos primeiros componentes da matriz que aparece no interstício, pois é uma molécula abundante em vasos sanguíneos. Com a evolução do processo, os fibroblastos iniciam deposição do colágeno tipo I, considerado importante constituinte da cicatriz e logo se sobrepõe em quantidade aos depósitos de colágeno tipo III, que diminuem gradativamente com a evolução do processo. De forma simplificada, verifica-se que este processo é uma combinação do recrutamento de diferentes tipos celulares e sinalização bioquímica que estimulam proliferação e ativação celular, liberando produtos que vão contribuir na reorganização da matriz extracelular (DAVIDSON e BENN, 1996).

O colágeno é uma proteína do tecido conectivo e que pode ser encontrado em diferentes tecidos. Apresenta diferentes funções, porém as mais importantes são compor a estrutura e sustentar órgãos. Existem pelo menos 10 tipos de colágeno geneticamente distintos descritos em mamíferos e todos apresentam uma estrutura básica. A molécula do colágeno consiste de três cadeias alfa polipeptídica composta por 1000 aminoácidos e com seqüências repetitivas de glicina-prolina. A molécula organiza-se em forma de

tríplice hélice e são secretadas no meio extracelular via complexo de Golgi, em forma de pró-colágeno (PELTONEN, et al., 1985).

Aspectos referentes à regressão da fibrose na miocardite chagásica crônica experimental estão bem descritos em animais submetidos a tratamento com quimioterápico (ANDRADE et al., 1991). Contudo, os mecanismos imunomoduladores, que possivelmente estão envolvidos neste processo, precisam ser investigados.

A degradação da matriz extracelular é um processo que requer a participação de enzimas proteolíticas chamadas de metaloproteinases (MMP- Matrix Metalloproteinases) e a participação delas na regressão da fibrose está bem descrita na literatura, no modelo experimental da esquistossomose (GOMEZ et al., 1999).

As metaloproteinases têm sido identificadas, seqüenciadas e clonadas, estando divididas em três grupos: colagenases, estromelisinases e gelatinases. Colagenases intersticiais, a exemplo da MMP-1, atuam na degradação de 40% do colágeno tipos I e III recém formados em diferentes tecidos. As colagenases são enzimas que dependem de zinco e cálcio para atuarem na clivagem do colágeno, promovendo a transformação da tríplice hélice da fibra colágena em cadeias peptídicas colágenas (VARO et al., 2000).

No processo da fibrólise, as mesmas células que sintetizam componentes da matriz extracelular são também estimuladas a liberar estas enzimas proteolíticas (metaloproteinases), clivando moléculas de colágeno, proteoglicanos e elastina, levando à sua desintegração.

Conceitualmente, a fibrose resulta em um balanço entre síntese e degradação da matriz extracelular, requerendo a participação de

metaloproteinases e de seus inibidores específicos (TIMP-Tissue Inhibitor of Metalloproteinases) que modulam a ação das metaloproteinases. Neste processo de regulação, as próprias células que antes promoviam a degradação da matriz agora são estimuladas por citocinas e quimiocinas a produzir estes inibidores específicos de metaloproteinases (EDWARDS et al., 1987).

A família dos inibidores de metaloproteinases TIMPs possuem quatro membros que são mais estudados TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, e são sintetizados por muitas células do tecido conectivo e também por macrófagos (VARO et al., 2000). Sua presença determina a modulação do processo de fibrólise, pois atua diretamente sobre as metaloproteinases, inibindo sua capacidade proteolítica. Este mecanismo regulador tem sido descrito em doenças parasitárias, como a esquistossomose (GOMEZ et al., 1999; VAILLANT et al., 2001). Entretanto, na doença de Chagas, estudos referentes aos mecanismos moduladores da fibroclasia precisam ser investigados, pois os relatos mais recentes, em modelo experimental, tratam da regressão da fibrose, avaliando aspectos de degradação dos componentes da matriz (ANDRADE et al., 1991; MAGALHÃES-SANTOS et al., 2002).

1.7. A FIBROSE NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

A inflamação é uma resposta local, onde se pode verificar o recrutamento de diferentes tipos celulares por processo de quimiotaxia. A regeneração do parênquima ocorre de forma harmônica quando se pode observar a participação de fibroblastos produzindo localmente elementos da matriz extracelular. Alguns aspectos deste processo devem ser considerados,

pois se refletem na regulação do crescimento e diferenciação de vários tipos celulares. Verifica-se uma sucessão de eventos, com liberação de citocinas que vão atuar especificamente, via receptores, em diferentes tipos celulares, no sentido de estimular a síntese e deposição de componentes da matriz extracelular, que conseqüentemente contribui e facilita a reorganização tecidual (DAVIDSON e BENN, 1996).

Durante o processo inflamatório, a matriz é progressivamente modificada, ocorrendo o depósito de componentes como glicoproteínas e outras moléculas protéicas, favorecendo o aparecimento de diferentes tipos celulares, como fibroblastos, que estão diretamente relacionados com o processo evolutivo da fibrose (MONTENEGRO e FECCHIO, 1992).

Sabe-se que a inflamação crônica resultante de doenças parasitárias é um potente promotor de deposição de matriz intersticial. Contudo quando o agente etiológico é removido, regride a inflamação e conseqüentemente há uma reabsorção da matriz depositada no interstício resultando no restabelecimento tecidual (ANDRADE, 1994).

O estudo da fibrose na miocardite chagásica crônica em camundongos infectados com cepas dos Biodemas tipo II e III do *T. cruzi* demonstrou a presença de fibroblastos em atividade de síntese e com abundante matriz colagênica, predominando colágenos dos tipos III e IV, sugerindo associação entre o processo inflamatório e a fibrogênese na miocardite chagásica crônica (ANDRADE e GRIMAUD, 1986).

Estudos *in vitro* têm demonstrado que células como fibroblastos, quando mantidas em meio de cultura juntamente com célula muscular lisa da aorta e células miocárdicas infectadas com *T. cruzi*, proliferam e sintetizam proteínas.

Este fato fortalece a hipótese de que o parasitismo de cardiomiócitos resulta no estímulo de fibroblastos na síntese de fatores que podem iniciar o processo de fibrose na cardiomiopatia chagásica (WYLER, et al., 1987).

Na infecção pelo *T. cruzi* do camundongo, a miocardite tem se manifestado com intensa fibrose, correlacionada ao processo inflamatório no qual os macrófagos são os principais tipos celulares envolvidos na ativação de fibroblastos a sintetizar componentes da matriz (ANDRADE e GRIMAUD, 1986).

Recentemente foi demonstrado *in vitro* a possibilidade da influência de antígenos naturalmente liberados pelo *T. cruzi* ligarem-se a linhagens de células (muscular e fibroblastos) e estimular a síntese de componentes da matriz extracelular. Estes dados reforçam a idéia de que, *in vivo*, antígenos liberados pelo *T. cruzi* podem estar envolvidos na manutenção da inflamação pois podem se ligar à células hospedeiras não infectadas estimulando uma resposta imune contra antígenos parasitários, modulando funções biológicas de células envolvidas na síntese de componentes da matriz (PINHO et al., 2002).

Na doença de Chagas experimental, o estudo das alterações fibrótico-inflamatórias do coração no modelo do camundongo cronicamente infectado pelo *T. cruzi* foi desenvolvido por ANDRADE et al. (1989). Neste estudo, os autores demonstraram através, da imunotipagem dos componentes da matriz, que existe uma seqüência de deposição dos componentes matriciais que são distintos nas diferentes fases evolutivas da infecção pelo *T. cruzi*. Foi observado que, na fase sub-aguda, componentes tais como fibronectina, laminina e colágeno tipo III predominavam no interstício do miocárdio; ao atingir as fases sub-aguda tardia e crônica observou-se uma nítida diminuição da

fibronectina com significativo aumento da laminina e colágenos tipos III e IV, e na fase crônica tardia predominavam depósitos de colágenos tipos III e IV. Isto aventou a possibilidade de que o processo de fibrose cardíaca poderia ser reversível, uma vez que os tipos de colágeno presentes na fase inicial da fibrose diferiam da fase crônica. Posteriormente, o mesmo grupo demonstrou que a reversão da fibrose cardíaca no camundongo cronicamente infectado pelo *T. cruzi* ocorria juntamente com a regressão da inflamação após o tratamento com quimioterápico específico e cura da infecção (ANDRADE et al., 1991). As observações acima descritas fortemente demonstram haver uma relação da fibrogênese com o processo inflamatório, indicando que a regressão das lesões após quimioterapia poderia, de alguma forma, contribuir para a regressão da fibrose.

1.8. CITOCINAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E FIBROGÊNICAS

O processo de reparo, como já foi referido anteriormente, requer uma série de eventos coordenados que envolvem migração, divisão e diferenciação de uma variedade de tipos celulares, que se deslocam para o local da lesão, mediante uma resposta inflamatória. Neste processo, o papel de citocinas e quimiocinas é bastante discutido, uma vez que algumas famílias são consideradas de efeito fibrogênico e outras de efeito anti-fibrogênico (KOVACS, 1991).

Existem diferentes moléculas que participam no processo de recomposição da matriz extracelular, que são denominadas de fatores de crescimento, como quimiocinas e citocinas. Muitas destas moléculas são

produzidas por células musculares, endoteliais e epiteliais, por fibroblastos e também por macrófagos, que liberam quimiocinas como TGF- β (Transforming Growth Factor-beta) e que contribuem no processo de reparo tecidual, estimulando o aumento da matriz intersticial, levando a um quadro de fibrose (BRANTON e KOPP, 1999).

A participação de citocinas na resposta imune inata (IFN- γ , TNF- α) e adquirida (IL-10), durante a infecção pelo *T. cruzi* é bastante evidente principalmente durante a fase aguda da infecção, em que o parasitismo é elevado (ABRAHAMSOHN, 1998). Sabe-se que na fase aguda existe uma resposta imune inata, em que células NK liberam grandes quantidades de IFN- γ que vão estimular macrófagos a liberar o óxido nítrico (NO), que leva à destruição dos parasitos (CARDILLO et al., 1996). Em uma fase mais tardia da infecção, citocinas podem ser mantidas ou mesmo ser neo-sintetizadas no sítio da lesão, em resposta aos antígenos parasitários presentes *in situ*, estimulando a resposta inflamatória (TEIXEIRA et al., 2002).

Citocinas que atuam no contexto da resposta imune durante a infecção pelo *T. cruzi* também estão envolvidas na determinação da resistência ou susceptibilidade à infecção experimental. O IFN- γ e o TNF- α estão associados à resistência à infecção, porque podem estimular macrófagos a destruir parasitos (ABRAHAMSOHN, 1998), e também contribuir na determinação das lesões teciduais em que há destruição parasitária na fase aguda da doença (LIMA et al., 2001). A IL-10 e o TGF- β constituem fatores que vão determinar a exacerbação da doença (SILVA et al., 1992), pois são potentes inibidores da atividade tripanocida de macrófagos, caracterizando um perfil de susceptibilidade no modelo experimental murino (SILVA et al., 1991).

1.8.1. Fator de transformação do crescimento beta (TGF- β)

A família do TGF- β é composta por peptídeos homodiméricos de 25kDa. Existem três tipos distintos da molécula (TGF- β 1, β 2 e β 3), que foram identificados em seres humanos e apresentam atividades biológicas semelhantes (SLAVIN, 1996). Embora as três isoformas de TGF- β sejam citadas como estimuladoras de fibrose, o TGF- β 1 tem demonstrado maior efeito estimulador de fibroblastos na síntese de pró-colágeno (COKER et al., 1997).

A família do TGF-beta, juntamente com outras moléculas geneticamente relacionadas, apresentam propriedades quimiotáticas, de proliferação e ativação celular. Estudos *in vitro* têm procurado responder questões a respeito de seus efeitos biológicos e o seu papel *in vivo* ainda é discutido. Sabe-se que esta molécula é sintetizada por tipos celulares como macrófagos ativados, fibroblastos e linfócitos (SLAVIN, 1996) e parece ser de grande importância biológica, principalmente na fase aguda da inflamação (KANE et al., 1991).

Também tem sido descrita como potente mitógeno para macrófago, células musculares e osteoblastos, enquanto um efeito inibitório seu é observado no crescimento de células endoteliais, epiteliais e de linfócitos estimulados em cultura (SLAVIN, 1996).

Existem evidências de que o TGF- β também apresenta atividade quimiotática para fibroblastos e macrófagos e tem um papel metabólico importante no processo de modulação do acúmulo de componentes da matriz extracelular (DAVIDSON e BENN, 1996). Estudos *in vivo* têm demonstrado que

esta molécula pode diretamente regular a síntese de componentes da matriz extracelular e que quando neutralizada pelo seu antagonista a expressão do gene que estimula a produção desta matriz é reduzida, inibindo a fibrose miocárdica. Este fato sugere que o TGF- β 1, especialmente, media o processo de fibrose pelo aumento de depósitos matriciais no interstício (LIJNEN et al., 2000). Em algumas circunstâncias o TGF- β pode exercer função ativadora ou inibidora no processo de fibrose ou seja, pode estimular a síntese de pró-colágeno ou estimular fibroblastos a sintetizar inibidores de metaloproteinases TIMP-1 no controle da degradação da matriz (SLAVIN, 1996). Portanto o TGF- β é uma molécula especial porque, além de modular o processo de reparo, atraindo diferentes tipos celulares para o local da lesão, promovendo inicialmente a síntese e liberação de componentes matriciais, também atua como auto-regulador desta fibrogênese estimulando a síntese de metaloproteinases, como também de seus inibidores específicos.

Estudos referentes à expressão e o envolvimento do TGF- β no desenvolvimento da cardiopatia chagásica são escassos. Na infecção humana, tem sido mostrada a presença do TGF- β *in situ*, que está fortemente associada com a fibrose miocárdica em diferentes estágios da doença (ARAÚJO-JORGE et al., 2002).

Como molécula reguladora, o TGF- β tem sido investigado na infecção experimental, estando associado com a invasão intracelular do parasito, pois regula a atividade tripanocida de macrófagos, permitindo um aumento na parasitemia e exacerbação da doença (SILVA et al., 1991). Recentemente foi descrita a presença do TGF- β no baço, desde a fase aguda da infecção, embora seus níveis fossem mais elevados na fase mais tardia da infecção

(ZHANG e TARLETON, 1996). Este achado sugere que a presença do TGF- β , e de outras citocinas que persistem durante o curso da infecção, pode estar estimulando a persistência do parasito e conseqüentemente a resposta imune (ZHANG e TARLETON, 1996).

1.8.2. Fator de necrose tumoral alfa (TNF- α)

O TNF- α é uma proteína transmembrana polipeptídica de 26 kDa, que na sua forma nativa é solúvel. Liga-se ao seu respectivo receptor, desencadeando uma série de eventos intracelulares, resultando na ativação de fatores de transcrição induzindo à expressão de genes importantes para eventos biológicos distintos como crescimento e morte celular (CHEN e GOEDDEL, 2002). O TNF- α é um mediador da imunidade inata e adquirida, ocasionando uma ligação importante entre a resposta imune específica e a inflamação aguda. É considerada uma citocina pró-inflamatória, estimulando células leucocitárias a destruir microorganismos, e é também envolvida no processo de apoptose (FRIEDMAN, 1999).

É um homotrímero sintetizado em grandes quantidades, principalmente em macrófagos ativados, e pode saturar seus receptores, que estão presentes em quase todos os tipos celulares, levando a um quadro de necrose hemorrágica (CHEN e GOEDDEL, 2002; KOVACS, 1991).

O TNF- α pode atuar tanto como ativador ou como inibidor de resposta imune. O(s) mecanismo(s) que permitem esta dualidade ainda é(são) discutido(s). No processo da fibrogênese, o TNF- α liberado em baixas concentrações estimula a proliferação de fibroblastos e em altas concentrações

bloqueia a síntese de outras citocinas (KOVACS, 1991). Recentemente, foi demonstrado que o TNF- α , juntamente com a IL-1 β , em cultura de fibroblastos cardíacos de rato, determinou a diminuição da síntese de colágeno e a ativação de metaloproteinases responsáveis pela degradação de colágeno (SIWIK et al., 2000). Neste caso observa-se um papel antagonista do TNF- α na fibrogênese.

Na cardiopatia chagásica experimental, o TNF- α tem sido demonstrado na fase aguda, sendo considerado importante potencializador da atividade tripanocida de macrófagos quando atuando sinergicamente com o IFN- γ (MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992). Estas evidências tem sugerido um papel protetor do TNF- α na fase aguda da infecção (LIMA et al., 1997), pois tem sido demonstrado *in vitro* que, em fase mais avançada da infecção, os níveis de TNF- α diminuem (BORGES et al., 1998).

Recentemente, LIMA et al. (2001) demonstraram, no baço a presença do TNF- α em sítios de destruição parasitária, na infecção aguda com a cepa Peruana do *T. cruzi*. A presença do TNF- α nas lesões teciduais sugere a importância desta citocina na destruição de macrófagos parasitados e também no estabelecimento da necrose.

1.8.3. Interferon gama (IFN- γ)

O IFN- γ é uma glicoproteína homodimérica que é sintetizada principalmente por linfócitos Th1 CD4+ e células NK e tem papel de mediador da resposta imune, bem como de estimular a síntese de outras citocinas, como IL-2 e IL-12 (ABBAS et al., 1994).

O IFN- γ é considerado um importante ativador de fagócitos mononucleares, como macrófagos e estimulador da degradação da matriz extracelular, ou seja, é uma citocina anti-fibrogênica (FRIEDMAN, 1999). Existem indicações de que o interferon gama pode ter dois papéis na patogênese da fibrose pulmonar, ou seja, precocemente promove ativação de macrófagos e tardiamente inibe a síntese de colágeno (KOVACS, 1991).

O papel do IFN- γ como citocina anti-fibrogênica é bastante investigado. Tem sido demonstrado que o interferon age nos fibroblastos, inibindo a síntese, principalmente, dos colágenos tipo I e III, bem como da fibronectina (DUNCAN e BERMAN, 1985). GRANSTEIN et al. (1987) também demonstraram *in vivo* que o IFN- γ exógeno, quando aplicado em área fibrótica, promove a sua desintegração, sugerindo que esta molécula pode ser utilizada no tratamento de doenças caracterizadas pelo excesso de fibrose.

A participação do IFN- γ na diminuição da fibrose tem sido investigada em diferentes patologias, tanto em seres humanos como em modelos experimentais. AGARWAL e BEHERA (2000), investigando casos de fibrose pulmonar em animal, incluindo seres humanos verificaram que a terapia com IFN- γ melhora o quadro de fibrose pulmonar. Outros autores também demonstraram o mesmo efeito do IFN- γ na reversão da fibrose submucosa da cavidade oral, com redução dos depósitos de colágeno (HAQUE et al., 2001) e, mais recentemente, na regulação da fibrose periportal de indivíduos infectados com o *Schistosoma mansoni* (HENRI et al., 2002). Existem relatos que contradizem o efeito anti-fibrogênico do IFN- γ para determinadas patologias, como no tratamento para redução da fibrose na mielofibrose idiopática (HEIS-VAHIDI-FARD et al. 2001).

O papel do IFN- γ na doença de Chagas experimental foi inicialmente relacionado ao padrão de resistência à infecção pelo *T. cruzi*, pelo seu potencial de ativar macrófagos para destruir o parasito (REED, 1988). Posteriormente, foi demonstrado que TNF- α , juntamente com o IFN- γ , agem sinergicamente potencializando a síntese de óxido nítrico por macrófagos ativados para destruir o *T. cruzi* (MUNOZ-FERNANDEZ et al., 1992).

Considerando a utilização de modelos experimentais para compreender alguns mecanismos imunológicos de combate ao *T. cruzi*, é clássico na literatura que macrófagos de camundongos, quando ativados pelo IFN- γ , expressam grandes quantidades de óxido nítrico, e este possui um papel importante na eliminação dos parasitos intracelulares. Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que macrófagos obtidos de *C. callosus* infectados pelo *T. cruzi*, quando ativados pelo IFN- γ , não produzem óxido nítrico ou estão presentes em pequenas quantidades apenas no 40^o dia de infecção (OLIVEIRA et al., 1997). Embora o *C. callosus* não expresse quantidades significantes de NO, como mencionado acima, estudos demonstraram *in vitro* que os macrófagos de animais infectados produziavam grandes quantidades de H₂O₂, associada a níveis elevados de IFN- γ no sangue, e com queda da parasitemia (BORGES et al., 1994; BORGES et al., 1995).

2. OBJETIVOS:

1- Investigar a patogenicidade, o histotropismo e a fibrose determinados pela infecção do *Calomys callosus* com cepas de diferentes biotopos do *Trypanosoma cruzi* (**Manuscrito 1**).

2- Identificar diferentes componentes da matriz extracelular que participam na fibrogênese e fibroclasia no coração e músculo esquelético de *C. callosus* infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi* (**Manuscrito 2**).

3- Identificar e expressão de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α e IFN- γ) e fibrogênica (TGF- β) no coração e músculo esquelético de *C. callosus* infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi* (**Manuscrito 3**).

3. JUSTIFICATIVA:

A resposta inflamatória do *Calomys callosus* na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* apresenta desde a sua fase inicial, um infiltrado composto de células mononucleares, principalmente de macrófagos e poucos linfócitos, além de polimorfonucleares quando há destruição parasitária. Este tipo de resposta é característico da imunidade inata, que em seres humanos é referido como componente-chave da resistência do hospedeiro a protozoários.

O *Calomys callosus* como um modelo de resistência à infecção pelo *T. cruzi*, tem sido alvo de investigação em diferentes aspectos. Entretanto, os possíveis mecanismos imunomoduladores envolvidos na determinação das lesões precoces descritas no modelo, precisam ser investigados.

O estudo evolutivo da fibrose e de sua regressão no *Calomys callosus* poderá contribuir para o conhecimento de mecanismo(s) que determina(m) o estabelecimento da miocardite fibrosante na doença de Chagas. Estes aspectos são importantes para o entendimento da relação parasito-hospedeiro, principalmente por se tratar de uma espécie que é reservatório natural do *Trypanosoma cruzi*, o que torna este animal um modelo interessante para esta investigação.

4. MANUSCRITO 1

Infection of *Calomys callosus* (*Rodentia cricetidae*) with strains of different *Trypanosoma cruzi* biotopes: pathogenicity, **histotropism and fibrosis induction.**

Isis Fernandes Magalhães-Santos, Márcia Maria Souza, Carolina Silva Costa Lima, Sonia G. Andrade*

Laboratório de Doença de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular e Laboratório de Patologia Experimental, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz-Fiocruz, Rua Valdemar Falcão 121, 40295-001 Salvador, BA, Brasil.

The influence of different Trypanosoma cruzi biotopes on the evolution of the infection and on the histopathological lesions of the heart and skeletal muscles, during the experimental infection of Calomys callosus, was investigated. Three groups of C. callosus were infected, respectively, with parasite strains representatives of three different Biotopes: Type I (Y strain), Type II (21 SF strain) and Type III (Colombian strain). For each group, normal C. callosus were also used as controls. Marked differences have been detected in the behavior of the three strains in this model.

The strains Types I and II (Y and 21 SF) determined moderate lesions, mostly in the myocardium, with low parasitism, a rapid course and total regression of the lesions by the 60 day of infection. Differently, Type III strain (Colombian), was more pathogenic for C. callosus and induced necrotic-inflammatory lesions in skeletal muscles and myocardium, in correspondence to intracellular parasitism. Proliferation of fibroblasts and amorphous matrix deposits, followed by interstitial fibrosis were present. Progressive regression of the inflammatory changes and collagen deposits occurred spontaneously. The progression and regression of both inflammation and fibrosis induced by the Colombian strain were further submitted to quantitative evaluation by morphometry. Results of the morphometric studies presented good correlation with the histopathological findings. The results confirm the importance of the different biotopes in the determination of tissue lesions and the peculiarities of response of C. callosus to infection with T. cruzi.

Key words: *Calomys callosus* - *Trypanosoma cruzi* - biotopes - histopathology - morphometry
fibrosis, inflammation.

+Corresponding author. +Fax: 55 - 71-356-4292.

E.mail: sgandrade @cpqgm.fiocruz.br

INTRODUCTION

Since the initial Chagas' studies (1909), there were references to the inoculation of different animal species with *Trypanosoma cruzi*, with the objective to study the evolution of infection in vertebrates.

The patterns of the lesions determined in different experimental models by the inoculation with different strains of *Trypanosoma cruzi* have varied on the dependence of the combined influence of parasite strain and animal species. In the murine model, a diversity of responses were also observed in relation to high or low susceptibility of the inbred strains used (Andrade et al, 1985). Comparative studies on the influence of several strains of *T. cruzi* in *C. callosus* and mouse infections have previously been performed by Borges et al (1992). They used inoculation with the Y strain from human origin, and with the Costalimai and M226 strains, from silvatic origin. Contrary to the murine model, *C. callosus* controlled the parasitemia and showed regression of the lesions within a few days. However, when the infection was caused by the F or Colombian strains (Type III Biodeme strains), a high susceptibility was disclosed, with intense parasitism of myocardium and skeletal muscles and intense inflammatory and fibrotic lesions, that spontaneously subsided (Andrade et al. 1994, Magalhães-Santos et al, 2002).

Considering the peculiarities of *C. callosus* responses to *T. cruzi* from different biotopes, belonging to Types I, II and III (Andrade 1974, Andrade and Magalhães, 1997), the patterns of infection by *T. cruzi*, and the histopathological lesions induced in this host, have herein been investigated.

In a previous study, the process of fibrogenesis and collagen resorption, determined by the Colombian strain of *T. cruzi* in the *C. callosus* model, has been investigated with the objective of characterizing the components of the extracellular matrix involved and to determine the genetic types of collagens predominant in this process (Magalhães-Santos et al, 2002). Results of that investigation indicated the presence of the collagens types I, III and IV. Regardless of the genetic type of collagen, the modulation of the inflammatory process and the control of parasite multiplication resulted in the resorption of collagen.

In the present study, it was observed that the strains of type I (Y) and Type II (21SF) do not determine a significant increase in collagen deposits as compared with normal controls and the infection is soon controlled, leading to the regression of inflammation and parasitism.

For a better evaluation of the inter-relationship between these processes, a morphometric evaluation of the collagen deposits and inflammation areas of the myocardium and skeletal muscles of Colombian strain-infected *C. callosus* was performed.

Results indicated that the strains of three different biotopes behave differently in the *C. callosus* infection, which confirms the importance of parasite strain characteristics on the determination of lesions in the vertebrate host. A peculiar response of *C. callosus* to infection with Biotope Type III, related to fibrogenic process, was also detected and quantitatively evaluated.

MATERIAL AND METHODS

Experimental animals – Ninety-five *C. callosus* raised, in animal facilities at Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz, were used in this study. The experimental animals were approximately 60-day old males, weighing 20-30g. Their maintenance and handling complied with the guidelines for the human use of laboratory animals.

Strains of T. cruzi - Twenty five *C. callosus* were infected with the Y strain of *T. cruzi* (Biotope Type I, Zimotope Z2b); 25 were infected with the 21SF strain (Biotope Type II, Z2, *T. cruzi* II); 30 *Calomys* infected with the Colombian strain (Biotope Type III, Z1, *T. cruzi* I. For each infected group, 5 normal controls were studied.

Inoculum – Consisted of 10^5 trypomastigote forms per animal. Parasites were obtained from the blood of infected mice, washed three times with PBS by centrifugation, and inoculated intraperitoneally.

Mortality - Cumulative mortality was evaluated during the course of infection for all the experimental groups.

Parasitemia – This was evaluated three days a week, by counting the parasite numbers in 50 high power (x 400) fields by microscopic examination of peripheral blood under coverslips (22 x 22 mm).

Histopathology – For histopathological study, three *C. callosus* per point were sacrificed by exsanguination under anesthesia, 7, 10, 15, 25, 30, 40, days post-infection for the Y strains (Type I) and 10, 15, 25, 30, 40 and 60 days for the 21 SF strain (Type II).

As for the Colombian strain (Type III), sacrifice occurred at 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 60, 65 and 70 days post-infection.

Fragments of the heart and skeletal muscles were fixed in formalin, paraffin-embedded and the 5 µm-thick sections obtained were stained with hematoxylin and eosin (H & E).

Picro-Sirius staining method was used for collagen identification in paraffin sections of the heart and skeletal muscle with Rot-Sirius 3 (Chroma Gessellschaft) in a saturated aqueous solution of picric acid and fast green as a counterstain (Junqueira et al. 1979) . Sections were examined with direct light and with bright field light optics using a Zeiss photo microscope.

Morphometry - Quantitative evaluation of inflammation and fibrosis were performed in heart and skeletal muscle of *C. callosus*, infected with the Colombian strain, at different evolutive phases of the infection: early phase, 25 days; intermediary phase, 30 days; advanced phase, 40 days; and late phase, 60 days. For the evaluation of both inflammation and fibrosis, a total area of 12mm² was analyzed per animal, being three animals from each group. For all semi-automated morphometry, an optical microscope (Zeiss) was used, and the images were captured and evaluated using the program Axio Vision 3.1 (1998-2002), Carl Zeiss Vision GmbH (Zeppelinstrasse 4-85399 Munchen-Hallbergnoos, Germany).

Evaluation of inflammatory infiltrates – The degree of inflammation in sections of myocardium and skeletal muscles was evaluated by examining inflammatory infiltrates in H&E stained sections from five microscopic fields, not successively, using an 10X ocular and a 40X objective. The sectional areas of inflammation were directly measured and the total number of cells of the examined area calculated.

Evaluation of fibrosis – The degree of fibrosis in sections of the myocardium and skeletal muscle were evaluated by examining five selected areas of fibrosis, Sirius-Red stained, corresponding to microscopic fields 400X, excluding the normal fibrous structures of the heart and the interstitial septa of the skeletal muscles. The sectional areas of the fibrous tissue were directly measured and calculated as a percentage of the total area examined.

Statistical analysis - ANOVA non-parametric and Dunnett's multiple comparative tests were applied. Results were considered significant when determinations reached $p < 0.01$ for muscles and $p < 0.05$ for myocardium.

RESULTS

Parasitemia - Evolution of parasitemia is shown in Fig. 1, for the several groups. Comparing the three strains, the Y strain determined the highest and earliest peak of parasitemia by the 10th day of infection; the 21SF strain determined the lowest peak at the 12th day; the Colombian strain showed intermediate parasitemic peak by the 14th day of infection.

Histopathological lesions:

Y strain (Biodeme Type I): Heart – C. callosus infected with the Y strain showed an evolutive parasitism of the myocardium, from the 7th day of infection, increasing rapidly until the 10th day, with an intense parasitism of myocells. An intense myocarditis was present, with diffuse and focal mononuclear infiltrates, and focal necrosis of cardiac cells. From 15 to 20 days (*Fig. 2A*) of infection, a regression of inflammation and parasitism were seen, with focal mononuclear infiltrates and mild deposits in the connective tissue. Lesions in the myocardium subsided by the 40th day post infection (*Fig. 2B*).

Skeletal muscles – The sections exhibited normal histology. No inflammation, fibrosis or parasitism was present, and the Picro Sirius staining did not reveal abnormal collagen deposits in the heart or skeletal muscles.

21 SF strain (Biodeme Type II)

Heart - lesions in the myocardium were absent until 10 days of infection. From 15 to 30 days of infection, scarce parasites were present with necrosis of cardiac cells as well as mild to moderate focal and diffuse inflammatory infiltration with macrophages and fibroblasts (*Fig. 2 C*). From 35 to 60 days, mild focal inflammatory infiltrates were seen in the myocardium, in the absence of parasites (*Fig. 2 D*); the interstitial matrix was scarce, with thin strands of collagen seen by Picro Sirius staining, in 6/15 cases.

Skeletal muscles - Small perivascular mononuclear infiltrates were seen by the 10th day of infection. No parasites were identified in the examined sections. From 15 to 20 days mild focal infiltrates, scarce parasites and focal necrosis of muscle cells were seen. Up to 35 days after infection, perivascular infiltrates of mononuclear cells were present, as well as focal necrosis of muscle cells, without parasites. Fibrotic alterations were absent. Total regression, of the histopathological alterations was registered from 40 to 60 days post infection.

Colombian strain (Biodeme Type III): Heart – In the myocardium, mild to moderate diffuse mononuclear infiltration as well as focal infiltration around necrotic cardiac cells were seen from 15 to 20 days, with presence of macrophages and fibroblasts (*Figs. 3 A, B*). From 25 to 30 days of infection moderate to intense, diffuse and focal inflammatory infiltrate, with predominance of macrophages and lymphocytes, was present as well as proliferation of fibroblasts and interstitial matrix deposits (*Figs.3 C, D*). Picro-Sirius staining showed collagen deposits as slender bundles and peri-vascular thickening. Parasites were scarce in the heart. At 40th day, small foci of destroyed cardiac cells, with focal mononuclear inflammation were present. Picro-Sirius staining for collagen showed fragmentation and a progressive decrease of collagen until the 60th to the 70th day with residual foci of inflammation.

Skeletal muscles – From 15 to 20 days, lesions of the skeletal muscles were mild and focal, with the presence of intracellular amastigotes, without inflammation, with focal destruction of parasitized muscle cells (*Fig.3 E*) The lesions became more intense in the skeletal muscle from 25 to 30 days of infection, with focal necrosis of parasitized myocytes and the presence of large collections of

amastigotes. Intense inflammatory process was present, with predominance of macrophages, lymphocytes and fibroblasts with parasitic debris and polymorphonuclear neutrophils (*Fig. 3 F,G*). In the 35th day of infection, intense interstitial infiltrates were present (*Fig. 3H*). Strands of collagens were seen in the inflammatory foci (*Fig. 3H*) and confirmed in the sections stained with Picro Sirius. At the 40th day of infection, the inflammatory lesions became less intense. From 60 to 70 days they were limited to focal areas. Fine strands of collagen appeared in sections stained with Picro Sirius.

Normal controls – Sections of the heart showed normal cardiac structure, with scarce interstitial matrix. Skeletal muscle sections showed characteristic histological structure with a distinct and fine perimisial matrix deposit seen with the Picro Sirius red staining.

Morphometric evaluation of the inflammation:

Myocardium - Results of semi-quantitative morphometric evaluation of the number of inflammatory cells in 5 areas of inflammation of 12mm² in the myocardium are shown in *Fig. 4A*, revealing significant increasing of the number of inflammatory cells from the 25th to the 30th day of infection, followed by a significant decrease from the 40th to 60th day post infection .

Skeletal muscle - *Fig.4B* shows the semi-quantitative evaluation of the inflammatory infiltrates in the skeletal muscle, with significant increase of the number of cells from 25 to 30 days of infection and decrease from 40 to 60 days.

Morphometric evaluation of the fibrosis:

Myocardium – *Fig 5A* - The morphometric analysis of fibrosis showed slight increase in collagen deposits, as measured in 5 areas of 12mm² with decrease to normal levels by the 60th day. Statistical analysis did not show significance when compared with normal controls.

Skeletal muscle – *Fig. 5B*- Significant increase of collagen deposits was detected by the 40th day of infection, as compared to normal controls. By the 30th day, a slight increase was also seen, but without reaching statistical significance.

DISCUSSION

The findings of the present study indicate clear differences in *C. callosus* response to infection by strains of *Trypanosoma cruzi* from different biotopes, regarding the degree of the inflammatory process, parasite histotropism, the intensity of parasitism and the evolution of fibrogenesis. Furthermore, the Y and 21SF strains did not induced a significant increase of the interstitial matrix components, in contrast with the Colombian strain, which induced an intense inflammatory process in the heart and skeletal muscles, and significant fibrosis, that spontaneously subsided during the subacute phase of infection (40 to 60 days). The Colombian strain (Type III) is more pathogenic for the *C. callosus* than types I (Y) and II (21SF) strains, which determined a mild infection, with an early tendency toward the regression of the lesions, and null animal mortality. Histotropism for the myocardium of the three biotopes was maintained in *C. callosus*, as compared with mice with the presence of amastigotes of *T. cruzi* in cardiac myocytes, although with a low degree of parasitism with the Y and 21SF strain. However the macrophagotropism that is a hallmark of the infection with Type I strains in mice, was scarce in the spleen of *C. callosus*, (data not shown). On the contrary, the tropism for skeletal muscles, characteristic of the Colombian strain, was very intense in the *C. callosus*, maintaining the same aspects as seen in mice. The *C. callosus* apparently controls the infection with the Types I and II strains, with inhibition of parasite multiplication and early regression of inflammation, and absence of significant fibrogenesis.

The Colombian strain, differently from the others, showed an exacerbation of virulence, expressed by a precocious increasing of the parasitemia differing from the murine model that shows late peaks, from 25 to 30 days. Also an increased pathogenicity was detected in *C. callosus* as compared with the murine model, with extensive muscle necrosis and intense inflammatory and fibrotic lesions, confirming the importance of the interaction host/parasite in the patterns of the lesions.

Apparently, several factors, dependent on the parasite strain and on the host response, are responsible for the characteristic lesions in this model. The Colombian strain, shows a peculiar behavior in respect to several parameters. The antigenic analysis (Andrade et al, 1981) of the three types of strains showed clear cut differences in their antigenic profiles. Cross reacting antigens were present in the three strains, but Colombian strain, has in addition, its own antigenic determinants and this may correspond to differences in its immunogenicity.

The specific neuraminidase activity (Pereira and Hoff, 1986), can influence the predominant tropism for the skeletal myocells (Libby et al, 1986). Pereira and Hoff (1986), studying the neuraminidase activity of several strains, have shown higher activity of neuraminidase in the Colombian strain as compared with Y and 12 SF strains, that could be associated with the myotropism of the Colombian strain. The infective trypomastigote forms of *T. cruzi* exhibits neuroaminidase activity and can desialylate cardiac cells in culture. These observations are in accordance with those of Shenkmann et al (1991, 1992) who identified the transialidase that transfer the sialic acid from the surface of host cells to the surface of the parasite and participate in the penetration of trypomastigotes into the host cells. These aspects are important but do not exclude the participation of the host response. The genetic types of collagen investigated in a previous study (Magalhães-Santos et al, 2002), do not influence the regression of the collagen deposits. Differing from *C. callosus*, evolution of the fibrogenesis in the murine model is slow and progressive until the chronic phase of infection (150 to 200 days post-infection). Reversion of fibrosis in mice occurred after specific treatment in the chronic phase of infection, but not spontaneously (Andrade et al.1991).

As discussed in a parallel investigation (Magalhães-Santos et al. *manuscript submitted to publication*), the *in situ* presence of cytokines, such as $TNF\alpha$, $INF\gamma$ and $TGF\beta$, in the heart and skeletal muscles, during the early phase of *C. callosus* infection, is probably related to the peculiar type of lesions present in *C. callosus* infected with Type III strains. The high susceptibility to the early infection is controlled by the production of these cytokines determining regression of lesions.

Findings of the present study suggest that this behavior could reflect an affinity of the Biodeme Type III (*T. cruzi* I, Momem, 1999), which is most common in the silvatic cycle of parasite, with the *C. callosus*, one of its natural reservoirs.

ACKNOWLEDGMENTS

Thanks are due to the biologist Barbara Cristina Alves Assis, for her assistance in the morphometric analysis.

REFERENCES

- Andrade SG 1974. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Reconcavo Bahiano. Rev. Pat. Trop. 3: 65-121.
- Andrade SG, Andrade V, Rocha Filho FD, Barral Netto M 1981. Análise antigênica de diferentes cepas do *T. cruzi*. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo. 23: 245-250.
- Andrade SG, Kloetzel JK, Borges MM, Ferrans VJ 1994. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 89: 379-393.
- Andrade SG, Stocker-Guerret S, Pimentel AS, Grimaud JA 1991. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 86: 187-200.
- Andrade SG, Magalhães JB 1997. Biodemas e zimodemas of *T. cruzi* strains: Correlations with clinical data and experimental pathology. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 30: 27-35
- Andrade V, Andrade SG, Barral Netto M, Pontes AL, Castro R 1985. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *T. cruzi* na infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 18: 143-154.
- Borges MM, Andrade SG, Pilatti CG, Prado-Jr JC, Kloetzel JK 1992. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 87:493-502.
- Chagas, C 1909. Nova tripanosomiase humana. Mem. Inst. Oswaldo Cruz , 1: 159-218.

- Junqueira LCU, Bignolas G, Bretani RR 1979. Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* 11: 447-455.
- Libby P, Alroy J, Pereira MEA 1986. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. *J. Clin. Invest.* 77: 127-135.
- Magalhaes JB, Pontes AL, Andrade SG 1985. Comportamento das cepas Y e Peruana do *T. cruzi* no camundongo, após passagens em diferentes meios. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 80: 41-50.
- Magalhães-Santos IF, Lima ES, Andrade SG 2002. Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Immunohistochemical identification of extracellular matrix components. *Mem Inst. Oswaldo Cruz.* 97:703-710.
- Mello DA 1982. Roedores marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambá-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo,* 16: 282-291.
- Momem H 1999. Taxonomy of *Trypanosoma cruzi* : a commentary on characterization and nomenclature. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 94: 181-184.
- Pereira MEA, Hoff R 1986. Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. *Mol. Biochem. Parasitol.* 20: 183-189.
- Ribeiro RD 1973. Novos reservatórios de *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Bras. Biol.* 33: 429-537.
- Schenkman S, Jiang MS, Hart GW, Nussenzweig V 1991. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage specific epitope required for invasion of mammalian cells. *Cell,* 65: 1117-1125.
- Schenkman S, Carvalho LP, Nussenzweig V 1992. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. *J. Exp. Med.,* 175: 567-575.
- Silva LHP, Nussenzweig V 1953. Sobre uma cepa do *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* 20: 191-208.

LEGENDS

FIGURE 1 - Parasitemic profiles of the *C. callosus* infected with the strains Y (Biodeme Type I); 21SF (Biodeme Type II) and Colombian (Biodeme Type III).

FIGURE 2 - Histopathological lesions of the heart and skeletal muscle of *C. callosus* infected with the strains Y and 21 SF.

A– Y strain - Heart section, 20 days after infection, showing moderate interstitial infiltration with mononuclear cells. 200X. **B** – Y strain - Heart section, 40 days of infection, showing focal residual infiltrate. 400X. **C** – 21SF strain - Heart section, 20 days after infection, showing focal necrosis of cardiac myocytes and focal mononuclear infiltration. 200X. **D** -21SF strain – Skeletal muscle, 40 days of infection, focal perivascular, residual mononuclear infiltration. 200X.

FIGURE 3 – Histopathological lesions of the heart and skeletal muscle of *C. callosus* infected with the Colombian strain. **A,B,C,D** - Sections of the myocardium:

A – 15 days of infection – interstitial mononuclear infiltration and fibroblasts proliferation. 200X. **B** – 20 days - Focal disintegration of necrotic myocell, focal and diffuse mononuclear infiltration. 400X. **C** – 25 days – area of disappearance of heart cells with substitution by scarce inflammatory infiltrate. 200X. **D** – 35 days– focal disintegration of cardiac myocell, with presence of inflammatory infiltration and fibroblasts proliferation 400X.

E,F,G,H - Skeletal muscle sections: **E** - 15 days of infection – intracellular collections of amastigotes of *T. cruzi* without reaction; interstitial focal infiltration with macrophages and proliferation of fibroblasts. 400X. **F** – 25 days – focal necrosis of muscle cells with intense mononuclear inflammatory infiltration, presence of polymorphonuclear neutrophils, cellular and parasite debris. 400X. **G** – 30 days – interstitial inflammatory infiltration with fibroblasts proliferation and collagen deposits forming strands in the interstitium. 400X. **H** – 35 days – dense interstitial and perivascular mononuclear infiltration. 400X.

FIGURE 4 –Morphometric evaluation of the inflammatory infiltration: A - Heart, showing significant* increase of the number of inflammatory cells, compared with normal control, from the 25th to the 30th day of infection followed by a significant decrease from the 40th to 60th day post infection (* p<0.05). **B - Skeletal muscle,** with significant increase of the number of cells from 25th to 30th days of infection and decrease from 40th to 60th days (*p<0.01).

FIGURE 5 – Morphometric evaluation of the collagen deposits: A - Heart, although na increase of the fibrosis has been detected in the 40th day, statistical analysis did not show significance when compared with normal controls (*p>0.05). **B – Skeletal muscle,** significant increase of collagen deposits was detected by the 40th day of infection, as compared to normal controls. By the 30th day, a slight increase was also seen, but without reaching statistical significance (p>0.05).

5. MANUSCRITO 2

6. MANUSCRITO 3

***In situ* cytokine expression in the heart and skeletal muscle of
Trypanosoma Cruzi- infected *Calomys callosus* (Renger, 1830).**

ISIS F.MAGALHÃES SANTOS & SONIA G. ANDRADE

Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Rua Valdemar Falcão – 121 (Brotas), Salvador, Bahia, Brasil. Laboratório de Chagas Experimental, Autoimunidade e Imunologia Celular

Summary

Calomys callosus, a silvatic reservoir of *Trypanosoma cruzi*, has been used in the study of experimental infection with this parasite. It differs from the murine model, surviving the infection with virulent strains, usually fatal to mice, with regression of the lesions. The participation of pro-inflammatory and pro-fibrogenic cytokines, such as $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, and $TGF\beta$, in the pathogenesis of the early, necrotic-inflammatory lesions and in the intense early fibrogenesis caused by the Colombian strain of *T. cruzi* has been herein studied. Ninety-five *C. callosus* weighing 20 to 30 g were used. Eighty-five were inoculated with the Colombian strain (10^5 blood forms) and 10 were maintained as intact non-infected controls. During the course of infection *C. callosus* were sacrificed at different points from 15 to 70 days. The heart and skeletal muscle were processed for histopathology and immunohistochemistry for the *in situ* presence of $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, and $TGF\beta$ by means of the following primary antibodies: Rat-IgG anti-mouse - $TNF\alpha$, Rat-IgG anti-mouse $IFN\gamma$, and Rabbit IgG anti-mouse $TGF\beta$. Results demonstrated cross reaction of the anti-mouse antibodies with the tissues of infected *C. callosus*. They revealed the early necrotic lesions of parasitized skeletal muscle and myocardium with intense inflammatory lesions and the presence of $TNF\alpha$, $IFN\gamma$ and $TGF\beta$, in the cytoplasm of macrophages and in the necrotic material. Cytokines were detected from 15 to 45 days post-infection, decreasing their intensity until complete disappearance by the 65th day, which correlated to the decreasing of the histopathological lesions. Participation of the cytokines in the control of parasite multiplication, in the early fibrogenesis and in the regression of lesions is suggested.

Keywords: *Trypanosoma cruzi*, *Calomys callosus*, Cytokines, $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, $TGF\beta$.

Correspondence : Dr. Sonia G. Andrade, Chief, Laboratory of Experimental Chagas Disease, Autoimmunity and Cellular Immunology, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz/Fiocruz, Rua Waldemar Falcão, 121 (Brotas) 40295-001, Salvador, Bahia, Brazil.

Introduction

Trypanosoma cruzi infection determines parasitism of the myocardium, with intense myocarditis due to an immunological response at cellular and humoral levels, with production of a panel of inflammatory and regulatory cytokines (Gazzinelli & Brener, 1991, Reis et al. 1993 a,b, Lucella et al. 1996, Morgan et al. 1996), as seen in human patients from endemic areas, during acute infection.

Experimental investigations of immunological responses during acute infection have preferentially been developed with the mice model (Silva et al, 1991, Zhang and Tarleton, 1996, Dos Reis, 1997, Abrahamson, 1998), accounting to a large contribution aiming at clarifying pathogenesis. In the murine model, infection with *T. cruzi* is followed by activation of macrophages as an initial innate response, mediated by IFN γ produced by NK cells (Cardillo et al. 1996). Macrophages are then primed for further production of cytokines as TNF α , TGF β and others, and to produce microbicidal agents such as N and O metabolites: NO and H $_2$ O $_2$ (Gazzinelli et al, 1992; Silva et al, 1995, dos Reis, 1997).

The model of *Calomys callosus*, a silvatic reservoir of *Trypanosoma cruzi*, biologically described and adapted to laboratory use by Mello (1982), has been used for the study of the immune response in the infection with *T. cruzi* and its capacity to produce IFN γ and to incite a microbicidal response of macrophages (Borges et al, 1992, 1995). Comparing with the infection in mice, it was shown that calomys controls the infection with the Y and others strains, and 90% of the animals survive the inoculation with the Y strain, while a 100% mortality rate is recorded in mice (Borges et al, 1995). *C. callosus* infected with *T. cruzi* strains belonging to biodeme Type III (Andrade, 1985), which corresponds to group *T. cruzi* I (Satellite Meeting, 1999), such as, for example, the Colombian and the F strains, develop intense necrotic-inflammatory lesions and fibrosis in the heart and skeletal muscle (Andrade et al, 1994, Magalhães Santos et al, 2002). These lesions are progressive from the acute phase of infection and spontaneously subside by the early chronic phase. The production of early fibrosis followed by spontaneous regression represents a

peculiar aspect seen with this experimental model. The genetic types of collagen present in the heart and skeletal muscle of these animals has been previously investigated by immunohistochemistry using specific antibodies anti-laminin, fibronectin and isotypes I, III and IV of collagen (Magalhães Santos et al, 2002). The results have indicated that the spontaneous regression of fibrosis is independent of the genetic types of collagen and is correlated with the modulation of the inflammation. The participation of pro-inflammatory, fibrogenic and regulatory cytokines, may be responsible for this evolutive processes. It seems important to investigate their participation in the lesions in the *C. callosus*, understanding of the immunological response in this silvatic animal that conduct to a regression of the inflammatory process with early and concomitant regression of collagen deposits. In the present investigation, the *in situ* demonstration of the cytokines TNF α , IFN γ and TGF β , in the necrotic-inflammatory lesions, from the early acute infection, suggest an active participation of cytokines in the destruction of intracellular parasites, and in the early fibrogenesis, possibly mediated by the TGF β , that also controls the infection, with resolution of inflammation and fibrosis.

Material and Methods

Experimental animals – Eighty *C. callosus* raised in the animal facilities of Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz - Fiocruz, were used in this study. The experimental animals were approximately 60 days old males, weighing 20-30g. Their maintenance complied with the guidelines for the human use of laboratory animals.

Inoculation with *T. cruzi*: Seventy *C. callosus* were intraperitoneally inoculated with the Colombian strain (Biodeme Type III). **Inoculum**: 10⁵ blood forms obtained from infected mice, after washing with PBS, pH 7.2, by centrifugation at 1.200 g. Ten non-infected *C. callosus* were used as intact controls.

Parasitemia of the infected animals was evaluated by counting trypomastigotes in 50 microscopic fields (400x) in peripheral blood, examined under slide and coverslip, three days/week.

Histopathology - Five Infected calomys per point were sacrificed with 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65 and 70 days after infection. Complete autopsies were performed and fragments of several organs were fixed in

buffered formalin, pH 7.6 and embedded in paraffin; 5 μ m-thick sections of the heart and skeletal muscle were stained with hematoxylin eosin and Picro-Sirius red method for collagen (Junqueira et al, 1979).

Immunohistochemistry - Fragments of the heart and skeletal muscle were immediately embedded in tissue teck (OCT compound Miles Inc. Diagnostic Division, Elkhart, USA) frozen in liquid nitrogen and cryopreserved in a freezer at -70° C. Sections of 5 μ m were cut in a cryostat at -10° C placed on slides previously treated with 10% Poly L-Lisin (Sigma, St. Louis, MO, USA), fixed in dehydrated Acetone and treated with PBS pH 7.4, containing 0.1% Saponin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 1% Bovin Serum Albumin (BSA) (Sigma, St. Louis, MO, USA). For blocking non-specific bindings sections were treated with 10% BSA for 20 min at room temperature.

As primary antibodies, the following antibodies were used in three experiments 1) Rat IgG antimouse TNF α monoclonal antibody (MP6-XT3) (Pharmigen, San Diego, CA, USA) ; 2) Rat IgG antimouse IFN γ monoclonal antibody (Sigma, St. Louis, MO, USA) ; 3) Rabbit anti-mouse TGF β purified polyclonal antibody (TGF- β 1, β 2, β 3 e β 5) (R&D Systems Inc. Minneapolis-MN, USA - Cod: DK-20-PB).

Sections were incubated overnight at 4° C in an humidified chamber, with each antibody diluted in PBS pH 7.4/saponin 0.1%/ BSA 1% in the dilution of 1:20 for TNF α and IFN γ ; 1:50 for TGF β .

After washing with PBS and saponin, sections treated with TNF α or IFN γ were incubated in normal rat serum in the dilution of 1:20 in PBS/BSA (5%) for 20 minutes, for additional blocking of nonspecific binding. For TGF β the additional blocking was done with normal rabbit serum, diluted 1:20 in PBS/BSA (5%), incubated during 20 min. Inhibition of the endogenous peroxidase was achieved by a 30 minute incubation in 0.3% H₂O₂ at room temperature. The slides were then incubated for 30 min at 37° C in a humidified chamber with the secondary antibody conjugated to Peroxidase. For TNF α and IFN γ a sheep anti-rat IgG antibody conjugated to Peroxidase (Boehringer-Mannheim Biochemica, Germany) in the dilution of 1/300 in PBS/BSA/saponin, was used. For TGF β a Goat anti-Rabbit Peroxidase (Sigma, St. Louis, MO, USA) conjugate in the dilution of 1/800 in PBS/BSA/saponin was used. The colour

was developed with 0.6 mg/mL 3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride (DAB) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 0.1% H₂O₂ plus 1% dimethylsulphoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA)

Sections were counterstained with 1% methyl-green for 15 min, dehydrated and mounted with Permount.

Positive controls

As control of the reaction for IFN γ and TNF α , cells of the lineage J774 described as "macrophage like" (Ralph & Nakaniz 1975; Van Furth *et al.* 1985) were used. The cells were maintained in RPMI cell culture medium with 10% bovine foetal serum, and collected during the exponential phase growth, at a concentration of 10⁶ cells/mL. The cells were stimulated for 24 h with 10 ng/mL with lipopolysaccharide (LPS) from the cellular membrane of *Escherichia coli* (Sigma, St. Louis, MO, USA) in a CO₂ chamber, at 37° C. Stimulated cells were centrifuged at 1.500 r.p.m. for 10 min. The pellet was suspended in PBS at a concentration of 10⁶ cells/mL and re-centrifuged at 2.500 r.p.m. for 5 min in a cytocentrifuge (Cytospin-3 –Shandon, Life Sciences International, England) for adhesion to slides previously treated with Poly-L- lysine.

As control of the reaction for TGF β , L929 fibroblasts like from mouse C3H/Na, were used. The cells were maintained in RPMI cell culture medium with 10% bovine foetal serum, and collected during the exponential phase growth, at a concentration of 10⁶ cells/mL. These cells without stimulation, were collected, fixed in PBS + Paraformaldehyde and processed in the same way as for the J774 cells.

Negative Controls - For each specimen that was immunolabelled, a control specimen was processed through all steps of the procedure, except for treatment with the anti- TGF β , IFN γ and TNF α . Furthermore, sections of heart and skeletal muscle of normal intact control calomys were always processed as controls for the reaction.

Results

Parasitemia - Fig.1 shows the profile of parasitemia, with peak at the 14th day post-infection.

Histopathology_

Inflammatory infiltrates in the heart and skeletal muscles and necrotic lesions of the parasitized myocells were present from the 15th to 20th days of infection, mainly in the myocardium, with intense inflammation (Figs. 2 A)

From 25 to 30 day post infection, mild to moderate focal and diffuse inflammatory infiltration was present in the myocardium, with moderate interstitial deposits of collagen (Fig. 2B). The skeletal muscle lesions became most intense and diffuse, with necrosis of parasitized muscle cells, presence of disintegrated polymorphonuclear cells and parasite debris, macrophages and fibroblasts (Figs. 2 C,D). Collagen fibers appeared in the interstitium as slender bundles. From 35 to 45 days, myocardial lesions became scarce, with mild interstitial mononuclear infiltrates and foci of infiltrations around necrotic myocells. In the skeletal muscle inflammatory infiltrates varied from moderate to intense, diffuse and focal, replacing necrotic cells, fibroblasts proliferation and interstitial fibrosis (Figs. 2 E, F). Parasitism was scarce or absent. Dense collagen deposits in the areas of focal destruction of muscle fibers and in the interstitium were present in the myocardium and skeletal muscle, as seen by collagen staining under polarized light (Figs. 3 A, C); dissociation and fragmentation of the matrix was present, at this phase, indicating a regression of the collagen deposits (Figs. 3 B, D) By the 65th day post infection, regression of the lesions, both in the myocardium and skeletal muscle was observed. Inflammation in the myocardium was mild and matrix deposits were focal and scarce. In the skeletal muscle, isolated foci of inflammation were seen in absence of necrosis or parasitism of muscle cells.

Immunohistochemistry

Reaction of the anti-mouse antibodies with the tissues of *C. callosus* was present, occurring specific staining of the macrophages and necrotic tissues by the cytokines $TNF\alpha$, $IFN\gamma$, and $TGF\beta$.

IFN γ immunolabelling

Positive control - J774 cells were treated with the anti- $IFN\gamma$ antibody and the results were Positive.

Heart and skeletal muscle of infected C. callosus

From the 15th to 25th day post infection, sections of the heart, showed positive immunolabelling for $IFN\gamma$ in the cytoplasm of macrophages and in extracellular material, corresponding to the inflammatory infiltrates around necrotic myocells (Figs.4 A, B). On the 25th day of infection, positive staining for the $IFN\gamma$ was detected in the cytoplasm of macrophages, and in the extensive areas of necrosis of the skeletal muscle and the myocardium (Fig. 4 C). With 35 and 45 days, the myocardium and the skeletal muscle showed focal and interstitial infiltrates with positive deposits in the cytoplasm of the mononuclear cells and in the interstitium (Figs. 4 D, E). By the 65 days post infection, staining was negative for $IFN\gamma$ in the myocardium. However, the skeletal muscle showed focal inflammatory infiltrates with positive staining for $IFN\gamma$ (Fig. 4 F).

TGF β Immunolabelling

Positive control - The L929 cells treated with anti-TGF- β antibody, showed positive results, with dilutions of 1:10, 1:20 and 1:50.

Heart and skeletal muscle of infected C. callosus

In the myocardium, $TGF\beta$ was detected in the cytoplasm of macrophages and fibroblasts and interstitium, in focal inflammatory foci around necrotic myocells, in the 15th and 20th days post-infection and advanced phase, 35th to 45th days post infection (Figs. 4 G, H). In the skeletal muscle, deposits of $TGF\beta$ were seen as positive mild staining in the cytoplasm of macrophages and fibroblasts and in extracellular material from the 15th to 45th day of infection (Figs. 4 I, J, K). However, $TGF\beta$ was not detected in the extracellular material of the

extensive necrotic-inflammatory lesions in the skeletal muscle seen in the 25th day of infection. In the 45th days of infection, cardiac and skeletal muscle lesions were mild, and rare cells with scarce positive staining for TGF β were present in focal inflammatory lesions (Fig. 4K). By the 65 days, residual infiltrates were seen in the myocardium and skeletal muscle, TGF β being absent.

TNF α immunolabelling:

Positive control - As a positive control for TNF α antibody, J774 cells were stained with the monoclonal anti-TNF α antibody and were positive.

Heart and skeletal muscle of infected C. callosus.

Sequential study from the 15 days of infection showed the expression of TNF α in small inflammatory foci in the myocardium, corresponding to areas of focal necrosis of myocells (Figs. 4 L, M). TNF α was present in the cytoplasm of macrophages and in the amorphous necrotic cellular debris. With 20 to 25 days of infection, intense positive immunolabelling for TNF α in the cytoplasm of macrophages and in the extracellular necrotic material was present mainly in the skeletal muscle (Fig. 4N). In the 35th day of infection, small foci of inflammation with positive intra and extracellular deposits of TNF α , were seen in the myocardium and skeletal muscle (Fig. 4 O). At 45 days post infection positive staining for TNF α in macrophages was present in focal infiltrates in the myocardium and interstitial infiltration in the skeletal muscle (Fig. 4 P). At 65 days of infection, residual infiltrates were seen in the myocardium and skeletal muscle, being negatives for TNF α .

Normal controls (Immunohistochemistry)

Sections of the heart and skeletal muscle of intact *Calomys callosus* treated with each monoclonal antibody through all steps of the procedures to immunolabeling of the cytokines: TNF α , IFN γ , and TGF β , exhibited negative results.

Discussion

The present study demonstrates in the tissues of *T. cruzi*-infected *C. callosus*, the *in situ* presence, of the cytokines TNF α and IFN γ , in the cytoplasm of macrophages and in the necrotic extracellular material, in extensive areas of necrosis of myocardium and skeletal muscle, that corresponded to destruction of intracellular parasites. TGF- β was detected in the cytoplasm of macrophages and fibroblasts and in extracellular material in the mononuclear infiltrates. Presence of these cytokines occurred in the early and advanced phases of infection. TNF α and TGF β , decreased rapidly, being absent on the 65th day post-infection. However, the IFN γ was positive when examined until the 65th day post-infection, in the residual infiltrates of skeletal muscle.

In the model of *C. callosus*, the demonstration of participation of the different cytokines in the evolutive lesions is limited by the absence of available specie-specific monoclonal antibodies. However, cross-reactive antibodies to mouse cytokines, have successfully been used in the present study, for the *in situ* demonstration of the cytokines involved in the different phases of infection. In previous studies (Borges et al. 1995), it has been demonstrated an homology between murine and *C. callosus* IFN γ .

Differently from results in the *C. callosus*, *in situ* demonstration, in the spleen of infected mice, of most of the cytokines involved in the response to infection with *T. cruzi*, (Zhang and Tarleton, 1996), had indicated persistence of the pro-inflammatory cytokines as the TNF α and IFN γ as well as the regulatory cytokine TGF β , during the course of infection, until the late chronic phase (700 days). However, these studies (Zhang and Tarleton, 1996), have been developed in the spleen and not in the tissue lesions of the heart and skeletal muscles, as in the present investigation.

The *C. callosus* model differs from the mouse model of infection with the Colombian strain, in which intracellular parasite proliferation, with well preserved amastigotes, persists until advanced acute infection (Andrade, 1985). The evolution of the lesions in the *C. callosus* infected with the Colombian strain was very rapid, corresponding to an early elevation of parasitemic levels, with peak at the 14th day, followed by a drop *in crisis*. An

early intense parasitic proliferation into the cardiac and muscle cells has been rapidly detained by parasite destruction, with *in situ* expression of these cytokines. This means that the *C. callosus* is highly susceptible to *T. cruzi* but controls the parasite multiplication by TNF α mediated parasite disintegration. In mice model it has been demonstrated that macrophages of susceptible inbred mice produces higher levels of TNF α than the most resistant strains (Russo et al, 1989) and this could be compared with the described situation in the *C. callosus*. In a previous study in mice (Lima et al. 2001), the participation of TNF α in the massive parasite destruction and spleen necrosis, caused by a macrophagotropic strain (Biodeme Type I), has been documented. This last study has confirmed the lesions described by Cordeiro et al. (1997), in which necrosis of the parasitized macrophages corresponded to a drop in the parasitemia and initiation of a phase of resistance of the animals. The presence of IFN γ since the early phase of infection represents the initial innate response to *T. cruzi* infection by the NK cells. This is followed by stimulation of macrophages for the production of TNF α , IFN γ , and TGF β (Cardillo et al, 1996). Interestingly, it has been demonstrated that IFN γ persists in tissues for a prolonged time (65 days) as compared with the other cytokines that were absent in the heart and skeletal muscle at this phase.

In a previous study (Borges et al, 1995), serum levels of IFN γ were evaluated in *C. callosus* and Swiss mice, infected with different strains of *T. cruzi*, in an attempt to correlate this cytokine with the control of infection *in vivo*. The highest IFN γ serum levels were obtained with strain F with peak at 7 days and with titres maintaining a plateau until day 28 and dropping after that to baseline levels (Borges et al, 1995). The F strain is included in the same biodeme, of the Colombian strain used in the present experiment. In the infection of mice with the F strain (Borges et al, 1995), IFN γ peaks were delayed, occurring between days 21 and 28 after infection, with a retarded drop. According to Silva et al. (1991) the regulation of IFN γ -mediated killing of the intracellular *T. cruzi* amastigotes is mediated by TGF β produced during acute infection in mice. TGF β is a potent inhibitor of the effects of macrophage activating cytokines and may play a role in regulating infection (Silva et al, 1991). It is also a potent regulator of inflammation, being pro-inflammatory at low concentrations and

anti-inflammatory at high concentrations (Omer et al, 2000). As such, TGF β might be important in maintaining the balance between control and clearance of infectious organisms on the one hand and prevention of immune-pathology on the other. The immunoregulatory properties of TGF β , in the context of parasitic infections, indicates that this cytokine modifies the severity of the disease. In the present study, the presence of TGF β in the lesions of myocardium and skeletal muscle, was detected since the early phase, which is consistent with the participation of this cytokine in the modulation of the other cytokines and in the early fibrogenesis, that follows the repair of lesions. The exsudative lesions characteristic of the intracellular parasites disintegration are substituted by macrophages collections and epithelioid cells forming granulomatous lesions and proliferation of fibroblasts, characteristics of the delayed cellular immune response. Stimulation of fibrogenesis became clear, coincident with the presence of a pro-fibrogenic and regulatory cytokine in the cytoplasm of the macrophages and fibroblasts, of TGF β (Branton and Kopp, 1999, Varga et al, 1987). The decrease and disappearance of the tissue cytokines, from 35 to 45 days of infection coincided with the regression of the inflammatory and fibrotic lesions, although with persistence of IFN γ until later on (65th day).

The results of the present study suggest the importance of the cytokines IFN γ and TNF α , in controlling the parasitic multiplication and of the TGF β , in the regulation of these effects in *C. callosus* infected with *T. cruzi*. These findings demonstrated that this silvatic animal is highly susceptible and, concomitantly, develops a high resistance, by the capacity of controlling the parasitic proliferation, without dying, a very convenient arrangement for a natural reservoir of parasites.

Acknowledgments – Thanks are due to Dr. José Mengel, who provided the anti-TGF β purified polyclonal antibody used in the present study and to Dr. Fabiola Cardillo for reading the text and valuable suggestions. Thanks to Biologist Ariane R. Pimentel to her assistance in the development of the immunohistochemical techniques.

REFERENCES

- ANDRADE S.G., MAGALHAES J.B., PONTES A.L. (1985a) Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *T.cruzi* strains of different types. *Bul. World Health Org.* **63**, 721-726.
- ANDRADE S.G., KLOETZEL. J.K., BORGES M.M., FERRANS V.J. (1994). Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **89**, 379-393.
- BORGES M.M., MELLO D.A., TEIXEIRA M.L. (1982). Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. *Rev.Saude Publ São Paulo.* **16**, 233-242.
- BORGES M.M., ANDRADE S.G., PILATTI C.G., PRADO-JR. J.C, KLOETZEL J.K (1992). Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* **87**, 493-502.
- BORGES M.M., VASSAO R., ANDRADE S.G., PEREIRA C.A, KLOETZEL J.K., (1995). Interferon-gamma levels during the course of *Trypanosoma cruzi* infection of *Calomys callosus* (Rodentia-cricetidae) and Swiss mice. *Parasitol. Res.* **81(6)**, 498-504.
- BRANTON M.H. AND KOPP J.B. (1999) TGF- β and fibrosis. *Microbes Infect.* **1(15)**, 1349-1365.
- CARDILLO F., VOLTARELLI J.C., REED S.G., SILVA J.S., (1996) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infection and Immunity.* **64**, 128-134.
- CORDEIRO M.S., DAHIA A C.G. & ANDRADE Z.A (1997) Kinetics of *Trypanosoma cruzi* destruction in the mouse spleen. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **30**, 3-9.
- DOS REIS G.(1997) Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitol. Today.* **13**, 335-342.
- GAZZINELLI G., BRENER Z. (1991) Immunological aspects of the morbidity of human Chagas' disease. *Res. Immunol.* **142**, 167-169.
- GAZZINELLI R.T., OSWALDO I.P., HIENY S., JAMES S.L. & SHER A. (1992) The microbicidal activity of IFN γ treated macrophage against *Trypanosoma*

- cruzi involves an 1-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . *Eur. J. Immunol.* **22**, 2501-2506.
- JUNQUEIRA L.C.U., BIGNOLAS G., BRENTANI R.R., (1979). Picrosirius staining plus polarization microscopy, a specific method for collagen detection in tissue sections. *Histochem. J.* **11**, 447-455.
- LAUCELLA S.A, ROTTENBERG M.E., DE TITTO E.H.(1996) Role of cytokines in resistance and pathology in *Trypanosoma cruzi* infection. *Rev. Argent. Microbiol.* **28(2)**, 99-109.
- LIMA E.S., ANDRADE Z.A, ANDRADE S.G.(2001).TNF - α is expressed at sites of parasite and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Int.J. Exp.Path.* **82**, 327-336.
- MAGALHÃES-SANTOS I.F., LIMA E.S., ANDRADE S.G. (2002).Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Immunohistochemical identification of extracellular matrix components. *Mem Inst. Oswaldo Cruz*: **97**, 703-710.
- MELLO D.A.(1982). Roedores marsupiais e triatomíneos silvestres capturados no município de Mambai-Goiás. Infecção natural pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Saúde Públ. S. Paulo.* **16**, 282-291.
- MORGAN J., DIAS J.C., GONTIJO E.D., BAHIA-OLIVEIRA L., CORREA - OLIVEIRA R., COLLEY D.G, POWELL M.R.(1996) Anti-*trypanosoma cruzi* antibody isotype profiles in patients with different clinical manifestations of Chagas'disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **55**, 355-359.
- OMER, F., KURTZHALS, J., RILEY, E. (2000) Maintaining the immunological balance in parasitic infections a role of TGF β ? *Parasitology Today.* **16**, 18-23.
- RALPH P. & Nakoinz I.(1975) Phagocytosis and cytolysis by a macrophage tumour and its cloned cell line. *Nature.* **257**, 393-394.
- REIS, D.D., JONES, E.M., TOSTES JR. S., LOPES E.R., GAZZINELLI G., COLLEY D.G., MCCURLEY T.L. (1993) Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of Tumor Necrosis Factor- α cells and dominance of granzyme α , CD8+ lymphocytes. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* **48**, 637-644.

- REIS D.D., JONES E.M., TOSTES S., LOPES E.R., CHAPADEIRO R., GAZZINELLI G., COLLEY D.G., MCCURIEY T.L. (1993) Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas' disease. *Am J. Trop. Med. Hyg.* **49**, 192-200.
- RUSSO M., STAROBINAS N., RIBEIRO, S.R., MINOPRIO P., EISEN H., HONTEBEYRIE, J.M.(1989). Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunol.* **11**, 385-395.
- SATELLITE MEETING.(1999) Recommendations of a Satellite Meeting - International Symposium to Commemorate the 90th Anniversary of the Discovery of Chagas' Disease. *Mem.Inst.Oswaldo Cruz.* **94**, 429-432.
- SILVA J.S., TWARDZIK, D.R., REED S.G., (1991) Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections in vitro and in vivo by transforming growth factor β (TGF- β). *Journal of Experimental Medicine.* **174**, 539-545.
- SILVA J.S., VESPA G.N., CARDOSO M.A., ALIBERTI J.C. & CUNHA F.Q. (1995) Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon-activated macrophages. *Infect. Immun.* **63**, 4862-4867.
- VAN FURTH R., VAN SCHADEWIJK -NIEUWSTAD M., ELZENGA-CLAASEN I., CORNELISSE C. & NIBBERING P. (1985) Morphological, cytochemical, functional and proliferative characteristics of four murine macrophage-like cell. *Immunol.* **90**, 339-357.
- VARGA, J., ROSENBLUM, J., JIMENEZ, S.A (1987) Transforming growth factor beta (TGF- β) causes a persistent increase in esteady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNAs in normal human fibroblasts. *Biochen.J.* **247**, 597-604.
- ZHANG L.& TARLETON R.L. (1996) Characterization of cytokine production in murine *T. cruzi* infection by *in situ* immunochemistry: lack of association between susceptibility and T helper type 2 cytokine production. *European Journal of Immunology.* **26**, 102-109.

Legends

Figure 1 – Parasitemic profile from *C. callosus* infected with the Colombian strain of *Trypanosoma cruzi*: parasitemic peak occurred at the 14th day post-infection with a rapid decrease until negativation.

Figure 2 - Histopathological aspects of the myocardium and skeletal muscle of *C. callosus* infected with the Colombian strain of *T. cruzi* : **A** – Myocardium (20 days of infection), showing intense mononuclear infiltration and the presence of amastigote forms of *T. cruzi* in myocells. H&E, 400X. **B** – Myocardium (25 days), focal disintegration of necrotic cardiac myocells and inflammatory infiltration. H&E, 400X. **C** – Skeletal muscle (25 days), large collection of parasites in the cytoplasm of muscle cell; necrotic myocells with dense inflammatory infiltration. H&E, 200X.

D – Skeletal muscle (25 days), necrotic myocell with mononuclear and polymorphonuclear neutrophils infiltrate, with debris of amastigotes and necrotic material. H&E, 400X. **E** – Skeletal muscle (35 days), interstitial mononuclear infiltration, fibroblasts proliferation and interstitial fibrosis. H&E, 400X. **F** – Skeletal muscle (45 day), focal necrosis of muscle cell with mononuclear cells infiltration. H&E, 400X.

Figure 3 – Collagen deposits in sections of the heart and skeletal muscle of *C. callosus* infected with the Colombian strain of *T. cruzi*. Sections were stained with the Picro-Sirius red staining method, revealing bi-refringence under polarized light.

A – Heart section (20 days of infection), presence of dense collagen deposits in the areas of focal destruction of myocells and in the interstitium. Picro-Sirius, 400X. **B**- heart section (45 days), the collagen deposits seen at polarized light appeared as irregular and focal thickening of the interstitial matrix. Picro-Sirius, 400X. **C** – Skeletal muscle (25 days), showing interstitial deposits of collagen with bi-refringence under polarized light. Picro-Sirius, 400X. **D** – Skeletal muscle (45 days), collagen deposits appeared discontinuous and fragmented indicating regression of collagen deposits. Picro-Sirius, 400X.

Figure 4 – Immunohistochemical identification of the cytokines $IFN\gamma$, $TGF\beta$ and $TNF\alpha$ in the heart and skeletal muscle of *C. callosus* infected with *T. cruzi*.

A, B, C, D, E, F - $IFN\gamma$ immunostaining: **A, B** – Inflammatory cells in the myocardium showing positive expression of $IFN\gamma$ in the early (15 days) and advanced (25 days) phases of infection, respectively. **C, D, E, F** – skeletal muscle (25, 35, 45 and 65 days post-infection), evolutive aspects, showing the expression of $IFN\gamma$ in the macrophages present in focal areas of necrosis of myocells, in mononuclear cells of interstitial infiltrates and in the extracellular deposits. 1.000X.

G, H, I, J, K - $TGF\beta$ immunostaining: **G, H** – Myocardium with positive staining for $TGF\beta$ in the cytoplasm of macrophages and interstitium in focal areas of inflammatory infiltration, in the early (15 days) and advanced phases of infection (35 days). **I**-skeletal muscle (20 days), focal area of necrosis with infiltration of macrophages and fibroblasts with positive staining for $TGF\beta$; **J**-skeletal muscle (35 days), inflammatory focus with positive staining in the cytoplasm of macrophages and in the interstitium; **K** – skeletal muscle (45 days) presence of positive staining in the cells of focal inflammatory infiltrate. X1000.

L, M, N, O, P- $TNF\alpha$ immunostaining : **L, M**–myocardium (15 and 20 days) necrotic area with mononuclear infiltrate showing positive staining for $TNF\alpha$ in the cytoplasm of macrophages and in the amorphous necrotic cellular debris. **N** - skeletal muscle, early phase (20 days), focal mononuclear infiltration with positive staining for $TNF\alpha$; **O**-skeletal muscle (35 days), focal area of necrosis with intra and extracellular deposits of $TNF\alpha$; **P**-skeletal muscle (45 days), focal mononuclear infiltration, with the presence of intracellular deposits of $TNF\alpha$. X1000.

7. DISCUSSÃO

O estudo da patogenicidade e histotropismo de cepas do *T. cruzi* no modelo do *C. callosus* aponta diferenças comportamentais bem distintas quando o animal é infectado com cepas do *T. cruzi* pertencente a diferentes biotopos. Estas diferenças estão relacionadas com o grau de inflamação, histotropismo, parasitismo e processo evolutivo da fibrose.

As cepas Y e 21SF não determinaram alterações fibrótico-inflamatórias tão exuberantes como a cepa Colombiana, que estimulou no *C. callosus* uma resposta inflamatória intensa e precoce em músculo cardíaco e esquelético, evoluindo para uma fibrose intensa com regressão espontânea entre 40 e 60 dias de infecção.

Neste caso, a cepa Colombiana se apresentou mais patogênica do que as cepas Y e 21SF, que apresentaram um perfil moderado de infecção. Contudo, a regressão das lesões teciduais foi semelhante nos três grupos infectados com as referidas cepas. Interessante é que, embora o padrão de lesão tecidual tenha sido distinto, a mortalidade nos três grupos foi nula, e este comportamento do *C. callosus* tem sido descrito por diferentes autores (BORGES et al., 1982; ANDRADE et al., 1994).

Embora as cepas 21SF e Y tenham causado baixo parasitismo tecidual houve um histotropismo para miocárdio do *C. callosus*. Embora o *C. callosus* infectado com a cepa Y (Biotopo tipo I) tenha apresentado maior parasitismo no miocárdio, o macrofagotropismo no baço foi observado, contudo foi escasso

(dados não mostrados). BORGES et al. (1982) anteriormente já haviam descrito este mesmo aspecto de miotropismo na infecção com a cepa Y do *T. cruzi*.

Com relação às cepas de Biodema tipo III, sabe-se que elas apresentam padrão miotrópico clássico (ANDRADE, 1985). A cepa Colombiana no *C. callosus*, apresentou o mesmo comportamento biológico característico de cepa tipo III bem descrito no modelo murino, demonstrando intenso parasitismo tecidual, principalmente em músculo esquelético. Estas observações nos levam a considerar que o *C. callosus* controla mais eficientemente a evolução das lesões quando infectado com cepas de Biodemas tipo I e II. Entretanto, o *C. callosus* mostrou alta suscetibilidade à infecção para a cepa Colombiana, pois foi observado intenso parasitismo na fase precoce da infecção com presença de grandes ninhos parasitários no músculo esquelético, embora tenha desenvolvido um mecanismo de controle que determinou a necrose dos ninhos parasitários associada à presença de citocinas *in situ* (IFN γ , TNF α e TGF β).

A cepa Colombiana do *T. cruzi* no *C. callosus* apresentou maior patogenicidade comparado ao que se observa no modelo murino, pois as lesões necróticas de músculo esquelético, associada a um intenso infiltrado inflamatório e fibrogênese precoce, foram mais exuberantes. Isto reforça a importância da interação que existe entre parasito e hospedeiro, que possivelmente contribui na determinação das lesões teciduais (ANDRADE, 1990). Possivelmente existem fatores inerentes tanto a cepa do parasito, como ao tipo de resposta imune estabelecida pelo hospedeiro, que podem estar determinando os tipos de lesões características no modelo.

observações também foram confirmadas por SHENKMAN et al. (1991 e 1992).

Estudos têm demonstrado que a cepa Colombiana apresenta comportamento distinto relacionado a diferentes parâmetros moleculares, a exemplo da sua composição antigênica, que pode influenciar na resposta imune (ANDRADE et al., 1981), e também da atividade específica da neuroaminidase (PEREIRA e HOFF, 1986), que pode influenciar no seu comportamento biológico, determinando um miotropismo característico (ANDRADE, 1974). Entretanto estudos sobre o papel da trans-sialidase do *T. cruzi* na interação parasito-hospedeiro realizados por NEVES (1998), demonstrou que não haver diferença nos níveis de trans-sialidase e de sialidase entre diferentes cepas do *T. cruzi* sugerindo que esta molécula não seja importante para a penetração do parasito nas células, mas que pode ter implicações na patogenia da doença de Chagas.

A composição antigênica de diferentes cepas do *T. cruzi* foi analisada por ANDRADE et al. (1981), e o padrão antigênico apresentou algumas diferenças bem evidentes. Embora o perfil antigênico tenha apresentado reatividade cruzada, a cepa Colombiana apresentou determinantes antigênicos próprios, que foi sugerido estar relacionado com o seu caráter imunogênico.

A importância da neuroaminidase no parasitismo celular tem sido investigado por PEREIRA e HOFF (1986). Diferentes cepas pertencentes ao Biodema tipo III (Zimodema I) têm apresentado atividade elevada de neuroaminidase, principalmente a cepa Colombiana (Tipo III), tipicamente miotrópica. Estudos *in vitro* tem demonstrado que neuroaminidase de tripomastigotas do *T. cruzi*, pode agir sobre o ácido siálico presente em células cardíacas, permitindo o parasitismo intracelular (LIBBY et al., 1986). Estas observações também foram confirmadas por SHENKMANN et al. (1991 e 1992),

que identificaram a transialidase transferindo o ácido siálico da superfície da célula hospedeira para a superfície do parasito, viabilizando a penetração do *T. cruzi* na célula. Nesta investigação SHENKMANN et al. (1991 e 1992) sugerem que a transialidase e neuroaminidase são a mesma molécula, pois apresentam a mesma atividade enzimática.

Estes dados podem explicar porque a cepa Colombiana, diferentemente das outras cepas estudadas, determina lesões mais intensas no *C. callosus*, embora haja controle da infecção e regressão espontânea da fibrose neste modelo.

As lesões fibrótico-inflamatórias determinadas pela cepa Colombiana e a fibroclasia observadas neste estudo, descritas no manuscrito 2 (parte desta tese) MAGALHÃES-SANTOS et al. (2002) foram confirmadas pela quantificação da inflamação e da fibrose, por análise morfométrica. Os resultados do manuscrito 2 demonstraram através da imunotipagem do colágeno e de outros componentes da matriz, uma fibrogênese precoce, com regressão espontânea, no coração e no músculo esquelético de *C. callosus* em diferentes fases da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Comparando o modelo murino com o *C. callosus*, quanto aos aspectos evolutivos da fibrose, o camundongo apresenta um quadro evolutivo de infecção, lento e progressivo, até atingir a fase crônica, correspondendo ao período entre 150 a 200 dias de infecção. A fibrose que se estabelece neste período, não regride espontaneamente como ocorre no *C. callosus*, mas pode ser observada, quando os camundongos são submetidos ao tratamento quimioterápico específico (ANDRADE et al., 1991).

Em estudos paralelos, MAGALHÃES-SANTOS e ANDRADE (2003 manuscrito 3 - submetido), demonstraram que a presença *in situ* de citocinas inflamatórias como TNF- α e IFN- γ e citocinas pró-fibrogênicas como TGF- β presentes na fase inicial da infecção, possivelmente estão contribuindo na determinação das lesões observadas no modelo, associados evidentemente com o comportamento biológico da cepa (Biodema tipo III).

Estes achados sugerem que *C. callosus* apresenta um padrão de resposta imune rápido e precoce, permitindo a sobrevivência do hospedeiro. Isto o torna um reservatório natural do *T. cruzi*, pois já foi demonstrado na literatura que mesmo não apresentando parasitos no sangue, o xenodiagnóstico do animal é positivo (ANDRADE, et al., 1994).

Neste estudo, a cepa Colombiana, diferentemente das cepas 21SF e Y, determinou no *C. callosus* uma fibrogênese precoce e intensa, seguida de fibroclasia espontânea em coração e em músculo esquelético. Estes aspectos nos direcionou para uma nova investigação, no sentido de avaliar a evolução da fibrose e a sua regressão, através da caracterização dos componentes da matriz extracelular presentes neste processo, em diferentes fases da infecção.

Neste segundo estudo, os componentes da matriz extracelular presentes na fibrose e na fibroclasia em coração e músculo esquelético de *C. callosus* infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, demonstrou que diferentes tipos de colágenos (I, III e IV), laminina e fibronectina fizeram parte da composição desta matriz fibrosa.

Observou-se que a degradação da matriz presente no coração e no músculo esquelético do *C. callosus* apresentou uma relação direta com a diminuição do infiltrado inflamatório. A regressão da fibrose na miocardite chagásica foi demonstrada por ANDRADE et al. (1991) em camundongos infectados com diferentes cepas do *T. cruzi*, após tratamento com quimioterápico específico, na fase crônica. Os achados demonstraram que após o tratamento, houve reabsorção da matriz colagênica, associada à diminuição do infiltrado inflamatório no miocárdio, com a cura do animal.

A resposta imune do *C. callosus* infectado pelo *T. cruzi* difere do camundongo neste aspecto, porque a regressão do infiltrado inflamatório e a degradação do colágeno ocorrem espontaneamente, sem haver nenhuma intervenção quimioterápica. Esta peculiaridade do *C. callosus* ainda é pouco compreendida, pois provavelmente existem fatores moleculares inerentes ao modelo que podem estar modulando este mecanismo de controle natural.

É evidente que o controle do parasitismo e da inflamação, descrito nos dois modelos, é importante fator determinante, para a resolução das lesões fibrótico-inflamatórias. Pois, tem sido sugerido que o processo inflamatório em doenças parasitárias, atuam como potentes promotores da formação de matriz intersticial, e esta deposição matricial pode ser reabsorvida quando a causa (patógeno) é removida (ANDRADE, 1994).

O *C. callosus* infectado com o *T. cruzi* apresenta uma regressão rápida e dinâmica das lesões fibrótico-inflamatórias, correspondendo à queda da parasitemia, embora haja persistência da infecção, como foi demonstrado em estudos prévios através de xenodiagnóstico (ANDRADE et al., 1994). Portanto, a

dinâmica da evolução e da regressão da fibrose na infecção pelo *T. cruzi*, reforça a existência da relação parasito-hospedeiro sugerida na literatura (BORGES et al., 1995), sendo que este mecanismo de resposta do hospedeiro caracteriza uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia (ANDRADE et al., 1987; DOS REIS, 1997), possivelmente acompanhada por uma regulação negativa (*down regulation*) deste mecanismo (ANDRADE et al., 1994).

Os depósitos matriciais no coração e músculo esquelético de *C. callosus* foram bastante precoces, principalmente o colágeno. Provavelmente citocinas fibrogênicas liberadas por macrófagos ativados nos sítios das lesões necróticas, já bem descrita no modelo murino (ZHANG e TARLETON, 1996), podem estar modulando esta fibrogênese precoce no *C. callosus*.

É possível que esta matriz colagênica seja constantemente degradada por fatores proteolíticos bem descritos na literatura, como as metaloproteinases, que atuam diretamente em fibras colágenas e em outros componentes matriciais degradando-os (VARO et al., 2000).

Avaliando o perfil dos tipos de componentes da matriz extracelular presentes no *C. callosus*, observou-se que houve um predomínio dos colágenos tipo III e IV. Estes mesmos tipos de colágeno, também estão presentes na fibrose tecidual no camundongo infectado (ANDRADE et al., 1989), contudo existe uma diferença referente à presença do colágeno tipo I, que foi demonstrado no *C. callosus* e foi ausente no camundongo.

Diferentes autores têm chamado a atenção para a influência do tipo genético do colágeno, que pode ser degradado em tempos distintos, durante o processo de reabsorção da fibrose hepática (ROJKIND e DUNN, 1979; GRIMAUD

et al., 1980). Entretanto, foi demonstrado posteriormente que a regressão da fibrose no granuloma esquistossomótico, independe do tipo genético do colágeno presente, pois colágeno tipo I e III são degradados gradualmente e ambos desaparecem simultaneamente (ANDRADE e GRIMAUD, 1986; ANDRADE, 1992).

Os resultados obtidos neste estudo de caracterização dos componentes da matriz indicam que existe uma forte correlação entre a regressão da fibrose e o precoce e espontâneo controle da replicação do *T. cruzi* no modelo do *C. callosus*. A fibrose intensa observada nos animais infectados, foi reabsorvida ao mesmo tempo em que o infiltrado inflamatório regrediu, independentemente dos diferentes tipos de colágeno presentes no interstício.

Estes achados levantam a hipótese de que as alterações fibrótico-inflamatórias observadas neste modelo, provavelmente estão sendo moduladas por citocinas pró-inflamatórias e fibrogênicas. Portanto, uma nova abordagem, complementar aos estudos anteriores foi estabelecida, no sentido de investigar a presença de IFN- γ , TNF- α e TGF- β *in situ*, nas diferentes fases evolutivas da infecção.

A caracterização de citocinas *in situ* nesta nova abordagem demonstrou que o TNF- α , o IFN- γ e o TGF- β foram detectados no citoplasma de células mononucleares como macrófagos e também no interstício, correspondendo a áreas de necrose no coração e no músculo. Estas citocinas foram detectadas desde a fase inicial da infecção (15 dias), diminuindo de intensidade rapidamente até o 45^o dia e completamente ausentes aos 60 dias de infecção, exceto o IFN- γ .

A investigação de citocinas *in situ* no *C. callosus* atualmente apresenta limitações técnicas, uma vez que não existem anticorpos monoclonais espécie-específicos. Neste caso, utilizamos linhagens de células obtidas de camundongo, como controle positivo das reações. Na reação de imunohistoquímica, as células L-929 (fibroblastos), não estimuladas em cultura foram positivas para TGF- β e as células J-774, estimuladas com LPS foram positivas para TNF- α . Embora as células J-774 pertençam a uma linhagem macrófágica, também apresentaram positividade para IFN- γ na reação de imunohistoquímica, pois recentemente foi demonstrado que macrófagos podem ser ativados de forma autócrina pela IL-18, a liberar óxido nítrico e quimiocinas como TNF- α e IFN- γ na infecção por *Listeria monocytogenes* (SWAIN, 2001).

Neste estudo, os anticorpos monoclonais específicos de camundongo que foram utilizados apresentaram reatividade cruzada com antígenos do *C. callosus*, sugerindo que as citocinas de ambas espécies apresentam certa homologia, confirmando dados anteriores de BORGES et al. (1995) que demonstraram reatividade cruzada entre IFN- γ de camundongo e *C. callosus*.

A presença destas citocinas no coração e no músculo esquelético esteve fortemente associada com infiltrado inflamatório entre o 15^o e o 45^o dia de infecção, diferindo das observações de TARLETON e ZHANG (1996), que demonstraram as mesmas citocinas no baço de camundongos, desde a fase aguda até a fase crônica da infecção. Contudo os próprios autores comentam que estas observações são restritas ao baço e que possivelmente em outros órgãos o padrão de resposta pode ser diferente.

A evolução das lesões observadas no camundongo infectado com a cepa Colombiana do *T. cruzi* mostra uma proliferação intracelular dos parasitos, com formas amastigotas bem preservadas até a fase avançada da infecção aguda (ANDRADE, 1985). O *C. callosus* infectado com a cepa Colombiana apresenta um comportamento evolutivo das alterações teciduais bem distinto. As lesões teciduais evoluem rápida e precocemente, correspondendo ao período em que a parasitemia está no seu pico mais elevado (14 dias). Neste período verifica-se uma intensa proliferação de parasitos no interior de fibra muscular cardíaca e esquelética. Esta proliferação é rapidamente detida com a destruição dos parasitos, o que se verifica na análise histopatológica, demonstrando focos de destruição e necrose destas fibras. As citocinas investigadas neste estudo estão exatamente presentes nestes sítios de lesão. Estas observações podem apontar uma característica do *C. callosus*, a dele ser altamente susceptível à infecção pelo *T. cruzi*, mas que, imediatamente, passa a controlar o parasitismo com a liberação de TNF- α e também do IFN- γ , que tem sido descrito como ativador de macrófago para produzir H₂O₂ para destruir os parasitos, uma vez que não sintetizam óxido nítrico, mesmo quando macrófagos são inespecificamente estimulados *in vitro* (BORGES et al., 1994; OLIVEIRA et al., 1997).

No camundongo, tem sido demonstrado que macrófagos de animais susceptíveis apresentam uma maior produção de TNF- α do que macrófagos de animais resistentes (RUSSO et al., 1989). Este é um aspecto que se assemelha ao *C. callosus*, pois na fase inicial da infecção a distribuição de TNF- α no

interstício é bastante intensa e está associado com a destruição parasitária e com alterações necróticas teciduais.

Em estudo recente, LIMA et al. (2001) investigaram a participação do TNF- α em baço de camundongos infectado com cepa macrofagotrópica (Biodema tipo I), na fase aguda da infecção. Os achados demonstraram que nas áreas de destruição maciça com necrose tecidual, o TNF- α estava presente. Anteriormente, CORDEIRO et al. (1997), já haviam demonstrado que a necrose de macrófagos parasitados correspondia a uma queda da parasitemia e início de uma fase de resistência à infecção.

Já é bem conhecido na literatura que a presença do IFN- γ e tipos celulares como macrófagos e células NK, durante a fase inicial da infecção pelo *T. cruzi*, caracteriza uma resposta imune inata (ABRAHAMSOHN, 1998). A participação de células NK1.1 nesta fase, tem sido considerada de grande importância na resposta imune inata, pois são potentes produtoras de IFN- γ e indiretamente contribuem na regulação da replicação do parasito (CARDILLO et al., 1996).

O papel do IFN- γ no controle da infecção no *C. callosus* comparado ao modelo murino foi avaliado por BORGES et al. (1995), e os resultados demonstraram que os níveis de IFN- γ no soro dos dois modelos experimentais infectados com a cepa F do *T. cruzi*, foram elevados com 7 dias de infecção. Entretanto, macrófagos peritoneais de *C. callosus*, diferentemente do camundongo, liberaram grandes quantidades de H₂O₂, no período em que os níveis de IFN- γ estavam elevados.

Neste estudo, procuramos quantificar pelo teste ELISA, os títulos do TGF- β , do IFN- γ e do TNF- α no soro dos animais infectados, nas diferentes fases evolutivas da infecção. Entretanto, os resultados foram negativos, apesar dos controles e curva padrão apresentarem resultados positivos (dados não mostrados). Possivelmente, estas moléculas estão mais bem preservadas no tecido e por isso não foi possível detectá-las no soro pois, podem ser rapidamente consumidas. Ou ainda, os anticorpos monoclonais utilizados como anticorpo de captura ou de detecção possivelmente não conseguiram reconhecer as moléculas.

De acordo com SILVA et al. (1991), a regulação do IFN- γ na fase em que os parasitos intracelulares estão maciçamente destruídos é mediada pelo TGF- β produzido por macrófagos durante a fase aguda da infecção. Sabe-se que o TGF- β é um potente inibidor da atividade tripanocida de macrófagos, tendo portanto um importante papel na regulação da infecção (SILVA, et al., 1991).

No nosso estudo, a presença do TGF- β nas lesões de miocárdio e de músculo esquelético foi demonstrada desde a fase inicial da infecção, indicando que a sua participação na modulação de outras citocinas e na determinação da fibrogênese precoce, acompanha o processo de reparo das lesões. As lesões exsudativas, características da destruição de parasitas intracelulares foram acompanhadas pela presença de coleções de macrófagos e de células epitelióides que formavam reação tipo granulomatosa, em meio à proliferação de fibroblastos, caracterizando uma resposta de hipersensibilidade do tipo tardia.

Neste estudo, fica bem claro que a estimulação da fibrogênese está associada à presença de macrófagos e fibroblastos, apresentando citoplasma

positivo para TGF- β pela imunomarcção específica, além dos achados histopatológicos demonstrarem fibrose intersticial em coração e em músculo esquelético. Portanto, o TGF- β no modelo experimental do *C. callosus*, também representa uma citocina pró-fibrogênica e regulatória, como tem sido descrita na literatura (BRANTON e KOPP, 1999; VARGA et al., 1987).

O desaparecimento das citocinas *in situ*, investigadas neste estudo, coincidiu com a regressão do infiltrado inflamatório e resolução das lesões fibróticas, num período que correspondeu ao 60^o dia de infecção. Assim os resultados do presente estudo, sugerem que citocinas como IFN- γ e o TNF- α estão relacionadas com controle da replicação do parasito, previamente demonstrado no *C. callosus* (BORGES et al., 1995) e no camundongo (LIMA et al., 2001), respectivamente. Estes achados demonstraram que o *C. callosus* é um animal altamente susceptível, mas que, concomitantemente, desenvolve um perfil de alta resistência, demonstrada pela sua capacidade de controlar a proliferação do parasito, com mortalidade nula durante o curso da infecção. Estas características em conjunto, possivelmente contribuem para que este animal silvestre seja um reservatório natural do *Trypanosoma cruzi*.

8.CONCLUSÕES

- 1- O *Calomys callosus* infectado com cepas do *Trypanosoma cruzi* pertencentes a diferentes Biomas, desenvolve alterações fibrótico-inflamatórias bem distintas, confirmando dados da literatura sobre a importância da cepa do parasito na determinação das lesões no hospedeiro.
- 2- As cepas de Tipos I e II determinam lesões pouco intensas, sem componente fibrogênico que regridem precocemente enquanto a cepa de Tipo III determina lesões fibrótico-inflamatórias intensas, com regressão espontânea do processo, indicando a importância da combinação cepa do *T. cruzi* X hospedeiro vertebrado, na infecção experimental.
- 3- No modelo do *Calomys callosus* a regressão da fibrose ocorre independentemente dos tipos de colágenos (tipos I, III e IV) identificados pela imunohistoquímica.
- 4- Foi observada provável correlação entre a presença de citocinas (IFN- γ , TNF- α e TGF- β) e as lesões necrótico-exsudativas, inflamatórias e fibróticas e o controle e regressão das mesmas lesões, permitindo a sobrevivência do animal.
- 5- Estes achados em conjunto demonstram que o *C. callosus* é um animal altamente susceptível, mas que, paralelamente, desenvolve um padrão de alta resistência, reforçando a sua importância como reservatório natural do *T. cruzi*.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABBAS AK, LICHTMAN AH, POBER JS. Cellular and molecular immunology: Cap 12 Cytokines. Second Edition. W.B. Saunders Company, Philadelphia, Pennsylvania. pp. 240-260, 1994.
- ABRAHAMSOHN IA. Cytokines in innate and acquired immunity to *Trypanosoma cruzi* infection. **Braz. J. Med. Biol. Res.** **31**: 117-121, 1998.
- AGARWAL AN, BEHERA D. Interferon-gamma 1b: impact of new indications (idiopathic pulmonary fibrosis). **Exp. Opin. Pharmac.** **1**: 1423-1427, 2000.
- ANDRADE S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. **Rev. Patol. Trop.** **3**: 65-121, 1974.
- 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**, **86**: 187-200, 1991.
- ANDRADE SG, ANDRADE V, BRODSKYN C, MAGALHÃES JB. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **79**:397-407, 1985.
- ANDRADE SG, FREITAS LAR. *Trypanosoma cruzi*: myocells alterations due to spontaneous or therapeutically induced intracellular parasite desintegration. **Cell. Mol. Biol.** **33**: 797-805, 1987.
- ANDRADE SG, GRIMAUD J.A., STOCKER-GUERRET S. Sequential changes of the connective matrix components of the myocardium (fibronectin and laminin) and

evolution of cardiac fibrosis in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 40: 252-260, 1989.

ANDRADE SG, GRIMAUD JA. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* – an ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 81: 29-41, 1986.

ANDRADE SG, KLOETZEL JK, BORGES MM, FERRANBS VJ. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 89: 379-393, 1994.

ANDRADE SG, PIMENTEL AR, SOUZA MM, ANDRADE Z. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: Importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 63: 64-70, 2000.

ANDRADE SG. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo baiano. **Rev. Patol. Trop.** 3: 65-21, 1974.

ANDRADE SG. in BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: PATOLOGIA EXPERIMENTAL DA DOENÇA DE CHAGAS (), Cap. 11 pp. 177-200.: Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2000.

ANDRADE SG. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on the pathogenesis of chronic cardiomyopathy in mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 85: 17-27, 1990.

ANDRADE V, ANDRADE SG, BARRAL-NETO M, PONTES AL, CASTRO L. Avaliação do comportamento de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi* na

infecção de seis linhagens isogênicas de camundongos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **18**: 143-154, 1985c.

ANDRADE SG, ANDRADE V, ROCHA FILHO FD, BARRAL NETTO MB. Antigenic analysis of various strains of *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** **23**:245-50, 1981.

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

ANDRADE Z.A. Extracellular matrix degradation in parasitic disease. **Braz. I. Med. Biol. Res.** **27**: 2273-2281, 1994.

ANDRADE Z.A., RAMALHO L.M.P. Miocardite Chagásica. Estudo morfológico de 38 casos comprovados pelo encontro de parasitas nas secções histopatológicas. **Gaz. Méd. Bahia.** **66**: 55-67, 1966.

ANDRADE ZA, ANDRADE SG, CORREA R, SADIGURSKY M, FERRANS VJ. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. **Am J Path**, **144**: 1403-1411, 1994.

ANDRADE ZA, ANDRADE SG, CORREA R, SADIGURSKY M, WENTHOLD JR RJ, HILBERT SL, FERRANS VJ. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. **Am J Trop Med Hyg**, **57**: 328-336, 1997.

ANDRADE ZA, ANDRADE SG, SADIGURSKY M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am J Path**, **127**: 467-473, 1987.

ANDRADE ZA, ANDRADE SKY M, LIMA JAC. Doença de Chagas experimental no cão. Relação morfológica e eletrocardiográfica na fase aguda da infecção. **Arq. Bras. Cardiol.** 35:485-490, 1980.

ANDRADE ZA. Tecido conjuntivo, reparo, regeneração e cicatrização. In: MONTENEGRO MR, FRANCO M. Patologia: Processos gerais 3a. Edição, Editora Atheneu, São Paulo e Rio de Janeiro, 1992.

ANDRADE ZA. The canine model of Chagas' disease. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, 79: 77-83, 1984.

ANDRADE, S.G.; ANDRADE, Z.A. Aspectos anátomo-patológicos e resposta terapêutica na infecção chagásica crônica experimental. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** 18: 268-275, 1976.

ANDRADE, S.G.; GRIMAUD, J.A. Chronic murine myocarditis due to *Trypanosoma cruzi* - An ultrastructural study and immunochemical characterization of cardiac interstitial matrix. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 81: 29-41, 1986.

ANDRADE, Z.A. Extracellular matrix degradation in parasitic diseases. **Braz. J. Med. Biol. Res.** 27: 2273-2281, 1994.

ARAÚJO-JORGE, T.; WAGHABI, M.C.; HASSLOCHER-MORENO, M.; XAVIER, S.S.; HIGUCHI, M.L.; KERAMIDAS, M.; BAILLY, S.; FEIGE, J.J. Implication of transforming growth factor- β 1 in Chagas disease cardiomyopathy. **J. Inf. Dis.** 186: 1823-1828, 2002.

BORGES M.M., KLOETZEL J.K., ANDRADE JR. H.F., TADOKORO C.E., PINGE-FILHO P., ABRAHAMSOHN I. Prostaglandin and nitric oxide regulate IFN- γ production during *Trypanosoma cruzi* infection. **Immunol. Lett.** 63: 1-8, 1998.

BORGES MM, ANDRADE SG, PILATTI CG, PRADO Jr JC, KLOETZEL JK. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **87**: 493-502, 1992.

BORGES MM, MELLO DA, TEIXEIRA ML. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia – Cricetidae) com *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Saúde Publ. São Paulo**, **16**: 233-42, 1982.

BORGES MM, MELLO DA. Infectividade de cepas silvestres de *Trypanosoma cruzi* mantidas em cultura, para *Calomys callosus* (Rodentia) e camundongos albinos. **Rev. Patol. Trop.** **9**: 145-51, 1980.

BORGES MM, VASSAO R, ANDRADE SG, PEREIRA CA, KLOETZEL JK. IFN- γ levels during the course of *Trypanosoma cruzi* infection of *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) and Swiss mice. **Parasitol. Res.** **81**: 498-504, 1995.

BORGES MM, VASSAO RC, PEREIRA CA, KLOETZEL JK. γ -IFN and macrophage respiratory burst in *Calomys callosus* with *Trypanosoma cruzi* bloodstream and metacyclic forms. **Immunol. Lett.** **42**: 81-85, 1994.

BORGES, M.M.; ANDRADE, S.G.; PILATTI, C.G.; PRADO JR, J.C.; KLOETZEL, J.K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**. **87**: 493-502, 1992.

BORGES, M.M.; VASSÃO, R.C.; PEREIRA, C.A.; KLOETZEL, J.K. γ -IFN and macrophage respiratory burst in *Calomys callosus* challenged with *Trypanosoma cruzi* bloodstream and metacyclic forms. **Immun. Lett.** **42**: 81-85, 1994.

BRANTON, M.H.; KOOP, J.B. TGF- β and fibrosis. **Microb. Infec.** 1:1349-1365, 1999.

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. **Infec. Immun.** 64: 128-134, 1996.

CHEN G, GOEDDEL DV. TNF-R1 signaling: A beautiful pathway. **Science** 296: 1634-1635, 2002.

COKER, R.K.; LAURENT, G.J.; SHAHZEIDI, S.; LYMPANY, P.A.; DUBOIS, R.M.; JEFFERY, P.K.; McANULTY, R.J. Transforming Growth Factors- β 1, - β 2, and β 3 stimulate fibroblasts procollagen production in vivo but are differentially expressed during bleomycin-induced lung fibrosis. **Am J. Pathol.** 150: 981-991, 1997.

COURA J.R.; VINHAES M.C.; PINTO-DIAS J.C. Situação epidemiológica atual da doença de Chagas no Brasil. **Rev. Patol. Trop.** 29: 33-45, 2000.

CUNHA-NETO E, COELHO V, GUILHERME L, FIORELLI A, STOLF N, KALIL J. Autoimmunity in Chagas' disease. Identification of cardiac myosin-B 13 *Trypanosoma cruzi* protein crossreactive T cells clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient. **J Clin Invest**, 98: 1709, 1996.

CUNHA-NETO E, DURANTI M, GRUBER A, ZINGALES B, DE MESSIAS I, STOLF N, BELLOTTI G, PATARROYO ME, PILLEGGI F, KALIL J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Nat. Acad. Sci.** 92: 3541, 1995.

DAVIDSON JM, BENN SI. Regulation of angiogenesis and wound repair: Interactive role of the matrix and growth factors. In: Cellular and Molecular

Pathogenesis. Edited by A.E. Sirica Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, pp79-107, 1996.

DIAS JC. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical epidemiological review. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **22**: 147-156, 1989.

DIAS JCP. in BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: EPIDEMIOLOGIA, Cap. 5 pp. 48-74.: Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2002.

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

DUNCAN MR, BERMAN B. Gamma interferon is the lymphokine and beta interferon the monokine responsible for inhibition of fibroblast collagen production and late but not early fibroblast proliferation. **J. Exp. Med.** **162**: 516-527, 1985.

EDWARDS DR, MURPHY G, REYNOLDS JJ, WHITHAM SE, DOCHERTY AJP, ANGEL P, HEATH JK. Transforming growth factor beta modulates the expression of collagenase and metalloproteinase inhibitor. **EMBO** **6**: 1899-1904, 1987.

EICKELBERG O., SOMMERFELD C.O., WYSER C., TAMM M., REICHENBERGER F., BARDIN P.G., SOLER M., ROTH M., PERRUCHOUD A.P. MMP and TIMP expression pattern in pleural effusions of different origins. **Am. J. Respir. Crit. Care Med.** **156**: 1987-1992, 1997.

FRANGOIANNIS NG, MENDOZA LH, LINSEY ML, BALLANTYNE CM, MICHAEL LH, SMITH CW, ETMAN ML. IL-10 is induced in the reperfused myocardium and may modulate the reaction to injury. **J Immunol.** **165**:2798-2808, 2000.

FRIEDMAN SL. Cytokines and fibrogenesis. **Seminar in Liver Disease** 19: 129-137, 1999.

FUNDAÇÃO NACIONAL DE SAÚDE. Doenças Infecciosas e Parasitárias: aspectos clínicos, vigilância epidemiológica e medidas de controle. Guia de Bolso Segunda Edição, 2000.

GAZZINELLI G., BRENER Z. Immunological aspects of the morbidity of human Chagas 'disease. **Res. Immunol.** 142: 167-169, 1991.

GOMEZ D.E., LORENZO M.S., ALOUSO D.F., ANDRADE Z.A. Expression of metalloproteinases (MMP-1, MMP-2, MMP-9) and their inhibitors (TIMP-1 and TIMP-2) in schistosomal portal fibrosis. **Aur. J. Trop. Med. Hyg.** 61: 9-13, 1999.

GRANSTEIN RD, MURPHY GF, MARGOLIS RJ, BYRNE MH, AMENTO EP. Gamma-interferon inhibits collagen synthesis in vivo in the mouse. **J. Clin. Invest.** 79: 1254-1258, 1987.

GRIMAUD JA, ANDRADE SG. Trypanosoma cruzi: Relationship between the intracellular parasitic forms and cardiac myocells. **Cel. Mol. Biol.** 30:59-65, 1984.

HAQUE MF, MEGHJI S, NAZIR R, HARRIS M. Interferon-gamma (IFN-gamma) may reverse oral submucous fibrosis. **J. Oral Pathol Med** 30: 12-21, 2001.

GRIMAUD JA, DRUGUET M, PEYROL S, CHEVALIER O, HERBAGE D, EL BADRAWY N. Collagen immunotyping in human liver: light and electron microscope study. **J. Histochem. Cytochem.** 28: 1145-56, 1980.

HEIS-VAHIDI-FARD N, FIRBERG E, EICHINGER S, CHOTT A, LECHNER K, GISSLINGER H. Ineffectiveness of interferon-gamma in the treatment of idiopathic myelofibrosis: a pilot study. **Ann. Hematol.** 80: 79-82, 2001.

HENRI S, CHEVILARD C, MERGANI A, PARIS P, GAUDART J, CAMILLA C, DESSEIN H, MONTERO F, ELWALI NE, SAEED OK, MAGZOUB M, DESSEIN AJ. Cytokine regulation of periportal fibrosis in humans infected with *Schistosoma mansoni*: IFN-gamma is associated with protection against fibrosis and TNF-alpha with aggravation of disease. **J. Immunol.** **169**: 929-936, 2002.

HIGUCHI ML, GUTIERREZ PS, AIELLO VD, PALOMINO S, BOCCHI E, KALIL J, BELLOTTI G, PILLEGGI F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A.** **423**: 157-160, 1993.

HIGUCHI, ML. Invited Review. Chronic chagasic cardiopathy: The product of a turbulent host-parasite relationship. **Rev. Inst. Med. Trop São Paulo**, **39**: 53-60, 1997.

HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M, SAID G, MILTON G, MARSHAL G, EISEN H. L3T4 + T cells able to mediate parasite-specific delayed hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. **Eur J Immunol**, **17**: 1027-1033, 1987.

I REUNIÃO ANUAL DE PESQUISA APLICADA EM DOENÇA DE CHAGAS – Validade do conceito de forma indeterminada da doença de Chagas. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **18**:46, 1985.

JONES EM, COLLEY DG, TOSTES S, LOPES R, VNENCAK-JONES CL, MCCURLEY TL. Amplification of *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg**, **48**: 348-357, 1993.

JUSTINES G, JOHNSON KM. Immune tolerance in *Calomys callosus* infected with Machupo virus. **Nature**. **222**: 1090-91, 1969.

KANE, C; HEBDA, P.; MANSBRIDGE, J.; HANAWALT, P. Direct evidence for spatial and temporal regulation of transforming growth factor beta 1 expression during cutaneous wound healing. **J. Cell Physiol**. **148**: 157-73, 1991.

KOVACS EJ. Fibrogenic cytokines: the role of immune mediators in the development of scar tissue. **Immun. Today**, **12**: 17-23, 1991.

LENZI, JA, MOTA EM, PELAJO-MACHADO M, PAIVA RAN, LENZI HL. *Calomys callosus*: an alternative model to study fibrosis in schistosomiasis mansoni. The pathology of the acute phase. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, **90**: 311-318, 1995.

LIBBY P, ALROY J, PEREIRA ME. A neuraminidase from *Trypanosoma cruzi* removes sialic acid from the surface of mammalian myocardial and endothelial cells. **J. Clin. Invest**. **Jan**; **77**:127-35, 1986.

LIJNEN PJ, PETROV VV, FAGARD RH. Induction of cardiac fibrosis by transforming growth factor beta (1). **Mol. Genet. Metab**. **71**:418-435, 2000.

LIMA E.C.S., GARCIA I., VICENTELLI M.H., VASSALLI P., MINOPRIO P. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infec. Immun**. **65**: 457-465, 1997.

LIMA E.S., ANDRADE Z.A., ANDRADE S.G. TNF- α is expressed at site of parasites and tissue destruction in the spleen of mice acutely infected with *trypanosoma cruzi*. **Int. J. Exp. Pathol**. **82**: 327-336, 2001.

MAGALHÃES-SANTOS IF, LIMA ES, ANDRADE SG. .Fibrogenesis and collagen resorption in the heart and skeletal muscle of *Calomys callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Immunohistochemical identification of extracellular matrix components. **Mem Inst. Oswaldo Cruz: 97**, 703-710. 2002.

MARIN-NETO JA, SIMÕES MV, SARABANDA AVL. in BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: FASE CRÔNICA, Cap. 15 pp. 265-296.: Editora Guanabara Koogan S.A. Rio de Janeiro, 2000.

MELLO D.A. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Renger 1830), (Cricetidae – Rodentia) a quatro espécies de parasitos. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop. 13**:101-105, 1979.

MELLO DA, TEIXEIRA ML. Infecção experimental de *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) com *Leishmania donovani chagasi*. **Rev. Saúde Publ. 18**: 337-41, 1984.

MELLO DA, TEIXEIRA ML. Nota sobre infecção natural do *Calomys expulsus*, Lund 1841, (Rodentia-Cricetidae). **Rev. Saúde Publ. São Paulo, 11**:561-4, 1977.

MELLO DA, VALINE E, TEIXEIRA ML. Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres do *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys callosus* (Rodentia). **Rev. Saúde Publ. São Paulo, 13**:314-25, 1979.

MINOPRIO P; ITOHARA, S; HEUSSER, C; TONEGAWA, S; COUTINHO, A. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. **Immunol. 112**: 183-207, 1989c.

MONTENEGRO, M.R. & FECCHIO, D. Inflamação: conceitos gerais e inflamação aguda. In: MONTENEGRO, M.R. & FRANCO, M. Patologia, processos gerais. 3.ed. São Paulo: Atheneu,. Cap. 6., p.99-117, 1992.

MOSCA, W; BRICENO, L; HERNANDEZ, M. I. Cell-mediated immunity in Chagas disease: *Trypanosoma cruzi* antigens induce suppression of the *in vitro* proliferative response of mononuclear cells. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **86:** 147-152, 1991.

MUNOZ-FERNANDEZ M.A., FERNANDEZ M.A., FRESNO M. Synergiom 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.** **22:** 301-307, 1992.

MURRAY, H.W.; SPITALNY, G,L,; NATHAN, C.F. Activation of mouse peritoneal macrophages in vivo and in vitro by interferon-gamma. **J. Immunol.** **146:** 3591-3598, 1985.

NEVES, N.M.A. O papel da trans-sialidase do *Trypanosoma cruzi* na interação parasito hospedeiro, Tese de Doutorado, 1998.

NOGUEIRA N, BIANCO C, CONH Z. Studies on the selective lysis and purification of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** **142:** 224, 1975.

OLIVEIRA Jr WA, SALAZAR LF, MALTA J, ASSI N. Análise crítica da forma indeterminada da doença de Chagas. **Arq. Bras. Card.** **47:** 283-288, 1986.

OLIVEIRA L, BORGES MM, LEAL R.C, ASSRENY J, KLOETZEL JK. Nitric oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Calomys callosus* and Swiss mice. **Parasitol. Res.** **83:** 762-70, 1977.

OLIVEIRA, L.C.; BORGES, M.M.; LEAL, R.C.; ASSREUY, J.; KLOETZEL, J.K. Nitric oxide involvement in experimental *Trypanosoma cruzi* infection in *Calomys callosus* and Swiss mice. **Parasitol. Res.** **83**: 762-770, 1997.

OMER, F.M.; KURTZHALS, J.A.; RILEY, E.M. Maintaining the immunological balance in parasitic infections: a role for TGF-beta? **Parasitol. Today** **16**: 18-23, 2000.

PELTONEN, L.; HALILA, R.; RYHANEN, L. Enzymes converting procollagens to collagens. **J. Cel. Biochem.** **28**: 15-21, 1985.

PEREIRA ME, HOFF R. Heterogeneous distribution of neuraminidase activity in strains and clones of *Trypanosoma cruzi* and its possible association with parasite myotropism. **Mol. Biochem. Parasitol.** **20**:183-9, 1986.

PINHO R.T., VANNIER-SANTOS M.A., ALVES C.R., MARINO A.P.M.P., CASTELLO BRANCO L.R.R., LANNES-VIEIRA J. Effect of *Trypanosoma cruzi* released antigens binding to non-infect cells on anti-parasite antibody recognition and expression of extracellular matrix components. **Acta. Tropica** **83**: 103-115, 2002.

PONTES-DE-CARVALHO L, SANTANA CC, SOARES MB, OLIVEIRA GG, CUNHA-NETO E, RIBEIRO-DOS-SANTOS R. Experimental chronic Chagas' disease myocarditis is an autoimmune disease preventable by induction of immunological tolerance to myocardial antigens. **J. Autoimmun.** **18**:131-8, 2002.

RASSI, A.; RASSI-JUNIOR, A.; RASSI, G.G. in BRENER Z, ANDRADE Z, BARRAL-NETO M. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: FASE AGUDA, Cap. 13 pp. 231-245. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro S.A., 2000.

REED S.G. *In vivo* administration of recombinant IFN- δ induces macrophages activation, and prevents acute disease, immunosuppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** **140**: 4342-4347, 1988.

REIS D.D., JONES E.M., TOSTES J.S., LOPES E.R., GAZZINELLI G., COLEY D.G., MC CURLEY T.L. Characterization of inflammatory infiltrate in chronic chagasic myocardial lesions: Presence of Tumor necrosis Factor- α cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **48**: 637-644, 1993.

REIS, M.M.; HIGUCHI, M.L.; AIELLO, V.D.; BENVENUTI, L.A. Fatores de crescimento presentes no miocárdio de pacientes com cardiopatia chagásica crônica. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** **33**: 509-518, 2000.

RIBEIRO RD. Novos reservatórios de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Bras. Biol.** **33**: 429-537, 1973.

RIBEIRO-DOS-SANTOS R., ROSSI M.A., LAUS J.L., SILVA J.S., SAVINO W., MENGEL J. Anti-CD4 a brogates rejection and reestabliohes long-term tolerance to syngenic new Born heats grafted in mice chomically infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** **175**:29-39, 1992

ROJKIND M, DUNN MA. Hepatic fibrosis. **Gastroenterology.** **76**:849-63, 1979.

ROMANÃ C. Acerca de un síntoma inicial de valor para el diagnóstico de forma aguda de la enfermedad de Chagas. La conjuntivitis esquizotripanósica unilateral. (Hipótesis sobre puerta de entrada conjuntival de la enfermedad.) Public MEPRA, **22**: 16-28, 1935.

ROSSI M.A., SILVA J.C. Permeability alteration of the sarcolemmal membrane, particularly at the site of macrophage contract, in experimental *Trypanosoma cruzi* myocarditis in mice. **Int. J. Exp. Path.** **71**: 545-555, 1990.

RUSSO M, STAROBINAS N, RIBEIRO-DOS-SANTOS R, MINOPRIO P, EISEN H, HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** **11**: 385-95, 1989.

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

SCHENKMAN S, JIANG MS, HART GW, NUSSENZWEIG V. A novel cell surface trans-sialidase of *Trypanosoma cruzi* generates a stage-specific epitope required for invasion of mammalian cells. **Cell.** **65**: 1117-25, 1991.

SCHENKMAN S, PONTES DE CARVALHO L, NUSSENZWEIG. *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase and neuraminidase activities can be mediated by the same enzymes. **V. J Exp Med.** **175**: 567-75, 1992.

SCOTT P, TRINCHIERI G. The role of natural killer cells in host-parasite interactions. **Curr. Opin. Immunol.** **7**: 34, 1995.

SILVA J.S. MORRISSEY, P. J; GRABSTEIN, K. H; MOHLER, K. M; ANDERSON, D; REED, S. G. Interleukin-10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** **175**: 169-173, 1992.

SILVA J.S., TWARDZIK D.R., REED S.G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGF- β). **J.Exp. Med.** **174**: 539-545, 1991.

SIWIK DA, CHANG DL, COLUCCI WS. Interleukin-1beta and Tumor Necrosis Factor-alpha decrease collagen synthesis and increase metalloproteinase activity in cardiac fibroblasts *in vitro*. **Circ. Res.** **86**: 1259-1265, 2000.

SLAVIN J. Review article: The role of cytokines in wound healing. **J. Pathol** **178**: 5-10, 1996.

SWAIN SL. Interleukin 18: tipping the balance towards a T helper cell 1 response. **J Exp Med.** **194**: F11-4, 2001.

TAKEHARA HA, da SILVA AM, BRODSKY CI, MOTA I. A comparative study of *Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection in mice. **Immunol. Lett.** **23**: 81, 1989.

TARLETON RL, ZHANG L, DOWNS MO. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas' disease is a parasite specific response to infected host tissue. **Proc. Nat. Acad. Sci.** **94**: 3932-3937, 1997.

TARLETON, RL. Parasite persistence in the etiology of Chagas' disease. **Int. J. Parasitol.** **31**: 550-554, 2001.

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

VAILLANT B., CHIARAMONTE M.G., CHEEVER A.W., SOLOWAY P.D., WYNN T.A. Regulation of hepatic fibrosis and extracellular matrix genes by the Th

- response: New insight into the role of tissue inhibitors of matrix metalloproteinases. **J. Immunol.** **167**: 7017-7026, 2001.
- VARGA, J.; ROSENBLOOM, J.; JIMENEZ, S.A. Transforming growth factor beta (TGF- β) causes a persistent increase in steady-state amounts of type I and type III collagen and fibronectin mRNA in normal human dermal fibroblasts. **Biochem. J.** **247**:597-604, 1987.
- VARO N, IRABURU MJ, VARELA M, LOPEZ B, ETAYO J.C, DIEZ. Chronic AT1 blockade stimulates extracellular collagen type I degradation and reverses myocardial fibrosis in spontaneously hypertensive rats. **J. Hypertension** **35**: 1197-1202, 2000.
- WHO (World Health Organization). Control of Chagas'disease. Report of a WHO Expert Committee. Geneva. **WHO Technical Report Series**, **811**: 95, 1991.
- WIRTH JJ, KIERZENBAUM F, SONNENFELD G, ZLOTNIK A. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cells association with and killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infec. Immun.** **49**: 61-66, 1985.
- WYLER DJ, LIBBY P, PRAKASH S, PRIOLI RP, PEREIRA ME. Elaboration by mammalian mesenchymal cells infected with *Trypanosoma cruzi* of a fibroblast-stimulating factor that may contribute to chagasic cardiomyopathy. **Infec. Immun.** **55**: 3188-3191, 1987.
- ZHANG L, TARLETON RL. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur. J. Immunol.** **26**:102-109, 1996.

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

10. ANEXOS
