



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



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS COM
TRIPLÍCE INFECÇÃO COM CEPAS DO *Trypanosoma cruzi* DE
DIFERENTES BIODEMAS FRENTE AO USO DE
IMUNOSSUPRESSORES**

Lorena dos Anjos Magalhães

**Salvador – Bahia – Brasil
2012**



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



FIOCRUZ

Curso de Pós-graduação em Patologia Humana

**RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS COM
TRIPLÍCE INFEÇÃO COM CEPAS DO *Trypanosoma cruzi* DE
DIFERENTES BIODEMAS FRENTE AO USO DE
IMUNOSSUPRESSORES**

Lorena dos Anjos Magalhães

Orientadora: Dra. Sonia Gumes Andrade

Dissertação apresentada ao Colegiado do Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, como pré-requisito obrigatório para obtenção do grau Mestre.

Salvador – Bahia – Brasil
2012

APOIO FINANCEIRO, ÓRGÃOS E INSTITUIÇÕES

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES): pela concessão da bolsa de Mestrado nos períodos 2008 a 2010.

Ao curso de Pós-graduação em Patologia Humana e Experimental, e ao corpo docente das disciplinas ministradas durante o curso.

*“É melhor tentar e falhar, que preocupar-se em ver a vida passar.
É melhor tentar, ainda que em vão, que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar, que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco, que em conformidade viver.”*

(Martin Luther King)

À Minha Família.

AGRADECIMENTOS

À **Dr^a Sonia Andrade** pela orientação, ensinamentos, oportunidades por ser um exemplo de cientista, educadora e acima de tudo MÃE. E por ter me ensinado valores singulares na minha formação intelectual, profissional e pessoa.

À **Dr^a Isis Magalhães** pelos ensinamentos, amizade, companheirismo, incentivo e carinho.

Ao **Msc. Juracy Magalhães** (*In Memoriam*) e a **Fátima Magalhães**, pelos ensinamentos, apoio e atenção.

À **Ariane Pimentel** pelo apoio e colaboração para a realização desse trabalho.

À **Hyde Almeida** pela ajuda e colaborações essenciais para a execução deste trabalho.

Aos **Msc. Marcos Lazáro** e **Msc. Renata Portella** pelos estímulos e importantes sugestões.

Aos **amigos e colegas do LACEI**, pela convivência e ensinamentos. Em especial, a Isa Morais, Jorge Nihei, Marcio Almeida, Daniel Pessina, Karina Sobral.

A toda família do **Laboratório de Patologia Experimental (LAPEX)**.

À funcionária, **Maria José** pela limpeza, paz e alegria no ambiente de trabalho.

A todos do **Biotério** do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, pela atenção e auxílio no tratos dos animais de experimentação.

Ao pessoal do **Serviço de Histotecnologia** do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz pela eficiência no processamento das lâminas histológicas.

Aos **meus grandes amigos** Elisângela Trindade, Nadja Gonçalves, Manuela Caldas e Everton Baptista pela amizade, incentivo e companheirismo.

A todos do **Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz**.

À **minha amada família**, em especial meus pais Luiz Magalhães e Marilene Magalhães e ao meu irmão Fabio Magalhães, por todo sentido de vida, amor, responsabilidade, paciência, compreensão enfim por serem responsáveis pela pessoa que hoje sou.

A **Rogério Soares** pelo companheirismo, alegrias e cumplicidade em todos os momentos.

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	10
LISTA DE TABELAS	13
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS.....	14
RESUMO.....	16
ABSTRACT.....	17
1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1 O <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1.2 Classificações de cepas.....	19
1.2.1 Biodemas.....	19
1.2.2 Zimodemas.....	20
1.2.3 Esquizodemas.....	21
1.2.4 Taxa <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II.....	21
1.3 A doença de Chagas.....	22
1.3.1 Fase aguda.....	23
1.3.2 Fase crônica.....	23
1.4 Imunopatologia da doença de Chagas.....	24
1.5 Reinfecções.....	26
1.6 Imunossupressão.....	28
2. OBJETIVOS.....	32
3. DESENHO EXPERIMENTAL.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	34
4.1 Animal experimental.....	34
4.2 Cepas do <i>T. cruzi</i>	34
4.3 Inóculo.....	34
4.4 Grupos Experimentais.....	34
4.5 Tratamento imunossupressor.....	35
4.6 Procedimentos Experimentais.....	35
3.6.1 Obtenção de animais com Triplíce infecção.....	35
3.6.2 Parasitemia.....	35
3.6.3 Mortalidade.....	36

3.6.4 Controle da mortalidade dos camundongos.....	36
3.6.5 Eutanásia.....	36
3.7 Estudo da resposta imunológica.....	36
3.7.1 Exame sorológico.....	36
3.7.2 Dosagem de isótipos de Imunoglobulinas totais por ELISA.....	37
3.7.3 Teste de avaliação da hipersensibilidade tardia (Teste Cutâneo).....	37
3.8 Estudo histopatológico.....	45
3.9 Teste Estatístico.....	39
4. RESULTADOS.....	40
4.1 Parasitemia e Mortalidade.....	40
4.2 Estudo Histopatológico.....	45
4.3 Testes sorológicos.....	55
4.4 Teste de ELISA para dosagem de Imunoglobulinas.....	57
4.5 Teste de Hipersensibilidade Tardia - Teste cutâneo na pata.....	64
.....	64
5. DISCUSSÃO.....	69
6. CONCLUSÕES.....	76
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS.....	78

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Fig. 01: Parasitemia de camundongos infectados com Cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	41
Fig. 02: Parasitemia de camundongos com infecção única infectados com Cepa Colombiana Col, 21SF e Y do <i>T. cruzi</i>	41
Fig. 03: Mortalidade cumulativa de camundongos com infecção única com as cepas Colombiana, 21SF e Y do <i>T. cruzi</i>	42
Fig. 04: Parasitemia de camundongos com Triplíce infecção com cepas do <i>T. cruzi</i> ,.....	44
Fig. 05: Mortalidade Cumulativa de camundongos Triplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i> ,.....	44
Fig. 06: Secções de miocárdio e músculo esquelético corados pela técnica H&E, em camundongos infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	46
Fig. 07: Secções de miocárdio e músculo esquelético corados pela técnica H&E, em camundongos infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> tratados com Ciclofosfamida e Betametasona	47
Fig. 08: Secções de miocárdio e músculo esquelético corados pela técnica H&E, em camundongos infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina	48
Fig. 09: Secções de miocárdio, músculo esquelético e fígado corados pela técnica H&E, em camundongos infectados com a cepa 21SF e com a cepa Y do <i>T. cruzi</i>	50
Fig. 10: Secções de miocárdio e músculo esquelético corados pela técnica H&E, em camundongos triplíce infectados com a cepa <i>T. cruzi</i>	52
Fig. 11: Secções de miocárdio, músculo esquelético, baço e fígado corados pela técnica H&E, em camundongos tríplice infectados com a cepa <i>T. cruzi</i> e tratados com Ciclofosfamida e Betametasona	53

Fig. 12: Secções de miocárdio, músculo esquelético, baço e fígado corados pela técnica H&E, em camundongos tríplíce infectados com a cepa <i>T. cruzi</i> e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina.....	54
Fig.13: Titulação de anticorpos anti- <i>T.cruzi</i> através da técnica de Imunofluorescência indireta em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	56
Fig. 14: Titulação de anticorpos anti- <i>T.cruzi</i> através da técnica de Imunofluorescência Indireta em camundongos com tríplíce infecção com a cepas do <i>T. cruzi</i>	56
Fig. 15: Dosagem de IgG1 em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	58
Fig. 16: Dosagem de IgG2a em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do <i>T.cruzi</i>	58
Fig. 17: Dosagem de IgM em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	59
Fig. 18: Dosagem de IgG2b em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	59
Fig. 19: Dosagem de IgG1 em camundongos tríplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i>	61
Fig. 20: Dosagem de IgG2a em camundongos tríplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i>	61
Fig. 21: Dosagem de IgM em camundongos tríplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i>	62
Fig. 22: Dosagem de IgG2b em camundongos tríplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i>	62
Fig. 23: Estudo comparativo da dosagem de isótipos de imunoglobulinas em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> e com Tríplíce infecção	63
Fig. 24: Medida da espessura da pata camundongos infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i>	65

Fig. 25: Medida da espessura da pata camundongos infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida	65
Fig. 26: Medida da espessura da pata camundongos infectados com a cepa Colombiana do <i>T. cruzi</i> e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina	66
Fig. 27 Medida da espessura da pata camundongos Triplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i>	67
Fig. 28 Medida da espessura da pata camundongos Triplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i> e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida	67
Fig. 29 Medida da espessura da pata camundongos Triplíce infectados com cepas do <i>T. cruzi</i> e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Classificação das cepas do <i>T. cruzi</i>	22
--	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

- 6-MP** - 6-mecaptopurina
- AIDS** - Acquired immune deficiency syndrome
- ALAT** - Alanine transaminase
- ASAT** - Aspartate aminotransferase
- BA** – Bahia
- CEUA** - Comitê de Ética no uso de Animais
- Col** – Colombiana
- CPqGM** – Centro de Pesquisas Gonçalo Muniz
- CsA** – Ciclosporina
- DNA** - Ácido desoxirribonucléico
- FIOCRUZ** – Fundação Oswaldo Cruz
- GC** – Glicorticóides
- GPI** - Glucose phosphate isomerase
- GRE** - Elementos de resposta dos glicorticóides
- H&E** - Hematoxilina e Eosina
- HIV** – Vírus da Imunodeficiência humana
- IFN- γ** - Interferon-gamma
- IgG1** – Imunoglobulina G 1
- IgG2a** - Imunoglobulina G 2a
- IgG2b** - Imunoglobulina G 2b
- IgM** - Imunoglobulina M
- IL- 2** – Interleucina 2
- IL- 4** – Interleucina 4
- IL-1** - Interleucina 1
- IL-10** - Interleucina 10
- IL-12** - Interleucina 12
- IL-5** - Interleucina 5
- MG** – Estado de Minas Gerais
- MHC** - Complexo de histocompatibilidade principal

NFAT – Fator Nuclear de Células T ativadas

NK – Células naturalmente assassinas

PBS - Phosphate Buffer Saline

PGM - Enzyme phosphoglucomutase

RNA - Ácido ribonucléico

T.cruzi - *Trypanosoma cruzi*

TGF β – Fator Beta transformador de crescimento

TMB - Tetrametil benzidina

TNF α – Fator de Necrose tumoral alfa

RESUMO

RESPOSTA IMUNOLÓGICA EM CAMUNDONGOS COM TRIPLÍCE INFECÇÃO COM CEPAS DO *Trypanosoma cruzi* DE DIFERENTES BIODEMAS FRENTE AO USO DE IMUNOSSUPRESSORES.

LORENA DOS ANJOS MAGALHÃES

Um fator determinante e importante que contribui para a gravidade da doença de Chagas é a ocorrência de múltiplas infecções pelo *Trypanosoma cruzi* nos indivíduos residentes em áreas endêmicas. Estudos experimentais comprovam o aumento da morbidade pelas reinfecções sucessivas com diferentes cepas e permitem caracterizar as cepas re-inoculadas e avaliar a influência das múltiplas infecções nas lesões tissulares. A presença de múltiplas infecções poderia também influenciar no grau de agravamento e reativação da doença de Chagas em pacientes portadores de HIV e/ou imunossuprimidos, em casos de transplantes, nos quais pode haver uma reativação de cepas virulentas levando a complicações nos indivíduos infectados. O presente estudo tem como objetivo avaliar a resposta imunopatológica em camundongos triplamente infectados com diferentes cepas do *T. cruzi* tratados com diferentes drogas imunossupressoras. Camundongos isogênicos da linhagem Balb/c foram infectados sucessivamente com cepas do *T. cruzi* de diferentes biotopos: 1- cepa Colombiana (Biotopo Tipo III – *T. cruzi* I); 2- Cepa 21SF (Biotopo Tipo II – *T. cruzi* II) 50 dias após; 3); 3- Cepa Y (Biotopo Tipo I, Z2b) 20 dias depois; para cada cepa houve também um grupo experimental de infecção única, como controle. Após 20 dias da última infecção, os camundongos sobreviventes foram submetidos a dois esquemas de tratamento: *Esquema 1*: Betametasona (2mg/kg/dia) e Ciclofosfamida (250 mg/kg/dia) durante 4 semanas; *Esquema 2*: Azatioprina (2mg/kg), Betametasona (1mg/kg) e Ciclosporina (16mg/kg, 10mg/kg, 8mg/kg, 6mg/kg) durante 4 semanas. Como parâmetros foram analisados: parasitemia, mortalidade, estudo histopatológico; exame sorológico, dosagem de isotipos de imunoglobulinas (método de ELISA) e teste cutâneo (hipersensibilidade tardia). No presente estudo foi observada uma reativação da parasitemia e da mortalidade em camundongos com triplíce infecção e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida. Concomitantemente, com a reagudização da infecção pelo *T. cruzi* neste grupo, observou-se uma intensificação do parasitismo tissular, um aumento do processo inflamatório mononuclear, espessamento da matriz extracelular e macrófagotropismo com o aparecimento de ninhos parasitários com formas amastigotas do *T. cruzi* no fígado e no baço. O tratamento combinado com Azatioprina, Ciclosporina e Betametasona em camundongos triplamente infectados, por cepas do *T. cruzi* de diferentes biotopos, não determinou um aumento significativo da parasitemia e da mortalidade. Entretanto, o estudo histopatológico destes animais mostrou um aumento da infiltração mononuclear perivascular no miocárdio e músculo esquelético, áreas focais de destruição tissular e presença de arterite e arteriolite. Os resultados do exame sorológico anti-*T. cruzi* demonstraram que o tratamento com imunossupressores (Betametasona e Ciclofosfamida; Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina) em camundongos triplamente infectados determinou uma redução da titulação de anticorpos anti-*T. cruzi* nos dois grupos de tratamento, quando comparados ao grupo de animais triplamente infectados e não tratados. Os resultados demonstraram que camundongos triplamente infectados e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida, apresentaram uma diminuição nos níveis de IgG1, IgG2a, IgM e IgG2b estatisticamente significativa, quando comparados ao grupo infectado sem tratamento. Nos camundongos triplamente infectados e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina foi observado um aumento nos níveis de IgG2a e uma diminuição nos níveis de IgG2b quando comparados aos níveis deste isotipo nos outros grupos. O resultado do teste de hipersensibilidade tardia através o teste cutâneo com medição da espessura da pata apresentou diferença significativa no ponto de 48h nos grupos de camundongos triplamente infectados não tratados, camundongos tratados com Betametasona e Ciclofosfamida e no grupo de camundongos tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina. No presente estudo, a imunossupressão com Betametasona e Ciclofosfamida determinou uma reativação da fase aguda em camundongos, comparável ao visto em pacientes imunossuprimidos. Concomitantemente houve uma diminuição significativa das imunoglobulinas do soro, indicando a importância da resposta humoral no controle da infecção. O tratamento com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina em camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* pode influenciar no agravamento das lesões imunopatológicas características de uma reação de hipersensibilidade tardia, principalmente no miocárdio, embora sem determinar a reagudização da infecção pelo *T. cruzi*.

ABSTRACT

IMMUNOLOGICAL RESPONSE IN MICE WITH TRIPLICE INFECTION WITH *Trypanosoma cruzi* STRAINS OF DIFFERENT BIODEMES SUBMITTED TO TREATMENT WITH IMMUNOSSUPPRESSOR DRUGS.

LORENA DOS ANJOS MAGALHÃES

An important factor that contributes to the severity of Chagas disease in people living in endemic areas is the occurrence of multiple infections with *Trypanosoma cruzi*. Experimental studies have shown the increased morbidity due to successive reinfections with different strains, with the possibility of to identify and characterize the re-inoculated strains and to evaluate the influence of multiple infections upon the tissue lesions. The occurrence of multiple infections could also influence reagudisation of the disease in patients with HIV infection (AIDs) or immunosuppressed in cases of organs transplantation. In such cases, a reactivation of virulent strains could occur with aggravation of the disease. The objective of the present study was to evaluate the immunopathological response in mice with triple infections with different *T. cruzi* strains and treated with different immunosuppressor drugs. Inbred Balb/c mice were successively infected with *T. cruzi* strains of different Biodesmes : 1) the Colombian strain (Biodeme Type III – *T. cruzi* I); 2) 50 days after, the mice were re-infected with the 21SF strain (Biodeme Type II – *T. cruzi* II); 3) after 20 days the third infection was performed with Y strain (Biodeme Type I, Z2b). For each separate *T. cruzi* strain a group of mice with only a single infection was included as a control group. Twenty days after the last infection, surviving mice were divided into two different groups, submitted to different schedules of treatment with immunosuppressor drugs: *Schedule 1* – Betamethasone (2mg/kg/day) plus Cyclophosphamide (250mg/kg/day), during four weeks ; *Schedule 2* – Azathioprine (2mg/kg/day) plus Betamethasone (1mg/kg/day) and Cyclosporine (first week - initial dose of 16mg/kg/day, during one week, followed by dosis of 10mg/kg/day, 8mg/kg/day and 6mg/kg/day for the following 3 weeks). The mice from the several groups were evaluated by following the evolution of parasitemia and mortality, histopathology and serological specific responses. Evaluation of immunoglobulin isotypes (ELISA method) and skin test for delayed hypersensitivity (DTH) were performed. In the present study a reactivation of *T. cruzi* infection in mice with triple infection and treated with Betamethasone and Cyclophosphamide was detected; it was characterized by increased parasitemia levels, mortality rates and tissue parasitism. Presence of amastigotes in macrophages of the liver and spleen (macrophagotropism); intensification of the inflammatory infiltration and of extracellular matrix deposits. Combined treatment with Azathioprine, Betamethasone, Cyclosporine and in the triple infected mice did not influence neither parasitemia levels or mortality rates. However the histopathological study demonstrated aggravation of the necrotic inflammatory lesion with the presence of arterites and peri-arterites in the myocardium and skeletal muscles. A decrease of anti-*T. cruzi* serological titres was observed in triple infected mice treated with immunosuppressor drugs in both schedules of treatment employed in the present study, as compared to the untreated control group. A significant decrease in the levels of IgG1, IgG2a, IgG2b and IgM was observed in the group of mice with triple infection, treated with Betamethasone and Cyclophosphamide (*Schedule 1*) as compared with the untreated controls. In the group with triple infection, treated with Azathioprine, Betamethasone and Cyclosporine (*Schedule 2*), increased levels of IgG2a and decreased levels of IgG2b were observed. The DTH cutaneous test, disclosed significant differences in the 48 hours point between untreated triple infected mice and the treated with either one of the treatment schedules. In the present study the immunosuppression with Betamethasone plus Cyclophosphamide, determined reactivation of the acute phase of the infection with *T. cruzi*, comparable to that observed in immunosuppressed patients, concomitantly with significant decrease of the immunoglobulins. This suggests an effective influence of the humoral response on the control of the infection. Treatment with Azathioprine, Betamethasone and Cyclosporine determined aggravation of the immunopathological lesions, characteristics of DTH alterations, without re-agudization of *T. cruzi* infection.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, Reinfections, Immunosuppression, Immunological response.

1. INTRODUÇÃO

1.1 O *Trypanosoma cruzi*

O *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) agente etiológico da doença de Chagas é um protozoário flagelado, pertencente ao reino protista e sub-reino protozoa. Incluídos no filo Sarcostomastigophora, classe Kinetoplastida e ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, ao gênero *Trypanosoma* e ao subgênero *Schizotrypanum*, possui um ciclo de desenvolvimento em que alterna entre um hospedeiro invertebrado *Artrópodes*, ordem *Hemiptera*, família *Reduviidae* e um hospedeiro vertebrado. Estes Triatomíneos são insetos hematófagos em todas as fases de seu ciclo evolutivo (ninfã e adulto), o qual transmite o *T. cruzi* a um hospedeiro definitivo vertebrado (DE SOUZA, 2000).

O meio mais comum de contaminação é a transmissão natural, através da inoculação do parasita quando os triatomíneos infectados fazem o repasto sanguíneo, durante o qual eliminam formas tripomastigotas metacíclicas do parasita junto com as fezes (REY, 2002).

A primeira diferenciação do parasita ingerido ocorre no estômago do inseto vetor, onde as formas tripomastigotas transformam-se em epimastigotas poucas horas após sua ingestão. A segunda diferenciação ocorre no intestino do vetor, quando os epimastigotas se transformam em tripomastigotas metacíclicos (as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado), os quais são liberados nas fezes e urina. Os parasitos penetram no hospedeiro através de uma lesão da pele ou através da mucosa ocular. Os parasitas invadem diferentes tipos de células no hospedeiro, diferenciam-se em amastigotas, passam por varias divisões no interior das células infectadas e evoluem até às formas tripomastigotas, que são então liberadas para o sangue após a rotura da membrana celular, iniciando o próximo ciclo de infecção de outras células ou ciclo biológico se ingeridos pelo vetor (GARCIA & AZAMBUJA, 2000).

O parasita apresenta formas tripomastigotas com morfologia variada e a depender da cepa, durante o curso da infecção, podem predominar formas delgadas, formas largas e às vezes muito largas (BRENER & CHIARI, 1971). As formas largas são mais resistentes ao mecanismo imunológico do hospedeiro e permanecem por mais tempo no sangue periférico, enquanto as formas delgadas penetram rapidamente nos tecidos e são mais susceptíveis (BRENER, 1969).

1.2 Classificações de cepas

Desde o início das investigações sobre a doença de Chagas, amostras de *T. cruzi* foram obtidas de casos humanos, de animais silvestres infectados ou dos insetos vetores, as quais são mantidas em laboratório, através de passagens sucessivas em animais ou por cultivo “*in vitro*”. Estes tripomastigotas isolados passaram a ser chamados de cepas (LUMSDEN, 1970). As cepas do *T. cruzi* apresentam diferentes características, como grau de virulência, patogenicidade e tropismo para diferentes tecidos. Assim foram classificados de acordo com os caracteres biológicos (Biodemas) (ANDRADE, 1974), caracteres bioquímicos (Zimodemas) (MILES *et al.*, 1986 & ROMANHA, 1982) e caracteres genéticos (Esquizodemas) (MOREL *et al.*, 1980, 1986).

1.2.1 Biodemas

Andrade (1974) classificou cepas isoladas de diferentes áreas geográficas, de acordo com as características biológicas, tais como parasitemia, morfologia de formas sanguíneas, virulência, patogenicidade e histotropismo. Foram classificadas em tipos I, II, III. Os diferentes Tipos biológicos foram designados posteriormente como Biodemas (ANDRADE & MAGALHÃES, 1996).

As cepas do Biodema tipo I caracterizam-se pela rápida multiplicação parasitária com picos muito elevados entre 9 e 10 dias de infecção, apresentando alta virulência e mortalidade entre 10 e 12 dias de infecção, com um predomínio de formas delgadas e acentuado macrofagotropismo no início da infecção. Com o avanço da infecção, ocorre predominância das formas largas e acentuado mitotropismo. São também conhecidas como cepas macrofagotrópicas, sendo as cepas Y e Peruana consideradas como protótipos deste Biodema (ANDRADE, 1974; ANDRADE & MAGALHÃES, 1996).

As cepas do Biodema tipo II, apresentam multiplicação lenta com picos irregulares entre 12 e 20 dias de infecção, virulência muito variável com mortalidade média entre 20 e 25 dias, pequeno número de formas delgadas e discreto macrofagotropismo no início da infecção, predominando as formas largas e lesões miocárdicas em todo o curso da infecção. As cepas representantes desse biodema são a 21SF e 12SF (ANDRADE, 1974, ANDRADE & MAGALHÃES, 1996).

O Biodema tipo III tem como característica a multiplicação parasitária muito lenta, atingindo picos parasitêmicos muito elevados entre 20 e 30 dias de infecção, baixa virulência com mortalidade nula até 50 dias. Predominância de formas largas e miotropismo em todo o curso da infecção. A cepa protótipo desse Biodema é a Colombiana (ANDRADE, 1974, ANDRADE & MAGALHÃES, 1996).

1.2.2 Zimodemas

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

ANDRADE *et al* (1983) correlacionaram os padrões isoenzimáticos, proposto por MILES *et al.* (1980) para as enzimas PGM, GPI, ASAT e ALAT aos biodemas, demonstrando uma ligação entre a caracterização biológica com o perfil isoenzimático, mostrando que as cepas do biodema Tipo II (12SF e 21SF), pertencem ao zimodema Z2 e as cepas do biodema Tipo III (Colombiana), pertence ao zimodema Z1. As cepas do Tipo I mostram um perfil diferenciado que posteriormente foi analisado e identificado em cepas da Bolívia (TIBAYRENC & MILES, 1983) e do Chile (MILES *et al.*, 1984), sendo estas designadas como Z2b.

1.2.3 Esquizodemas

A análise molecular das cepas através a técnica do RFLP (Restriction fragment length polymorphism) do kDNA permitiu estabelecer os esquizodemas, de acordo com (MOREL *et al.*, 1980). Esta é uma técnica para caracterizar os tripanosomatídeos que se baseia na separação eletroforética dos fragmentos produzidos por endonucleases de restrição do kDNA (DNA do cinetoplasto), único e abundante DNA mitocondrial que define a ordem Kinetoplastida. O padrão eletroforético obtido, chamado DNA “*fingerprint*” é um marcador bioquímico do cinetoplasto que permite classificar cepas e clones em esquizodemas. Os esquizodemas correspondem a grupos de organismos que exibem padrão idêntico dos minicírculos do kDNA (MOREL *et al.*,

1980). Entretanto não há uma classificação das cepas de acordo com o perfil eletroforético do esquizodema.

1.2.4 Taxas *T. cruzi* I e *T. cruzi* II

Partindo das análises realizadas a partir de uma ampla diversidade de técnicas e métodos, a comunidade de pesquisadores propôs uma sistematização das diversas classificações para o *T. cruzi*, denominados *T. cruzi* I e *T. cruzi* II (ANONYMOUS, 1999), que engloba classificações já citadas e aquelas baseadas em análises filogenéticas e no DNA ribossomal (SOUTO *et al.*, 1996) e nos genes de mini-exon (FERNANDES *et al.*, 1999).

Inicialmente foi proposto que o Taxa *T. cruzi* I circulava principalmente em mamíferos e triatomíneos silvestres, enquanto que o *T. cruzi* II estava associado ao ciclo doméstico da doença e à infecção em humanos (FERNANDES *et al.*, 1998; FERNANDES *et al.*, 1999; ZINGALES *et al.*, 1998). As cepas do Biodema tipo II e Zimodema Z2 foram incluídas no Taxa *T. cruzi* II e as cepas do Biodema tipo III e Zimodema Z1 foram incluídas no Taxa *T. cruzi* I. O Biodema tipo I (ANDRADE & MAGALHÃES, 1996) e o zimodema Z3 (MILES *et al.*, 1980) não puderam ser agrupados de acordo com essa classificação por representarem híbridos.

Classificação de cepas do <i>T. cruzi</i>		
Biodemas (ANDRADE, 1974)		
<u>Tipo I</u>	<u>Tipo II</u>	<u>Tipo III</u>
<ul style="list-style-type: none"> - Rápida multiplicação parasitária - Mortalidade: 10 e 12 dias inf. - Acentuado Macrofagotropismo - Cepas: Peruana e Y 	<ul style="list-style-type: none"> - Multiplicação parasitária lenta - Mortalidade: 20 e 25 dias inf. - Lesões miocárdicas - Cepas: 21 SF e 12 SF 	<ul style="list-style-type: none"> - Multiplicação parasitária muito lenta - Baixa virulência - Miotropismo - Cepa: Colombiana
Zimodemas (MILES <i>et al.</i>, 1986; ROMANHA, 1982) - Padrões isoenzimáticos – Fenótipo		
<ul style="list-style-type: none"> • Esquizodemas (MOREL <i>et al.</i>, 1980., 1986; GONÇALVES, 1984) - kDNA (DNA do cinetoplasto) – RFLP 		
<ul style="list-style-type: none"> • Taxa <i>T. cruzi</i> I e <i>T. cruzi</i> II (ANONYMOUS, 1999) 		
<u><i>T. cruzi</i> I</u>	<u><i>T. cruzi</i> II</u>	
Biodema Tipo III/ Zimodema Z1	Biodema Tipo II/ Zimodema Z2	

Tabela 1: Classificações das cepas do *T. cruzi*

1.3 A doença de Chagas

A doença de Chagas representa um sério problema de saúde pública na América Latina, causado pelo protozoário *T. cruzi*, o qual tem uma ampla distribuição em hospedeiros e reservatórios vertebrados neste continente. Esse agente infectante encontra-se amplamente disseminado no Continente Americano onde cerca de 16 a 18 milhões de pessoas estão infectadas. No Brasil há cerca de 6 milhões de pacientes infectados pelo *T. cruzi* conforme dados da Organização Mundial de Saúde (WHO, 2002).

A contaminação do indivíduo pelo *T. cruzi* pode resultar no desenvolvimento da doença de Chagas, que se apresenta na sua fase aguda, logo após a penetração do parasita e na sua fase crônica, de duração prolongada.

1.3.1 Fase aguda

Clinicamente, a infecção chagásica inicia-se com um conjunto de manifestações variáveis em frequência e intensidade formada pelo sinal de porta de entrada da infecção, sintomas gerais e alterações sistêmicas. A porta de entrada da infecção pode ser aparente, como sinal de Romana e o chagoma de inoculação ou pode ser inaparente (RASSI, 2000).

Caracterizada por sinais e sintomas como febre, cefaléia, mal-estar, hiporexia, astenia. Dentre as alterações sistêmicas, destacam-se edema subcutâneo, o aumento de volume nos linfonodos, hepatoesplenomegalia e aparecimento de parasitos no sangue periférico. A fase aguda pode ser muito grave levando ao óbito em cerca de 7 a 10% dos casos devido à miocardite aguda e a meningoencefalite (ANDRADE *et al.*, 2000).

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

1.3.2 Fase crônica

Os pacientes que sobrevivem à fase aguda passam para fase crônica, em que a maior parte dos pacientes apresenta-se na forma indeterminada e assintomática podendo permanecer por muitos anos. Nesse estágio, os pacientes não apresentam manifestações clínicas, radiológicas e eletrocardiográficas.

Achados epidemiológicos revelam que 30% dos indivíduos infectados evoluem para uma fase crônica cardíaca, apresentando arritmias, bloqueio átrio ventriculares, bloqueio do feixe de Hiss, aumento da área cardíaca, ocasionando uma insuficiência cardíaca (LARANJA *et al.*, 1953; MARIN-NETO *et al.*, 2000). Essa transição ocorre provavelmente devido a uma imunomodulação da relação hospedeiro/parasito, aliado a um complexo multifatorial envolvendo

o tamanho do inoculo, tipo de cepa, grau de resistência e a susceptibilidade do indivíduo (ANDRADE, 1999).

1.4 Imunopatologia da doença de Chagas

Alguns mecanismos patogênicos desencadeadores da doença de Chagas estão ligados a fatores do parasito que estimulam e mantêm as lesões inflamatórias como descrito por ANDRADE *et al* (2000) os quais demonstraram a presença de antígenos parasitários seqüestrados em células dendríticas intersticiais do miocárdio.

Considerando os mecanismos patogênicos envolvidos na doença de Chagas tem sido demonstrado por diferentes autores através da caracterização do infiltrado inflamatório na miocardite crônica por estudos histoquímicos (HIGUSHI *et al.*, 1993) ou pela caracterização molecular em autópsias de chagásicos humanos visando relacionar as lesões com a presença de porções do genoma do *T. cruzi* (JONES *et al.*, 1993). Entretanto, deve-se considerar que além de fatores ligados ao parasito existem fatores ligados ao hospedeiro os quais podem, conjuntamente, contribuir na determinação da patogenia da doença.

De acordo com DOS REIS (1997) a presença de parasitos nos tecidos desencadeia uma resposta tecidual que pode ser decisiva para a secreção de citocinas inflamatórias em resposta ao parasito e também para a quebra dos mecanismos de tolerância imunológica.

Na resposta imune inata, o *T. cruzi* induz a ativação de células NK, que tem relação com a destruição de células-alvo e com a produção de citocinas, como IFN γ e TNF α (CARDILLO *et al.*, 1996) envolvidas na sensibilização de outras respostas imunes (BRODSKYN & BARRAL-NETO, 2000). A infecção dos macrófagos pelo *T. cruzi* pode induzir a secreção de IL-12 por essas células, a qual induz a produção de IFN γ e TNF α pelas células NK resultando no controle da parasitemia e da mortalidade (BRODSKYN & BARRAL-NETO, 2000), porém induzem a lesões graves que podem levar os animais à morte (DOS REIS, 1997). Citocinas como IL-10 e TGF β têm mostrado inibir a síntese do IFN γ pelas células NK induzidas pelo parasita (CARDILLO *et al.*, 1996). Essas citocinas têm um papel importante no controle da produção de citocinas pró-inflamatórias, que, em excesso, podem contribuir para lesões teciduais. Em estudos,

Lima *et al.*, 2001, demonstraram a participação *in situ* do TNF α na necrose celular e na destruição de macrófagos esplênicos parasitados. Em estudos posteriores, o tratamento com Pentoxifilina em camundongos infectados com cepa Peruana do *T. cruzi*, resultou numa redução significativa das áreas de necrose e na diminuição da expressão do TNF α no tecido esplênico (ANDRADE *et al.*, 2008).

Apesar das evidências que demonstram o papel do parasito e de seus antígenos na determinação das lesões na doença de Chagas, mecanismos de autoimunidade têm sido propostos como importantes na patogênese das lesões determinadas pelo *T. cruzi* (SADIGURSKY *et al.*, 1982).

A relação entre a presença dos antígenos de *T. cruzi* e as lesões inflamatórias, na ausência de parasitismo tecidual foi investigada por ANDRADE *et al* (2000) no modelo canino no qual observaram que estes antígenos estão sendo seqüestrados por células dendríticas intersticiais do miocárdio associado à persistência de focos inflamatórios. Os autores sugeriram que este mecanismo estaria potencializando a estimulação de células T CD4⁺ do baço, na determinação do processo inflamatório do miocárdio e mantendo estas alterações inflamatórias mesmo na ausência de parasitismo tecidual.

A resposta imune em animais experimentais tem demonstrado que existe um processo inflamatório intersticial composto de diversos tipos celulares, em especial de macrófagos, induzidos pela presença do *T. cruzi*, o qual inicia uma série de interações moleculares que mobilizam a resposta inata do hospedeiro (REED, 1998; ALIBERTI *et al.*, 1996).

A infecção experimental aguda pelo parasita causa, no modelo murino, uma ativação intensa e policlonal de linfócitos B, com hiperprodução de anticorpos, e, nessa fase, a resposta contra antígenos parasitários representa apenas uma pequena fração total de anticorpos produzidos (MINOPRIO, 1989). Essa resposta policlonal é amplamente dependente da atividade de linfócitos T CD4 auxiliares (MINOPRIO, 1989).

Estudos abordando a resposta humoral em camundongos suíços infectados por diferentes cepas do *T. cruzi* foram realizados por ANDRADE *et al* (1985b). Os achados demonstraram a existência de uma correlação entre o aumento da mortalidade e de lesões teciduais, associado a níveis elevados de IgG2a e IgG2b total. Os autores concluíram que os aumentos dos níveis séricos destas imunoglobulinas não se correlacionam de maneira segura com os níveis de

anticorpos anti-*T. cruzi* devido, possivelmente, a uma ativação inespecífica de clones de linfócitos B.

A presença de células T CD4+ na infecção pelo *T. cruzi* foi atribuída, a sua capacidade tanto de auxiliar na produção de anticorpos líticos protetores quanto de produzir citocinas, como IFN γ , que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasita em células infectadas (TARLETON *et al.*, 1996). Células T CD4+ parasito-específicas inibem a replicação *in vitro* (HOFT *et al.*, 2000) e conferem proteção contra desafios letais *in vivo* (KUMAR & TARLETON, 2001). A eliminação de células T CD4+ através da inibição da expressão antigênica do gene do complexo de histocompatibilidade (MHC) classe II em camundongos *knockout*, resulta no acentuado aumento da susceptibilidade na infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON *et al.*, 1996). Estudos mostram que a indução *T. cruzi*-específica de células T CD4+ e T CD8+ é um componente crucial em vacinas que induzem imunidade contra o *T. cruzi* (WIZEL *et al.*, 1998; FUJIMURA *et al.*, 2001). Adicionalmente, a depleção de células T CD8+ durante a fase aguda e a fase crônica da infecção resulta no aumento da resposta inflamatória concomitante com aumento de parasitos no tecido muscular (TARLETON *et al.*, 1994). Esses resultados confirmam que a população linfocitária de células T CD8+ predomina no infiltrado inflamatório no miocárdio (SUN & TARLETON, 1993), sugerindo um papel crucial destas células no controle da infecção pelo *T. cruzi* em ambos os estágios agudo e crônico da infecção.

A fase crônica da doença de Chagas é caracterizada por uma miocardite crônica difusa progressiva e fibrosante relacionada com o processo de hipersensibilidade tardia, o qual é desencadeado quando os mecanismos regulatórios que mantêm a doença na fase indeterminada são rompidos (ANDRADE, 1999). Os mecanismos responsáveis por esta transição são, entretanto, pouco conhecidos.

A transição da forma indeterminada para a forma crônica cardíaca ocorre provavelmente através do desaparecimento, ou interferência de fatores supressores do hospedeiro. Essa transição, em que a supressão das respostas mediadas por células imunes deixa de ocorrer, parece estar relacionada com a reativação da inflamação (ANDRADE, 1999). Como dito anteriormente, a reação inflamatória da fase crônica cardíaca da doença de Chagas em humanos, consiste principalmente no infiltrado de linfócitos T CD8+ citotóxico (REIS *et al.*, 1993). A necessidade adicional de células T CD8+, poderia derivar do fato do *T. cruzi* ser capaz de invadir e replicar em uma variedade de tipos de células do hospedeiro, não expressar antígenos através do MHC classe

II e, portanto, escapar detecção de células T CD4+ (TARLETON *et al.*, 1996). Por outro lado, outras evidências sugerem que a depleção de linfócitos T CD4+ por apoptose, pode induzir a fase crônica da doença de Chagas (LOPES *et al.*, 1995).

1.5 Reinfecções

As reinfecções provocadas pelas diferentes exposições ao *T. cruzi*, já sugerida em trabalhos anteriores por (CHAGAS, 1909), em áreas endêmicas, têm sido largamente mencionadas como sendo um dos fatores com ampla capacidade de influenciar na evolução da doença de Chagas e no desenvolvimento de uma miocardite grave.

Tratando-se do impacto do controle da doença de Chagas na América Latina, DIAS *et al* (2002) concluíram que, em termos clínicos, os casos crônicos de doença de Chagas apresentaram significativa redução da sua morbidade e da mortalidade precoce, devido ao extenso controle vetorial no Brasil e em outros países do Cone Sul. Embora tenha havido, a partir da década de 80 um efetivo controle de triatomíneos da espécie *Triatoma infestans*, a transmissão da doença de Chagas ainda não está totalmente erradicada e há sempre o perigo de que espécies antes silvestres venham a se domiciliar (BORGES *et al.*, 1999). Deste modo, nas áreas endêmicas da doença de Chagas, a transmissão vetorial do *T. cruzi* pode ocorrer, não só pelos triatomíneos de hábitos domiciliares como através daqueles que vêm a se domiciliar, devido às alterações que ocorrem nos seus ecótopos silvestres (DIOTAIUTI *et al.*, 1995; BARRETT *et al.*, 1979). A introdução de novas espécies de triatomíneos pode veicular cepas diferentes do *T. cruzi* que, deste modo, passam a infectar pessoas antes já infectadas com cepas locais (LUQUETTI *et al.*, 1986). Há, portanto a possibilidade de que múltiplas infecções com diferentes cepas venham a se instalar em um mesmo paciente o que, possivelmente aumentará a carga parasitária, possibilitando o agravamento das lesões.

Estudos sobre a importância das reinfecções sobre a evolução da cardiopatia crônica chagásica, por EMANUEL DIAS (1963), demonstraram que após o expurgo dos vetores em Bambuí, MG, desapareceram os grupos com insuficiência cardíaca e os demais casos ficaram estacionários nas suas formas clínicas.

Na área de São Felipe, BA, a possibilidade de que múltiplas infecções poderiam agravar os quadros clínico-patológicos da doença foi investigada por MACEDO (1976), pelo estudo de

pacientes infectados pelo *T. cruzi* que viviam em áreas em que houve o expurgo dos vetores em comparação com os que permaneciam em áreas com manutenção da transmissão, observando diferenças significantes de morbidade nas duas áreas.

Experimentalmente, vários outros autores estudaram o papel das reinoculações de *T. cruzi* no desenvolvimento da doença (BRENER *et al.*, 1967, ANDRADE *et al.*, 1970; DEANE *et al.*, 1984; REVELLI *et al.*, 1990; BUSTAMANTE *et al.*, 2002; MACHADO *et al.*, 2001, ANDRADE *et al.*, 2006). ANDRADE *et al.* (1970) demonstraram em camundongos submetidos à dupla infecção com diferentes cepas, que a primeira inoculação confere resistência a uma segunda infecção não se desenvolvendo uma nova fase aguda no animal reinoculado, e que os parasitos de ambas as cepas podem ser recuperados, isto é, a resistência à reinoculação é apenas relativa e o parasito reinoculado pode sobreviver. Há, portanto, a possibilidade de coexistência de mais de uma cepa em um mesmo hospedeiro.

Em trabalho anterior (ANDRADE *et al.*, 2006), foi descrito o agravamento da miocardite crônica em camundongos com triplíce infecção com cepas de três diferentes biotipos, sem exacerbação da parasitemia ou do parasitismo tissular, sugerindo ou uma potencialização do processo inflamatório pelo aumento da carga parasitária, ou a estimulação da resposta imunológica celular nestes animais. BUSTAMANTE *et al.* (2002), em estudos com camundongos reinfectedos na fase aguda de infecção, observaram que a reinfecção determinou alterações eletrocardiograficas em 100% dos camundongos reinfectedos demonstrando que as reinfecções são fatores determinantes que diferem na evolução da doença de Chagas.

1.6 Imunossupressão

A reativação do parasitismo na fase crônica da doença de Chagas está sendo cada vez mais induzida por diferentes fatores que interferem no tipo da resposta imune na infecção pelo *T. cruzi*. Esta reativação ocorre após a administração de diferentes agentes iatrogenicos, como a quimioterapia antineoplásica e terapias imunossupressoras (ciclofosfamida, ciclosporina) usada durante transplante de rim e coração. O *T. cruzi* é também um importante oportunista que pode infectar o individuo concomitantemente com o vírus HIV causador da síndrome de imunodeficiência adquirida (AIDS) (BRENER & GAZZINELLI, 1997).

A imunossupressão pode levar a uma reativação de uma infecção latente pelo *T. cruzi* causando lesões diversas não só miocardite grave como envolvimento do cérebro pela proliferação parasitária, levando a sérias complicações (STOLF *et al.*, 1987).

Em estudo com 23 pacientes chagásicos crônicos e pacientes portadores de HIV (ROCHA *et al.*, 1994), mostraram que 87% desses pacientes desenvolveram meningoencefalite severa multifocal ou difusa associada com numerosos parasitas tissulares, considerando que a miocardite é a segunda lesão mais grave. Pacientes chagásicos crônicos em estágio terminal foram submetidos a transplante cardíacos e imunossuprimidos com ciclosporina, azatioprina e esteróides o que induziu em um numero de pacientes a reativação os quais desenvolveram lesões de pele e miocardite severa (BRENER & GAZZINELLI, 1997). A presença de múltiplas infecções poderia também influenciar no grau de agravamento e reativação da doença de Chagas em pacientes portadores de HIV e/ou imunossuprimidos em casos de transplantes nos quais pode haver uma reativação de cepas virulentas levando a complicações nos indivíduos infectados.

- Drogas Imunossupressoras

A Ciclosporina (CsA), potente imunossupressor, é um decapeptídeo fúngico originado do *Tolypocladium inflatum gams* (BOREL *et al.*, 1991) e foi introduzido na década de 70 para provável uso em transplante de órgãos sólidos (SCHUT *et al.*, 1992)

A CsA com base no sítio de ação imunorregulatório, é classificada como inibidor da transcrição do primeiro sinal para ativação do linfócito T (GRAHAM, 1994). A CsA não é uma droga citotóxica, exerce seu efeito numa população restrita de células linfóides e poupa as outras células de linhagem mielóide, conferindo-lhes certa seletividade. A ação supressora depende da formação de um complexo heterodimérico com seu receptor citoplasmático, a ciclofilina. A ciclofilina é uma peptil-propil-isomerase que se liga e inibe a atividade da fosfatase da calcineurina, resultando na inibição da expressão de genes de proteínas nucleares envolvidas na ativação celular e formação do linfócito T citotóxico. Uma dessas proteínas, o fator nuclear de células T ativado (NFAT), desloca-se para o núcleo, onde se liga à região promotora de genes IL-2, IL-4 e IFN γ , causando a transcrição dos mesmos e a secreção das referidas citocinas. O bloqueio do NFAT é considerado, portanto, o principal efeito da CsA (KAHAN, 1989; FRUMAN *et al.*, 1992).

A CsA exerce sua principal influencia sobre os linfócitos T CD4⁺ (auxiliares), com efeitos indiretos em outras populações linfocitárias. Além disso, a CsA suprime a produção de IL-2 e os níveis de IFN γ . Esse efeito sobre a produção de IFN γ pode explicar a redução da atividade células natural NK que podem ser observados durante o tratamento com CsA (BOREL & WIESINGER, 1979).

A azatioprina e seu metabólito 6-mecaptopurina (6-MP) são amplamente utilizados como anti-inflamatórios e imunossuppressores em transplantes de órgãos e no tratamento de doenças crônicas. A azatioprina tem sido utilizada terapêuticamente no transplante no rim (MCGEOWN *et al.*, 1988) e coração (ANDREONE *et al.*, 1986) e de várias doenças auto-imunes e crônicas, tais como cirrose biliar primária (CHRISTENSEN *et al.*, 1985) e artrite reumatóide (DE SILVA *et al.*, 1981). O uso da azatioprina tem sido relacionado com a inibição da biosíntese de purinas com supressão de DNA e RNA e uma *downregulation* de células T e B (DIMITRIU *et al.*, 1978; LENNARD, 1992). Estudos revelam que o uso da Azatioprina no tratamento da doença de Crohn, estimula a apoptose em células T CD4⁺ através da co-estimulação da molécula CD28 (TIEDE *et al.*, 2003).

A ciclofosfamida é uma droga alquilante com ação imunossupressora, seletiva para células linfóides e tem sido objetivo de estudos desde 1958 (ARNOLD *et al.*, 1958). Conforme revisto por MURATA *et al* (2004) a ciclofosfamida tem sido bastante utilizada para tratamento de linfoma, mieloma, leucemia e outras doenças neoplásicas. Experimentalmente o uso de drogas imunossupressoras demonstrada através da injeção de Ciclofosfamida após a infecção pelo *T. cruzi* induz ao aumento da miocardite (KUMAR *et al.*, 1970). Esse dado foi confirmado por ANDRADE *et al.* (1987) em cães, bem como em camundongos por SILVA & ROSSI (1990).

A ação da ciclofosfamida é dependente da dose e tempo como observado no modelo experimental em que a administração da ciclofosfamida em altas doses foi realizada antes e depois da infecção pela cepa Y do *T. cruzi* (CALABRESE, 1999).

Os efeitos sobre diferentes subpopulações de linfócitos é altamente dependente da dose da Ciclofosfamida administrada. Segundo STITES *et al* (2000) doses baixas de Ciclofosfamida causam depleção primária das células B e de linfócitos CD8⁺, enquanto doses mais altas resultam em redução semelhante no número total de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺.

Em estudos prévios, ANDRADE *et al* (1987) observaram em cães infectados com *T. cruzi* e tratados com Ciclofosfamida em baixas doses, uma transição da fase indeterminada para a fase crônica cardíaca pela exacerbação da reação de hipersensibilidade tardia.

Os Glicorticóides (GC) são hormônios esteróides que exercem suas ações fisiológicas através da sua ligação ao receptor citosólico de glicorticóides. O complexo glicorticóide – receptor de glicorticóide é transferido para o núcleo, onde se liga a elementos de resposta dos glicorticóides (GRE) na região promotora dos genes específicos com consequência na supra regulação ou infra-regulação da expressão gênica (GOLAN, 2009).

Os GC exercem efeitos metabólicos importantes sobre praticamente todas as células do organismo e, em doses farmacológicas, suprimem a ativação e a função de células imunes adaptativas. Os GC infra-regulam a expressão de numerosos mediadores inflamatórios, incluindo citocinas essenciais, como o TNF α , a IL-4 e a IL-1. O efeito global da administração de GC é intensamente antiinflamatório e imunossupressor, explicando o uso desses fármacos no tratamento de numerosas doenças inflamatórias, como artrite reumatóide e a rejeição de transplantes (GOLAN, 2009).

O estudo do efeito da imunossupressão em camundongos com triplíce infecção com cepas de diferentes graus de virulências abre novas perspectivas para a avaliação dos riscos de reativação pelo tratamento com drogas imunossupressoras ou nos portadores de AIDS; a possibilidade de que cepas ou clones de alta virulência sejam reativados, deve ser considerada nos casos com desenvolvimento de lesões graves.

O estudo experimental em camundongos permitirá desenvolver um estudo imunopatológico em que os padrões das lesões tissulares, a participação dos mecanismos celulares de hipersensibilidade e o perfil da resposta humoral serão avaliados, no sentido de uma melhor interpretação para os dados já observados não só clínicos como experimentais. Os resultados poderão contribuir para melhor avaliação do tratamento em pacientes de áreas endêmicas e para a melhor interpretação dos fatores envolvidos na passagem da forma indeterminada para a forma cardíaca da doença de Chagas.

Deste modo, este estudo teve o objetivo de investigar o efeito da imunossupressão em camundongos cronicamente infectados com três diferentes cepas do *T. cruzi* procurando verificar a possibilidade de que seja produzido o quadro observado em humanos imunossuprimidos.

2. OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avaliar a resposta humoral e celular em camundongos infectados com cepas do *T. cruzi* de diferentes biodemas e a influência do tratamento com imunossupressores.

OBJETIVOS ESPECIFICOS.

1. Investigar a resposta imunológica humoral e celular na infecção crônica pelo *T. cruzi* em camundongos com múltiplas reinfecções em comparação com a infecção única.
2. Avaliar a resposta imunológica em camundongos na fase crônica da triplíce infecção, submetidos a tratamento com imunossupressores.
3. Avaliar a influência do tratamento com drogas imunossupressoras na reativação da infecção crônica em camundongos submetidos à triplíce infecção com cepas de diferentes biodemas.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 - Animal experimental: Foram utilizados 235 camundongos isogênicos Balb/c de 21 dias, criados e mantidos no Biotério do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, seguindo às regras estabelecidas pelo Comitê de Ética no uso de Animais (CEUA) do Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz. Número do Processo: 014/2009.

4.2- Cepas do *T. cruzi*: Foram utilizadas três cepas representativas dos três Biodemas, Cepa Y (Biodema Tipo I), Cepa 21SF (Biodema Tipo II) e Cepa Colombiana (Biodema Tipo III).

4.3 – Inóculo: Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com sangue proveniente de grupos doadores das cepas Colombiana, 21SF e Y, com inóculo de 5×10^4 formas tripomastigotas sanguícolas do *T. cruzi*.

4.4 - Grupos Experimentais:

4.4a - 30 Camundongos infectados com a cepa Colombiana

4.4b - 30 Camundongos infectados com a cepa Colombiana tratados com Ciclofosfamida e Betametasona

4.4c - 30 Camundongos infectados com a cepa Colombiana tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina

4.4d - 30 Camundongos triplíce infectados

4.4e - 30 Camundongos triplíce infectados tratados com Betametasona e Ciclofosfamida

4.4f – 30 Camundongos triplíce infectados tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina

4.4g – 20 Camundongos infectados com a Cepa 21SF

4.4h – 20 Camundongos infectados com a Cepa Y

4.4i – 5 Camundongos normais tratados com Ciclofosfamida e Betametasona

4.4j – 5 Camundongos normais tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina

4.4 l- 5 Camundongos normais

4.5 - Tratamento imunossupressor:

Foram utilizados dois diferentes esquemas de tratamento imunossupressor , de acordo com os diferentes grupos experimentais.

4.5.1 Esquema 1: Após vinte dias da última infecção os camundongos sobreviventes foram tratados com o seguinte esquema de tratamento:

- *Betametasona (Celestone)* – 2mg/kg/dia em doses diárias durante 30 dias. Administração por injeção intraperitoneal.
- *Ciclofosfamida (Genuxal)* – 250 mg/kg/dia uma dose semanal durante 4 semanas. Administração por injeção intraperitoneal.

4.5.2 Esquema 2: Após vinte dias da última infecção os camundongos sobreviventes foram tratados com o seguinte esquema de tratamento:

- *Azatioprina (Imuran)* – 2mg/kg peso corporal durante 4 semanas. Administração oral, por entubação gástrica
- *Betametasona (Celestone)* – 1mg/kg peso corporal durante 4 semanas. Administração por injeção intra-peritoneal.
- *Ciclosporina (Sandimun)* – 16mg/kg peso corporal na primeira semana, 10mg/kg durante a segunda semana, 8mg/kg peso corporal na terceira semana, 6mg/kg durante a quarta semana. Administração oral, por entubação gástrica.

4.6- Procedimentos Experimentais:

4.6.1 - Obtenção de animais com triplíce infecção: Os camundongos foram infectados com a cepa Colombiana, após 50 dias de infecção os camundongos sobreviventes foram infectados com a cepa 21SF, e finalmente após 20 dias da segunda inoculação, os camundongos foram reinfectados com a cepa Y.

4.6.2 – Parasitemia: Foi avaliada pelo exame microscópico direto, entre lâmina e lamínula do sangue periférico de 5 camundongos de cada grupo experimental. Foi realizada a média da contagem dos parasitos em 100 campos microscópicos 400X. Para o acompanhamento da parasitemia foi obedecido o seguinte esquema de acordo com os diferentes grupos experimentais: *Camundongos com infecção única:* Os animais foram acompanhados entre o 7^o ao 30^o dia pós-inoculação com a cepa Colombiana; *Camundongos com dupla infecção* - após a segunda inoculação com a cepa 21SF a parasitemia foi acompanhada do 7^o ao 20^o dia e *Camundongos com triplíce infecção* - após a terceira infecção, com a cepa Y a parasitemia foi acompanhada a partir do 3^o até 15^o dia pós inoculação. Nos camundongos com infecção única por cada cepa, foi seguido o mesmo esquema acima.

4.6.3 - Mortalidade: A mortalidade cumulativa foi acompanhada diariamente durante o curso da infecção em todos os grupos experimentais até o final do experimento, pela contagem dos animais que morrem espontaneamente a cada dia.

4.6.4 - Controle da mortalidade dos camundongos: Para obtenção de camundongos na fase crônica da infecção, foi realizado o tratamento supressor da parasitemia com Benzonidazol, na dose de 50 mg/kg/peso por 3 dias, a partir do 18^o dia de infecção no grupo inoculado com a cepa Colombiana, após o 14^o dia no grupo de infecção única da cepa 21SF e após o 7^o dia no grupo da infecção única cepa Y, ministrado por via oral, por entubação gástrica.

4.6.5 – Eutanásia: 30 a 35 dias após o termino do tratamento todos os camundongos sobreviventes foram eutanasiados por exsanguinação após anestesia, utilizando como anestésico Quetamina(100mg) e Xilazina (16mg). Os animais sobreviventes do grupo controle com infecção

única da cepa 21SF e Y foram eutanasiados com 30 dias de infecção. Os órgãos e tecidos foram fixados em formol neutro, incluídos em parafina e obtidas secções coradas pela hematoxilina e eosina para estudo histopatológico.

4.7-Estudo da resposta imunológica:

Foram aplicados aos camundongos dos diferentes grupos experimentais os seguintes testes: Exame Sorológico, ELISA e Teste de hipersensibilidade tardia.

4.7.1 - Exame sorológico: Animais de todos os grupos tiveram o soro coletado e estocado a uma temperatura de - 20° C para titulação de anticorpos específicos pela técnica de Imunofluorescência indireta (CAMARGO, 1966). O antígeno utilizado foi constituído por formas de cultura em meio Warren, fixadas em formol e em seguida distribuídas em lâminas apropriadas, tratadas com IgG anti-camundongo, ligado à fluoresceína. A titulação dos anticorpos foi feita pela diluição progressiva do soro, nos títulos de 1:10 , 1:20, 1:40, 1:80, 1:160, 1:320 até 1:640.

4.7.2 - Dosagem de isotipos de Imunoglobulinas totais por ELISA: Placas de poliestireno foram sensibilizadas com soro de camundongo diluído 1:1000 em tampão carbonato 0,05M, pH 9,6 e incubadas durante a noite, a 4°C.

Em seguida as placas foram lavadas com PBS (Phosphate Buffer Saline) na concentração de 10%, pH 7,4. Os sítios livres foram bloqueados pela adição de leite desnatado (5%) diluído em PBS-Tween (0,3%) e incubadas durante uma hora à temperatura ambiente.

Antes de cada etapa de incubação foram realizadas lavagens com PBS-Tween 0,05%. Na etapa seguinte, as placas foram incubadas com anti-imunoglobulina (Ig) de camundongo (Rato anti-IgM de camundongo biotinilado (1:1000) – SIGMA; Rato anti- IgG1 de camundongo conjugado a peroxidase (1:1000) – SIGMA; Rato anti- IgG2a de camundongo conjugado a peroxidase 1:1000)- SIGMA; Rato anti- IgG2b de camundongo biotinilado (1:50) - SIGMA), em PBS-Tween 0,05% e incubadas por 40 min a 37⁰C. Para os ensaios com anticorpos conjugados com biotina uma terceira etapa foi acrescentada com incubação de 40 min a 37⁰C com anticorpo secundário (Cabra anti IgG de rato peroxidase conjugado 1:1000) Para revelação das placas foi utilizado, como substrato, Tetrametil benzidina (TMB)-peroxidase e Solução-Peroxidase B

(Kirkegaard & Perry Laboratories) na proporção de 1:1, para detectar interação antígeno-anticorpo. Essa reação foi interrompida com a adição de H₂SO₄ 2N e a leitura da placa foi feita em espectrofotômetro (450nm).

4.7.3 - Teste de avaliação da hipersensibilidade tardia (Teste Cutâneo): Os animais dos grupos experimentais infectados com a cepa Colombiana e camundongos triplíce infectados (Col+21SF+Y), e seus respectivos sub-grupos de tratamento com imunossuppressores, foram submetidos à injeção intradérmica com antígeno de formas epimastigotas do *T. cruzi*, obtidas de meio de cultura, como meio de avaliação da reação de hipersensibilidade tardia.

- Obtenção dos antígenos para o teste cutâneo - As formas epimastigotas provenientes de cultura mantidas em meio WARREN (1960), foram concentradas após centrifugação (1500 Rpm por 20 min) em tubos novos e autoclavados com volume correspondente a 50 ml. Os precipitados referentes aos conteúdos das amostras, foram reunidos num único tubo e lavados sucessivas vezes em solução salina fosfatada (PBS) com pH fisiológico de 7,4. Após a última centrifugação o material foi re-suspendido em PBS, recolhendo-se em seguida o precipitado e descartando o sobrenadante.

O precipitado colhido foi então submetido a dez ciclos de congelamento em nitrogênio líquido (-196° C), sendo logo em seguida descongelado (banho-maria) à 37° C. Através dos procedimentos acima descrito obteve-se a fratura da membrana plasmática do *T. cruzi*, permitindo que o conteúdo protéico fosse liberado. O conteúdo final foi centrifugado, sendo agora o sobrenadante coletado para o uso. Este conteúdo foi filtrado em filtro milipore dentro de um fluxo laminar para evitar contaminação por outros agentes.

- Dosagem protéica do material antigênico obtido - A concentração protéica foi determinada em um kit comercial de dosagem de proteínas (*Protein Assay Reagent Kit*, Micro BCA, PIERCE) desenvolvendo procedimento segundo protocolo recomendado. Após a dosagem protéica do extrato antigênico do *T. cruzi*, a amostra foi ajustada para 2mg/ml.

- Teste de avaliação da hipersensibilidade tardia - Os animais dos grupos experimentais referidos acima foram submetidos ao teste cutâneo pela injeção intradérmica no coxim da pata,

do antígeno preparado na concentração de 2mg/ml. A pata traseira direita foi injetada com um volume de 25 µl (50 µg de proteína) do antígeno, enquanto a pata traseira esquerda foi injetada com o mesmo volume de solução salina fosfatada (PBS).

- Medição da espessura da pata - Utilizando um paquímetro (*Fisherbrand Digital Calipers, Traceable, Fisher Scientific*) todos os animais tiveram suas patas medidas nos seguintes períodos: 1º. Ponto: imediatamente antes da injeção e os seguintes pontos após as injeções (de antígeno e de salina): 24, 48 e 72 horas. A unidade de medida utilizada foi o milímetro (mm).

4.8 - Estudo histopatológico: Os fragmentos de músculo esquelético, coração, baço e fígado foram coletados e fixados em formol *Milloning*, incluídos em parafina para obtenção de secções de 5 µm e corados em Hematoxilina e Eosina (H&E).

4.9 - Teste Estatístico: Os resultados obtidos foram analisados utilizando o programa de construção de gráficos e análise estatística Graph Pad Prism, versão 5.0. Para análise estatística foi utilizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney. O grau de significância foi estabelecido com valor de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1 Parasitemia e Mortalidade

5.1.1 – Camundongos com infecção única:

5.1.1a - Camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi*:

Os camundongos infectados com a cepa Colombiana apresentaram positividade da parasitemia a partir do 7º dia de infecção com picos irregulares entre o 19º e 20º dia de infecção. Os camundongos tratados com Betametasona e Ciclofosfamida apresentaram reativação da parasitemia a partir do 137º dia de infecção. Contudo, os camundongos tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina permaneceram com a parasitemia negativa (Fig. 01).

A mortalidade dos camundongos infectados com a cepa Colombiana se iniciou a partir do 20º dia de infecção, apresentando aproximadamente 90% de mortalidade aos 44 dias de infecção (Fig. 03). Os camundongos que foram tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina apresentaram mortalidade de 16% aos 137º dia de infecção.

5.1.1.b - Camundongos com infecção única pela cepa 21SF do *T. cruzi*:

Os camundongos infectados com a Cepa 21 SF apresentaram uma positividade da parasitemia a partir do 8º dia de infecção, com picos entre 15º e 16º dias de infecção (Fig. 03). A mortalidade iniciou-se a partir do 8º dia de infecção apresentando uma taxa de mortalidade de 16% no 34º dia de infecção (Fig. 02).

5.1.1.c - Camundongos com infecção única pela cepa Y do *T. cruzi*:

Os camundongos infectados com a cepa Y apresentaram uma curva parasitêmica com elevados índices de parasitos circulantes no sangue periférico a partir do 7º dia de infecção, com pico parasitêmico do 10º dia de infecção (Fig. 03). A mortalidade cumulativa dos camundongos foi de 92% ao 20º dia de infecção (Fig. 02).

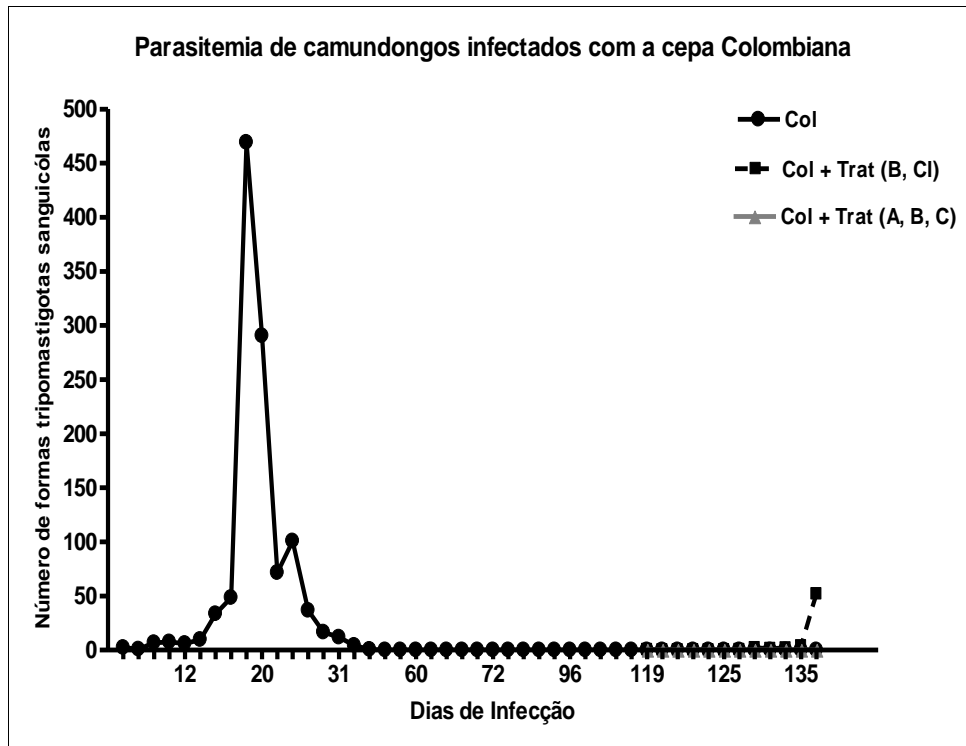


Fig. 01: Parasitemia de camundongos infectados com Cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col), tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col + Trat (B,CI)); tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Col+Trat (A,B,C)).

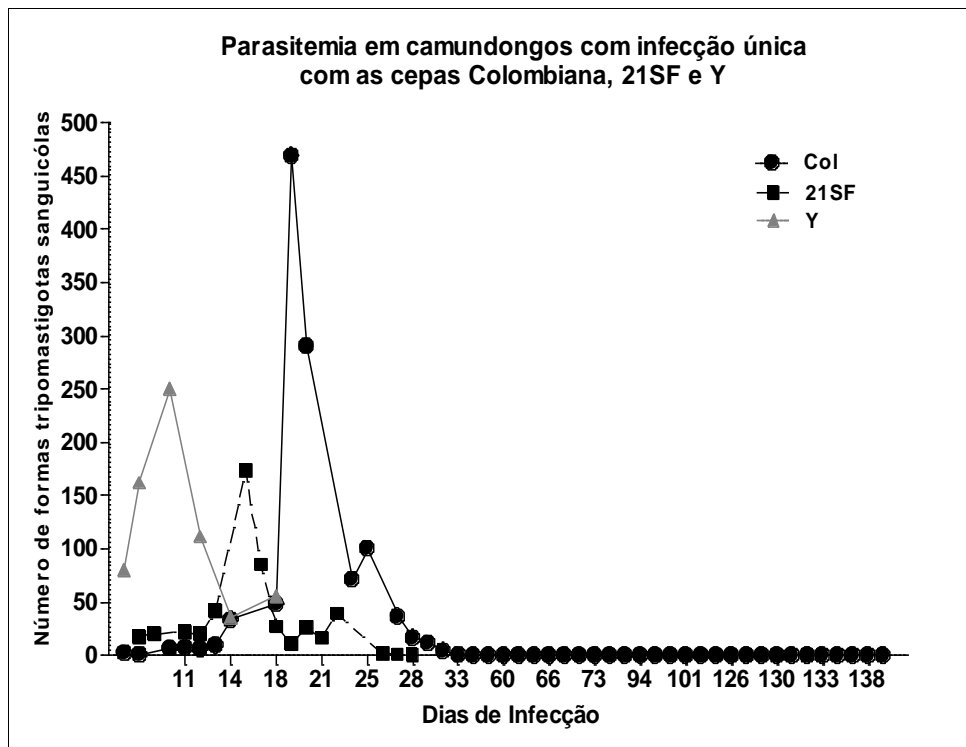


Fig. 02: Parasitemia de camundongos com infecção única infectados com Cepa Colombiana (Col), 21SF e Y do *T. cruzi*.

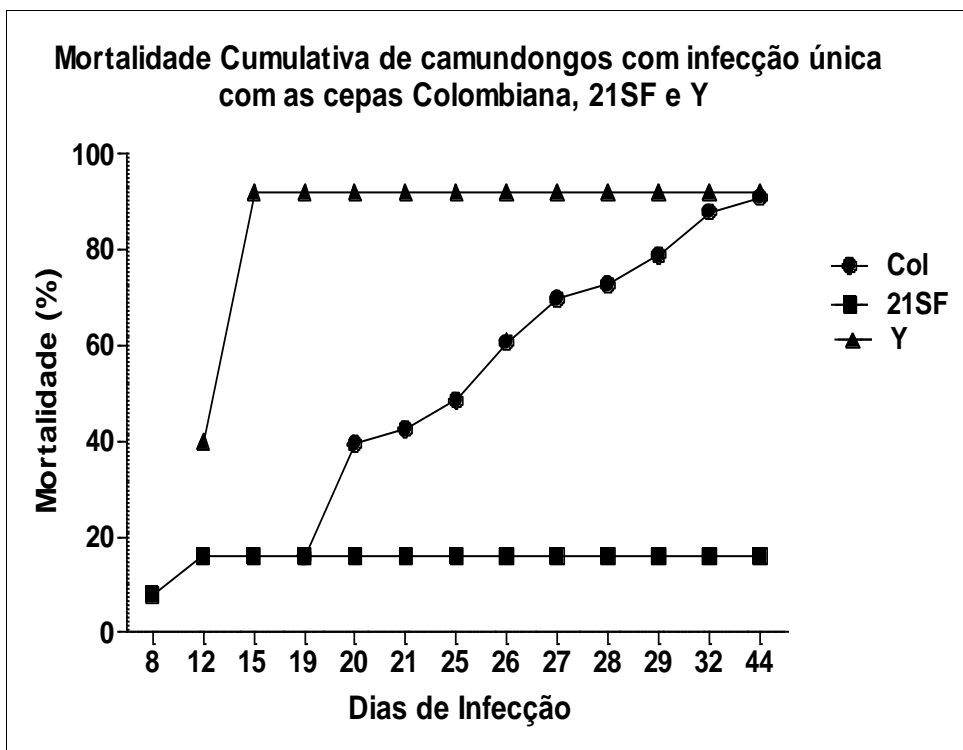


Fig. 03: Mortalidade cumulativa de camundongos com infecção única com as cepas Colombiana, 21SF e Y do *T. cruzi*.

5.1.2 - Camundongos com triplíce infecção com diferentes cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y):

Os camundongos triplíce infectados apresentaram picos irregulares de parasitemia entre 18° e 25° dias de infecção, ocorrendo diminuição a partir do 30°, com negatificação parasitêmica a partir do 50° dia de infecção. O grupo submetido à triplíce infecção não apresentou formas tripomastigotas circulantes após a segunda e terceira infecções. O tratamento em camundongos triplíce infectados com Betametasona e Ciclofosfamida determinou um aumento de parasitas no sangue periférico significativo a partir do 129° dia de infecção. Em contrapartida, o tratamento com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina em camundongos triplíce infectados, não resultou na positivação da parasitemia nestes animais (Fig. 04).

A mortalidade dos camundongos triplíce infectados começou a partir do 100° dia de infecção, com uma taxa de mortalidade de aproximadamente 10% (Fig. 05). Concomitantemente com a parasitemia, o grupo de camundongos triplíce infectados e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida, apresentou 100 % de mortalidade aos 143° dias de infecção. O grupo de camundongos tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina, apresentou uma taxa de sobrevivência de 90% (Fig. 05).

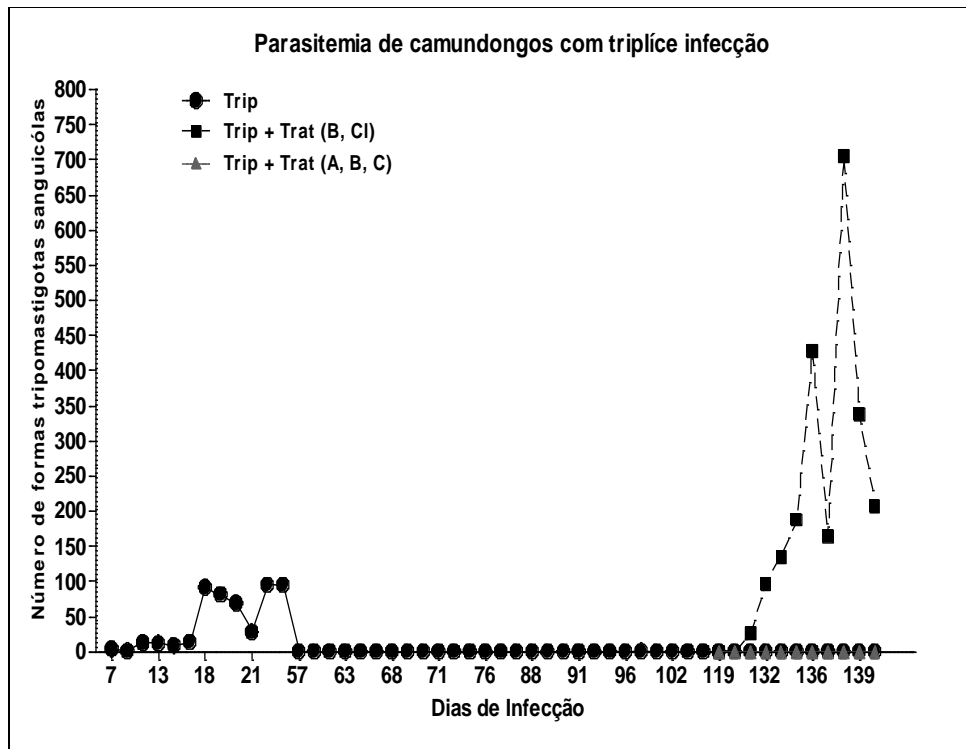


Fig. 04: Parasitemia de camundongos com triplíce infecção com cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y) (Trip), tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Trip + Trat (B,Cl)); tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Trip +Trat (A,B,C)).

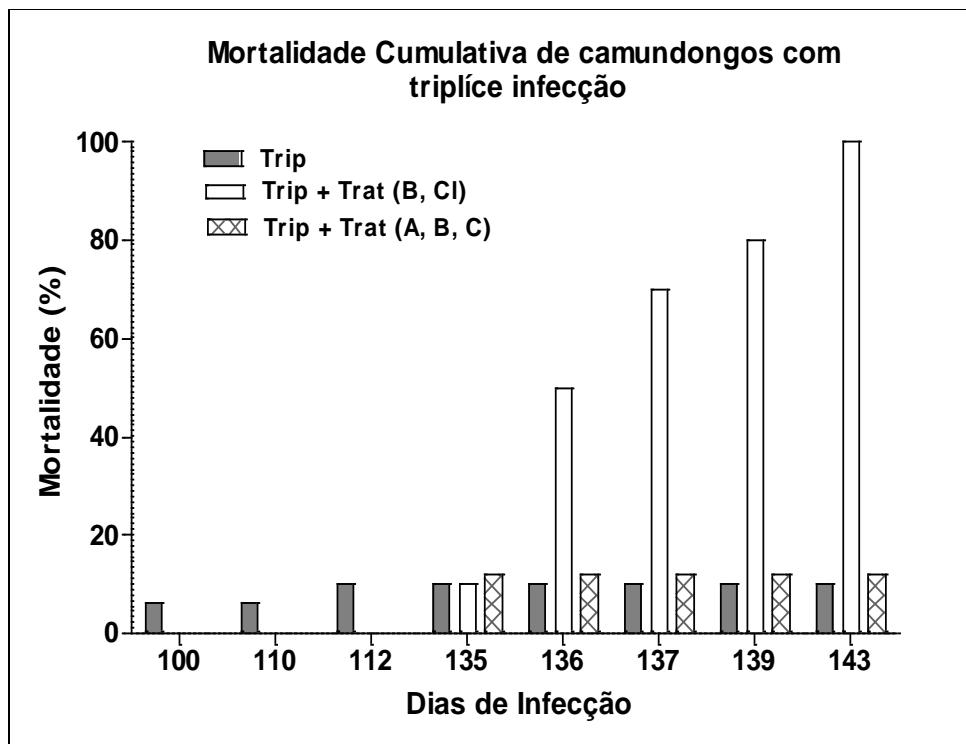


Fig. 05: Mortalidade Cumulativa de camundongos triplíce infectados com cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y) (Trip), tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Trip + Trat (B, Cl)); tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Trip+Trat (A,B,C)).

5.2 Estudo Histopatológico

4.2.1 – Camundongos com infecção única:

4.2.1a - Camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*:

No grupo de camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*, foi observado (140 dias de infecção) moderado infiltrado mononuclear difuso e focal, no subepicárdio com presença de raros parasitas e fibrose intersticial moderada em miocárdio (Figs. 06 A e 06 B). No músculo esquelético as lesões variaram de discretas a moderadas, difusas e focais com presença de raros ninhos parasitários. Observa-se uma arterite crônica em alguns animais com espessamento e hialinização da camada média e infiltrado perivascular (Figs. 06 C e 06 D).

Nos animais cronicamente infectados com a cepa Colombiana e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida se observou uma diminuição no processo inflamatório no miocárdio. Área focal de destruição de miócitos e presença de ninhos parasitários com formas amastigotas do *T. cruzi* (Figs. 07 A e 07 B). No músculo esquelético observa-se um discreto infiltrado difuso mononuclear e presença de parasitos (Figs. 07 C e 07 D).

O tratamento com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina em camundongos infectados com a cepa Colombiana, determinou no miocárdio um intenso infiltrado mononuclear em torno dos vasos da base. Áreas focais extensas de destruição no miocárdio, com intenso infiltrado mononuclear nos ventrículos. Em átrio, foi observado um discreto infiltrado mononuclear intersticial difuso. Presença de arteriolas com necrose hialina e intenso infiltrado mononuclear (Figs. 08 A e 08 B). No músculo esquelético foi observada apenas lesão vascular com infiltrado mononuclear (Figs. 08 C e 08 D).

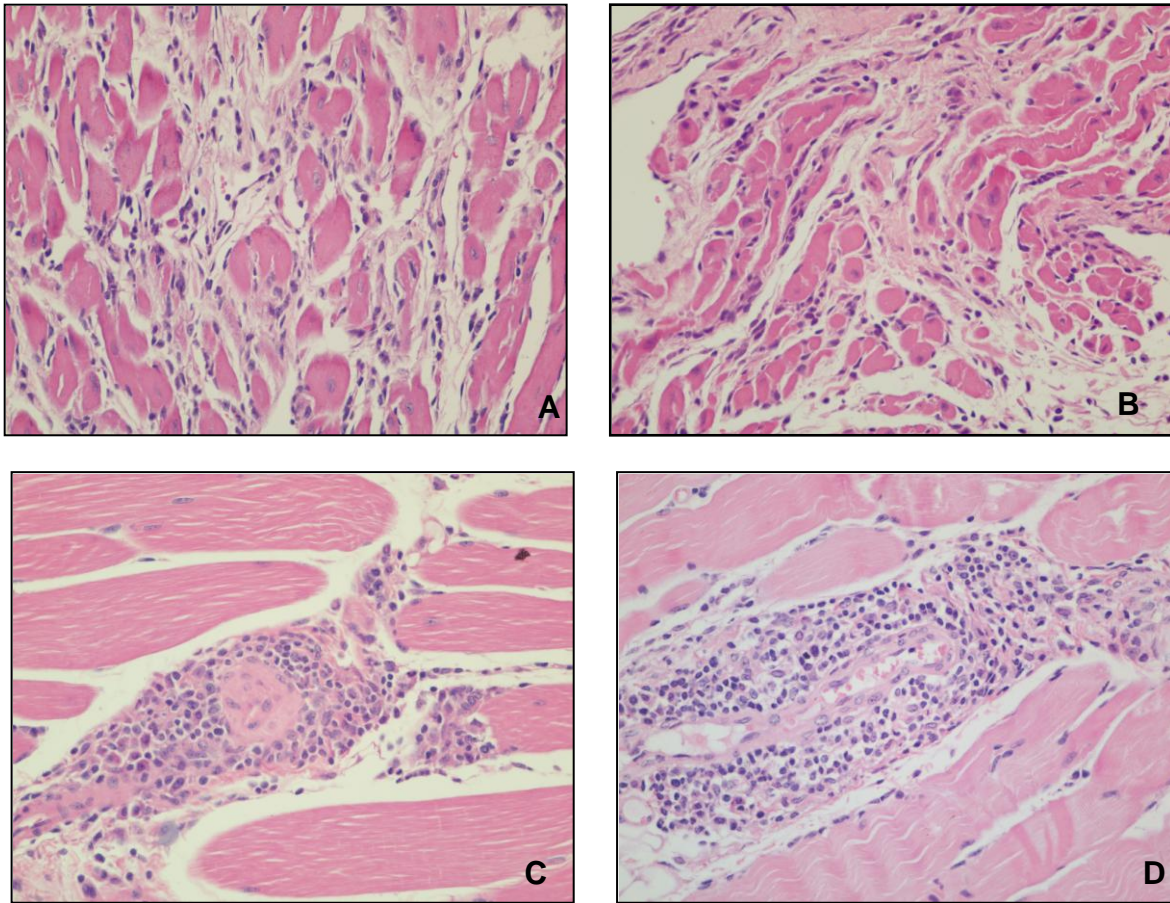


Fig. 06: *Grupo de camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do T. cruzi (Col)* – **A e B** - Secções de miocárdio apresentando miocardite crônica, com infiltrado difuso moderado, com destruição de fibras cardíacas e fibrose intersticial (400x). **C** – Músculo esquelético mostrando no interstício processo de arterite crônica com espessamento e hialinização da camada média e intenso infiltrado inflamatório linfocítico. Destruição focal de fibras musculares (400x) e **D** – Foco inflamatório intersticial comprometendo vênula com intenso infiltrado mononuclear peri-vascular em músculo esquelético (400x). H&E.

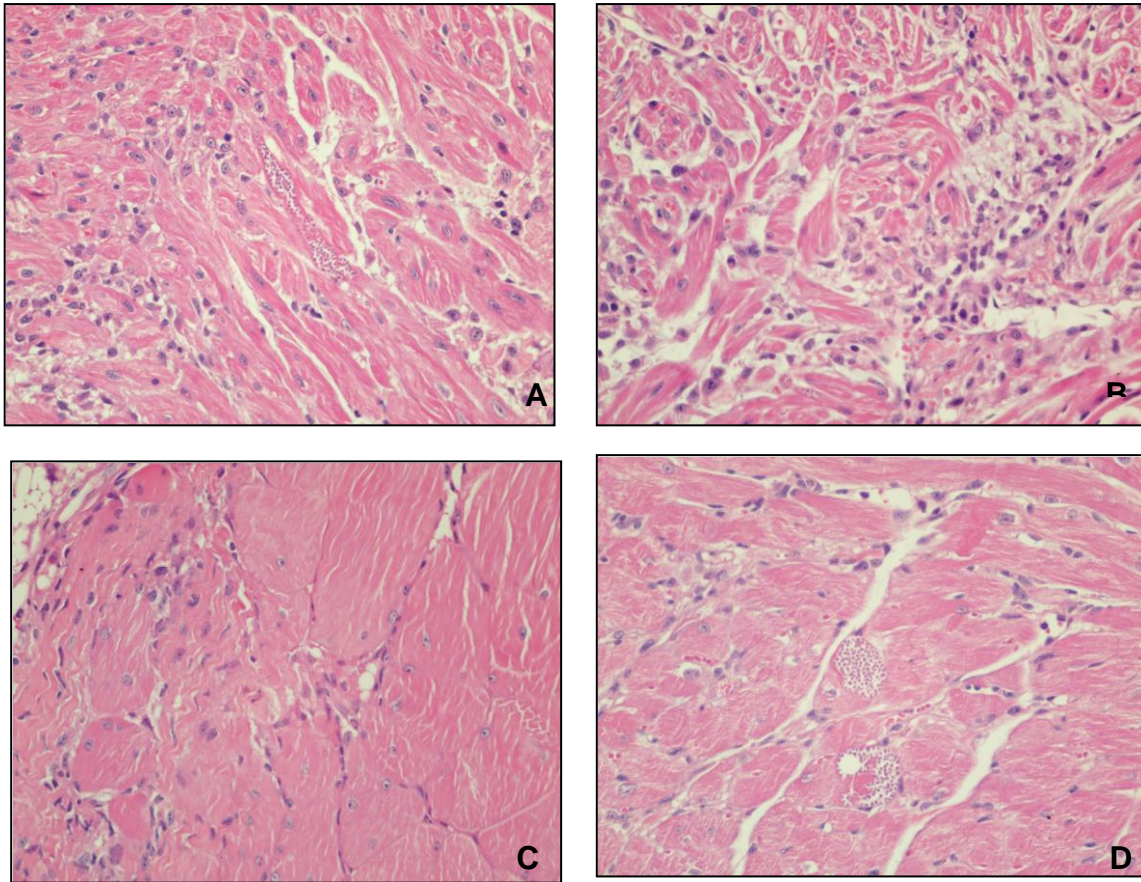


Fig. 07: Grupo de camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col+Trat (B, C)): **A** – Secção de miocárdio com moderado e difuso infiltrado mononuclear e presença de ninhos parasitários (400x). **B** - Miocárdio com difuso e discreto infiltrado mononuclear, com área focal de destruição de miócitos e presença de depósito matricial (400x). **C** - Músculo esquelético com discreto infiltrado inflamatório difuso (400x). **D** – Secções de músculo esquelético com discreto infiltrado mononuclear e presença de ninhos parasitários contendo formas amastigotas do *T. cruzi* (400x). H&E.

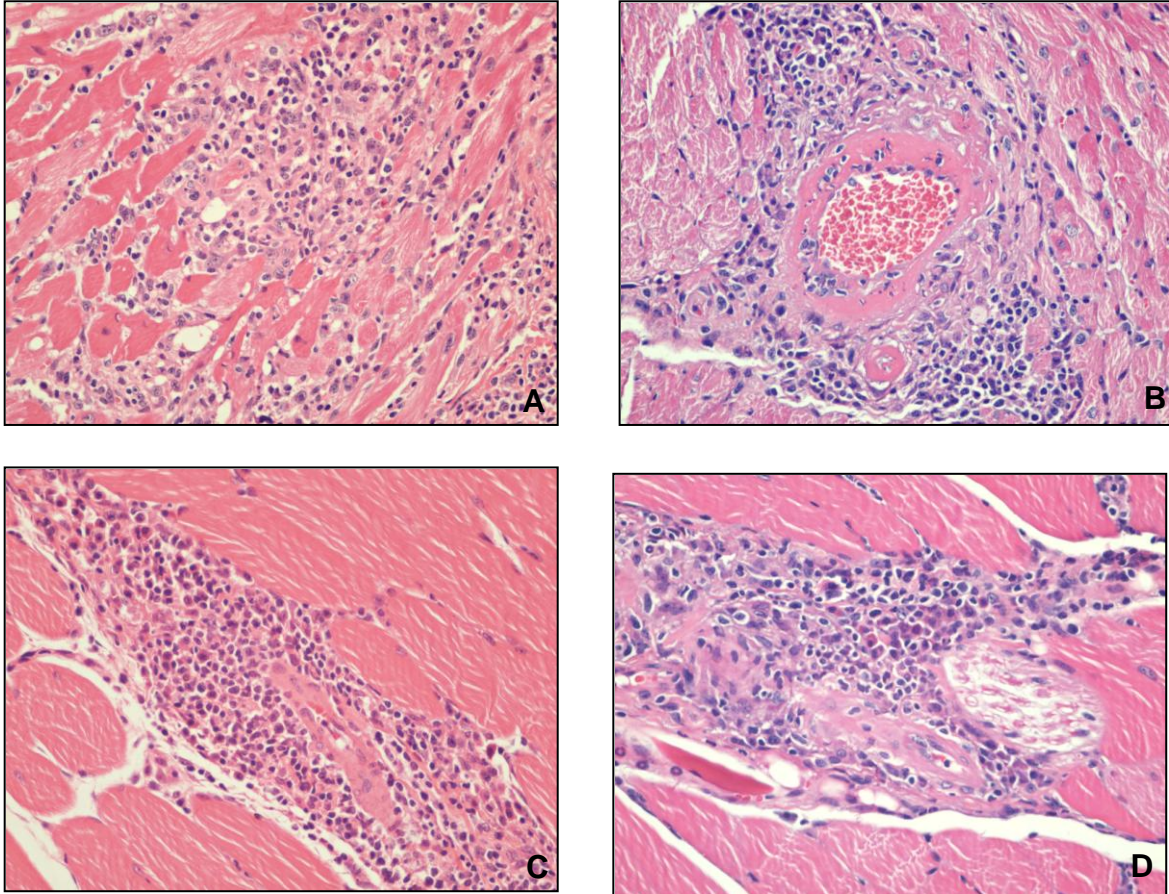


Fig. 08: Grupo de camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Col+Trat (A, B, C): **A** – Miocárdio com infiltrado intersticial mononuclear difuso e moderado e extensa área de necrose de células cardíacas com substituição por denso infiltrado mononuclear (400x). **B** – Observa-se arteríola com necrose hialina da parede e intenso infiltrado mononuclear perivascular no miocárdio (400x). **C** – Secções de músculo esquelético com arteríola com paredes hialinizadas e denso infiltrado mononuclear perivascular (400x). **D** – Feixe vasculo-nervoso com alterações da parede arteriolar com infiltrado de linfócitos e plasmócitos (400x). H&E.

54.2.1b - Camundongos infectados com cepa 21SF do *T. cruzi*:

Nos camundongos infectados com a cepa 21SF (30 dias de infecção), foi observado no miocárdio infiltrado inflamatório mononuclear difuso moderado com destruição de fibras cardíacas (Fig. 09 A). No músculo esquelético foi observado um intenso infiltrado mononuclear focal, difuso e perivascular. Também foi observada necrose de fibras musculares e calcificação (Fig. 09 B).

5.3.1.c - Camundongos infectados com cepa Y do *T. cruzi*:

Nos camundongos infectados com a cepa Y (30 dias de infecção), o miocárdio apresentou um infiltrado focal discreto, com presença de parasitos e necrose de fibras cardíacas (Fig. 09 C). Em músculo esquelético foi apenas observado um infiltrado inflamatório focal discreto. No fígado foram vistos focos de infiltração mononuclear do parênquima e a presença de macrófagos contendo formas amastigotas do *T. cruzi*, característicos do macrofagotropismo (Fig. 09 D). No baço foi observada uma intensa hiperplasia dos folículos linfóides, necrose e parasitismo dos macrófagos.

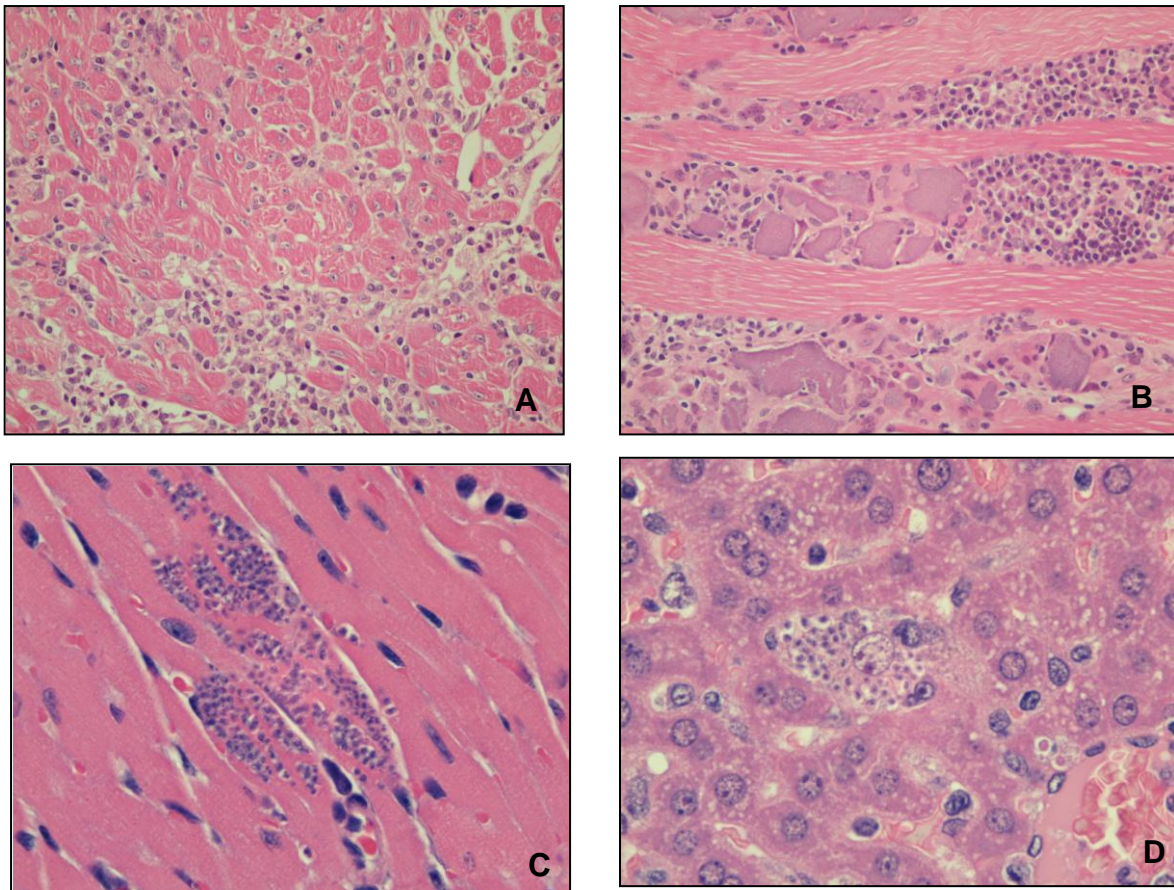


Fig. 09: Grupo de camundongos infectados com a cepa 21SF (A e B) e com a cepa Y (C e D) do *T. cruzi*: **A** – Miocárdio com moderado infiltrado intersticial mononuclear. Área focal de destruição com substituição por infiltrado mononuclear (400x). **B** – Segmento de músculo esquelético com áreas focais de necrose e denso infiltrados inflamatórios mononucleares (400x). **C** – Miocárdio com presença de formas amastigotas no citoplasma dos miocitos (1000x). **D** – Secção de fígado com presença de formas amastigotas do *T. cruzi* no citoplasma de célula Kupffer (1000x). H&E.

5.2.2 – Camundongos com triplíce infecção com diferentes cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y):

No miocárdio de camundongos na fase crônica da doença de Chagas com triplíce infecção as lesões inflamatórias variaram de discretas a moderadas com presença de raros parasitos. Presença de feixes de colágeno e proliferação intersticial de fibroblastos (Fig. 10 A e 10 B). Em músculo esquelético as lesões eram constituídas apenas de infiltrados focais perivasculares, observando processo de arteriolite (Fig. 10 C e 10 D).

Nos camundongos com triplíce infecção tratados com Betametasona e Ciclofosfamida foram observadas no miocárdio lesões inflamatórias variando de discretas a intensas, com presença de moderado parasitismo e de necrose intersticial e de células cardíacas com matriz extracelular espessada (Fig. 11 A). O tratamento determinou nítida acentuação do parasitismo em miocárdio, com intensificação do processo inflamatório quando comparados aos camundongos não tratados. No músculo esquelético foi observada a presença de formas amastigotas do *T. cruzi* e fibrose intersticial com discreto infiltrado mononuclear (Fig. 11 B). Também foi observado intenso parasitismo em macrófagos no fígado e no baço (Figs. 11 C e 11 D).

No grupo de tratado com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina o miocárdio apresenta infiltrado intersticial difuso e sub-epicárdico. Áreas focais perivasculares com infiltração mononuclear com a presença de necrose hialina (Fig. 12 A). O músculo esquelético apresenta áreas focais de destruição e infiltrado mononuclear em torno de feixe vasculo-nervoso, com a presença de arterite e arteriolite (Fig. 12 B). O fígado e o baço destes animais não apresentaram alterações (Figs. 12 C e 12 D).

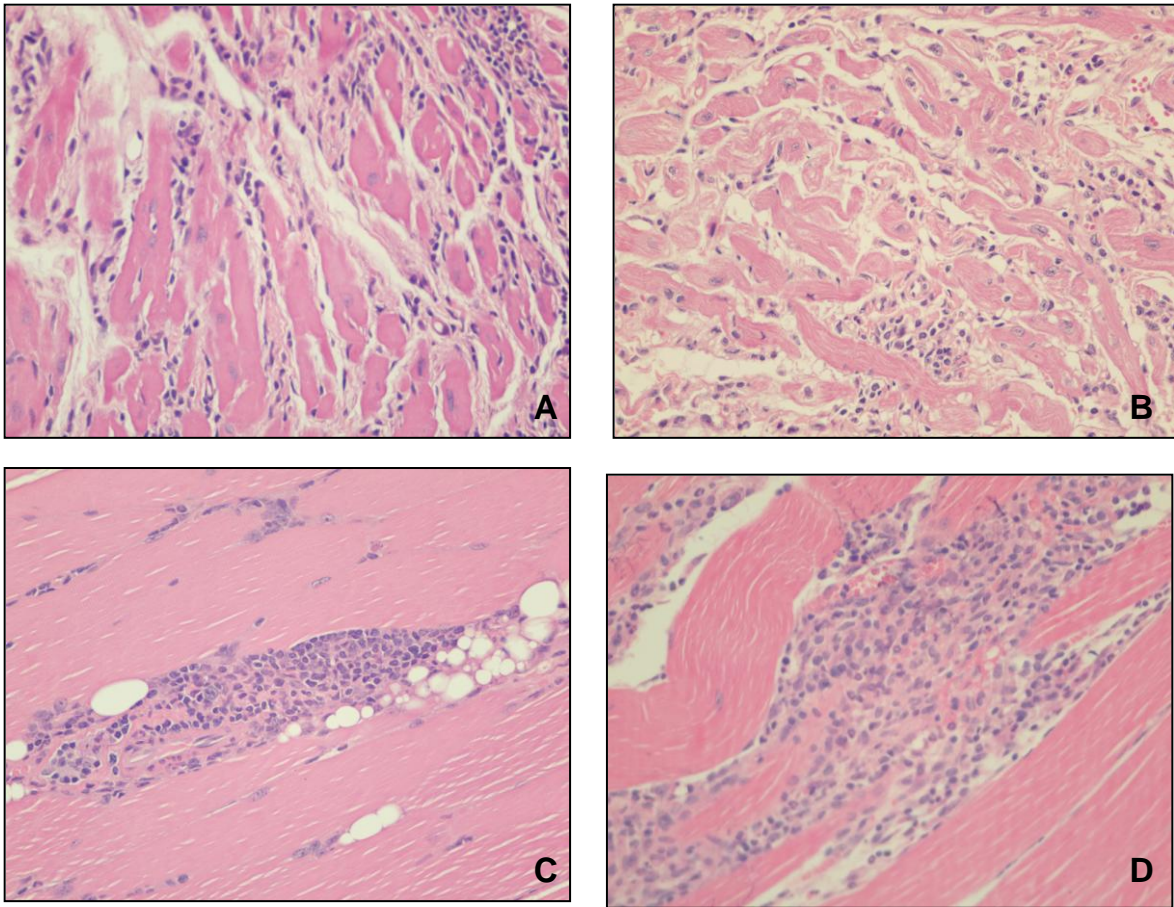


Fig. 10: *Grupo de camundongos tríplice infectados com a cepa T. cruzi (Trip)*: **A** – Miocárdio apresentando fibras cardíacas separadas por feixes de colágeno. Proliferação intersticial de fibroblastos (400x). **B** – Secções de miocárdio com infiltrados focais mononucleares com focos de destruição de fibras cardíacas e moderado depósito intersticial de colágeno (400x). **C e D** – Secções de músculo esquelético com áreas focais de destruição de fibras musculares e substituição por infiltrado mononuclear (400x). H&E

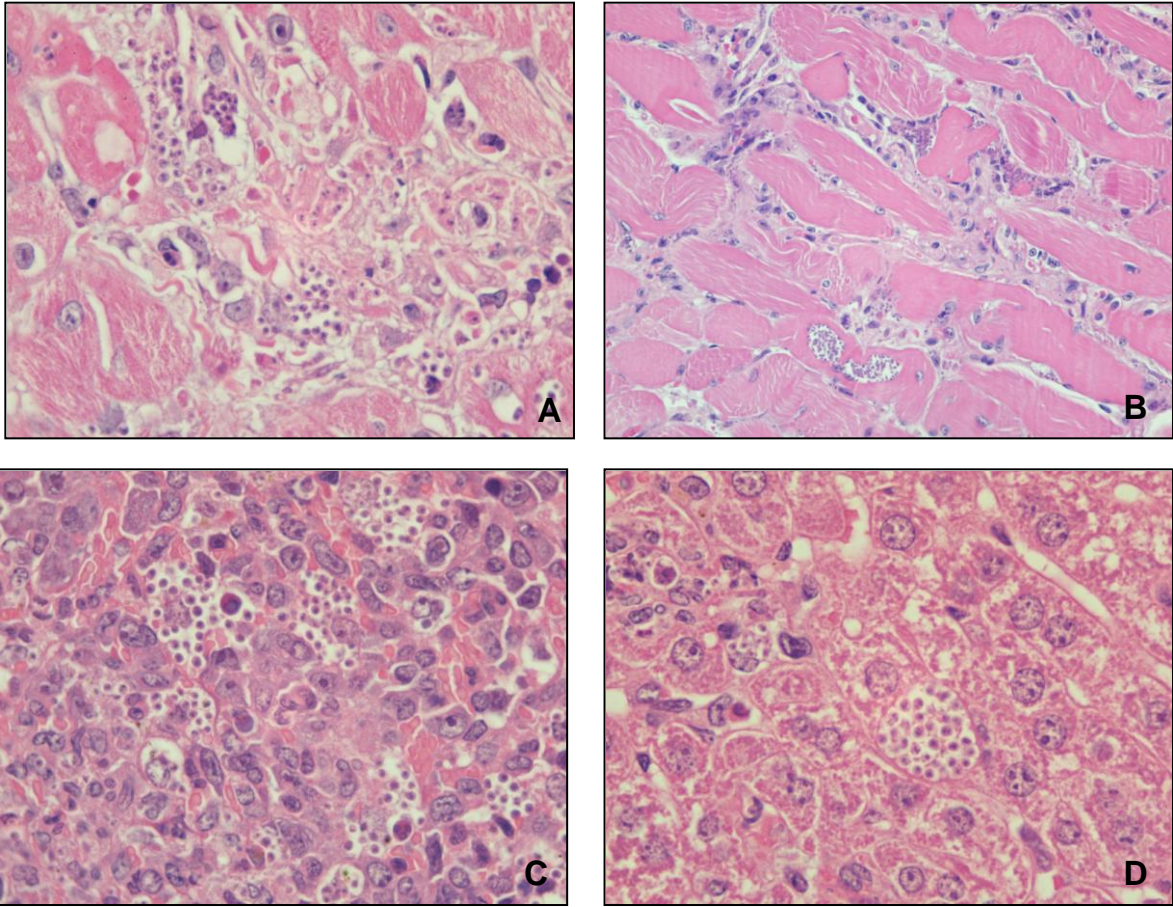


Fig. 11: Grupo de camundongos *tríplice* infectados com a cepa *T. cruzi* e tratados com *Betametasona* e *Ciclofosfamida* (*Trip+ Trat (B, Cl)*): **A** – Miocárdio mostrando área focal de destruição de miocelulas e moderado infiltrado mononuclear com células em apoptose. Matriz extracelular espessada e presença de formas amastigotas do *T. cruzi* (1000x). **B** – Músculo esquelético com presença de formas amastigotas do *T. cruzi* e fibrose intersticial difusa com discreto infiltrado mononuclear (400x). **C** – Secção do baço mostrando a presença de macrófagos parasitados na polpa vermelha; Presença de linfócitos em apoptose (1000x). **D** – Secção de fígado com formas amastigotas do *T. cruzi* em células de Kupffer (1000x). H&E

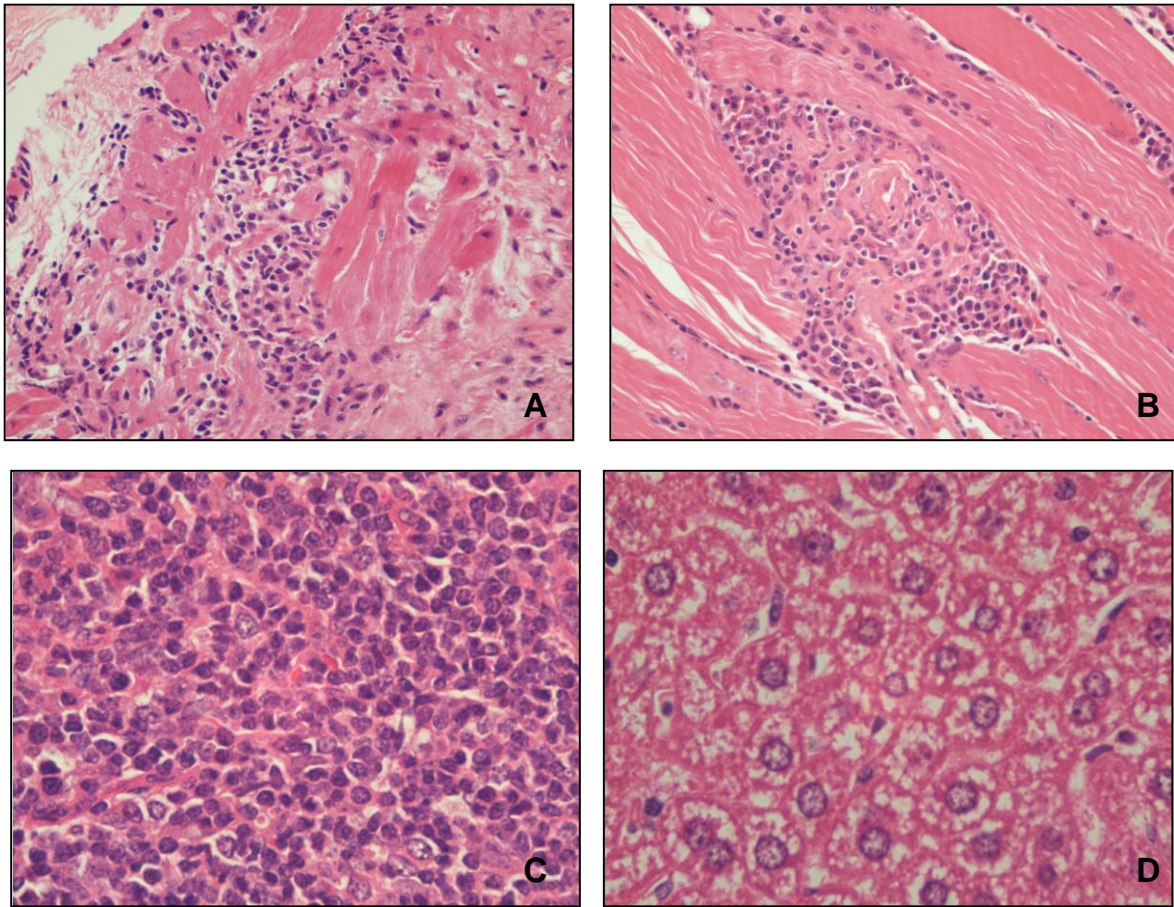


Fig. 12: Grupo de camundongos *tríplice infectados com a cepa T. cruzi e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Trip+ Trat (A, B, C))*: **A** – Secção do coração mostrando necrose hialina de miocitos, áreas de destruição do miocárdio com presença de infiltrado inflamatório mononuclear de predominância linfocitária (400x). **B** – Secção de músculo esquelético com destruição focal de miocitos e envolvimento de arteríola. Arteríola com paredes hialinizadas com difuso infiltrado mononuclear perivascular (400x). **C** – Secção do baço mostrando os cordões celulares da polpa vermelha com denso infiltrado inflamatório linfocitário (1000x) **D** – Secção de fígado sem alterações (1000x). H&E

5.3 – Testes sorológicos

4.3.1 – Exame sorológico anti-*T. cruzi* -Imunofluorescência Indireta

5.3.1a - Camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi*:

A titulação de IgG total anti-*T. cruzi* em camundongos infectados com a cepa Colombiana e tratados com Ciclofosfamida e Betametasona teve uma redução estatisticamente significativa ($p=0,043$) quando comparados a camundongos cronicamente infectados e não tratados. No grupo de camundongos infectados e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina a titulação dos anticorpos variou de Negativo a 1:320. O tratamento com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina não determinou uma diminuição estatisticamente significativa quando comparados ao grupo não tratado. Resultados negativos foram observados nos camundongos controles não infectados (Fig. 13).

5.3.1b - Camundongos com triplíce infecção com cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y):

O tratamento com imunossupressores (Betametasona e Ciclofosfamida; Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina) em camundongos triplamente infectados conferiu uma redução da titulação de anticorpos anti-*T. cruzi* nos dois grupos de tratamento, quando comparados ao grupo de animais triplamente infectados e não tratados (Fig. 14).

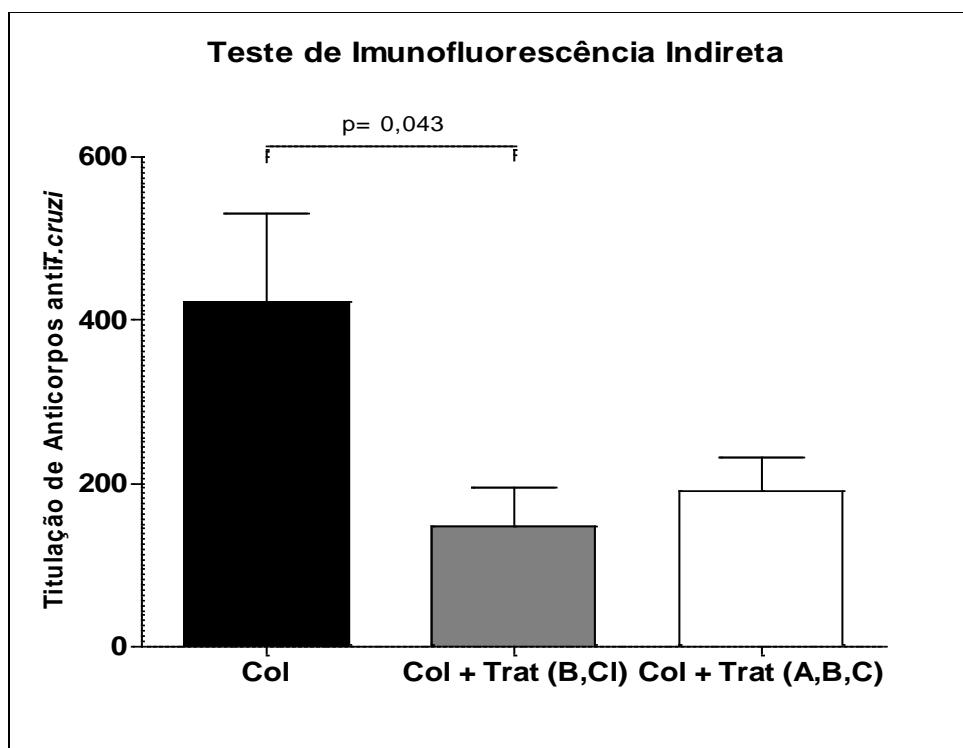


Fig.13: Titulação de anticorpos anti-*T. cruzi* através da técnica de Imunofluorescência indireta em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col), tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col + Trat (B, CI)); tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Col + Trat (A, B, C)). Valor de $p < 0.05$.

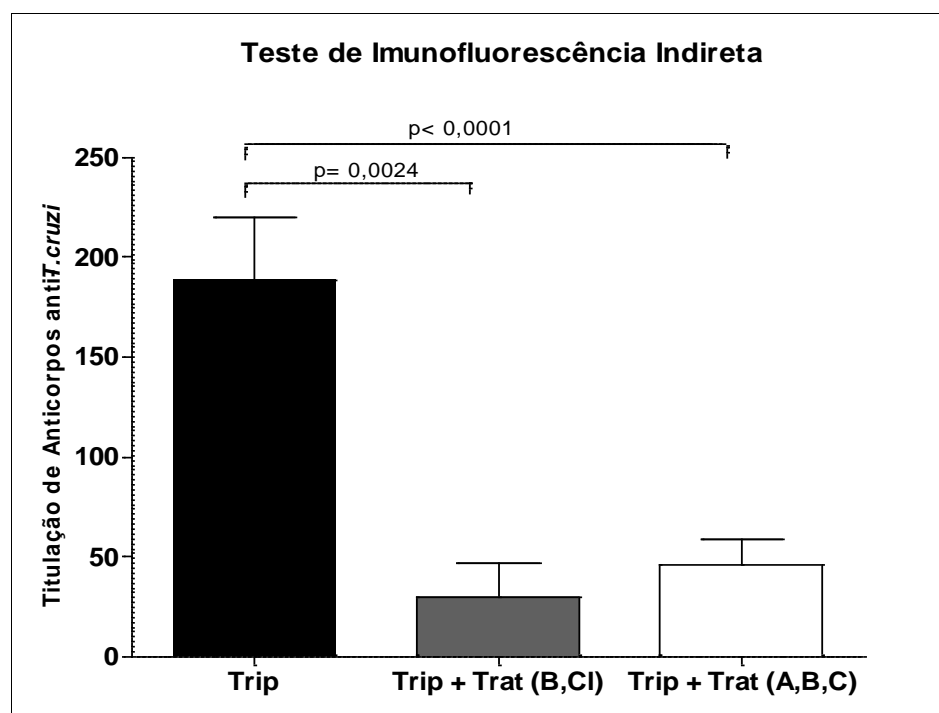


Fig. 14: Titulação de anticorpos anti-*T. cruzi* através da técnica de Imunofluorescência Indireta em camundongos com triplíce infecção (Col+21SF+Y) com a cepas do *T. cruzi* (Trip), tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Trip + Trat (B, CI)); tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Trip + Trat (A, B, C)). Valor de $p < 0.05$.

5.4 – Teste de ELISA para dosagem de Imunoglobulinas

A resposta humoral neste estudo foi caracterizada pela dosagem de imunoglobulinas totais das sub-classes IgG1, IgG2a, IgG2b e IgM com objetivo de estabelecer diferenças entre o padrão de resposta de isótipos de anticorpos nos diferentes grupos experimentais.

5.4.1 - Camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi*:

Os camundongos infectados com a cepa Colombiana, apresentaram um aumento nos níveis de IgG1 (Fig. 15), IgG2a (Fig. 16) e IgM (Fig. 17) estatisticamente significante quando comparados ao grupo de camundongos não infectados.

Os resultados demonstraram que camundongos infectados com a cepa Colombiana e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida, apresentaram uma diminuição nos níveis de IgG1 (Fig. 15), IgG2a (Fig. 16) e IgM (Fig. 17) estatisticamente significante, quando comparados ao grupo infectado sem tratamento e ao grupo infectado e tratado com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina. Entretanto, o isótipo IgG2b não foi observado uma redução estatisticamente significante (Fig. 18).

Nos camundongos infectados com a cepa Colombiana e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina foi observado um aumento nos níveis de IgG2a (Fig. 16) e IgM (Fig. 17) quando comparados ao grupo de camundongos infectados e não tratados e ao grupo infectado e tratado com Betametasona e Ciclofosfamida. Além disso, foi observada uma diminuição nos níveis de IgG2b quando comparados aos níveis deste isótipo nos outros grupos (Fig. 18). Entretanto, o isótipo IgG1 não foi observado uma redução estatisticamente significante quando comparado ao grupo de camundongos infectados com a cepa Colombiana e não tratados (Fig. 15).

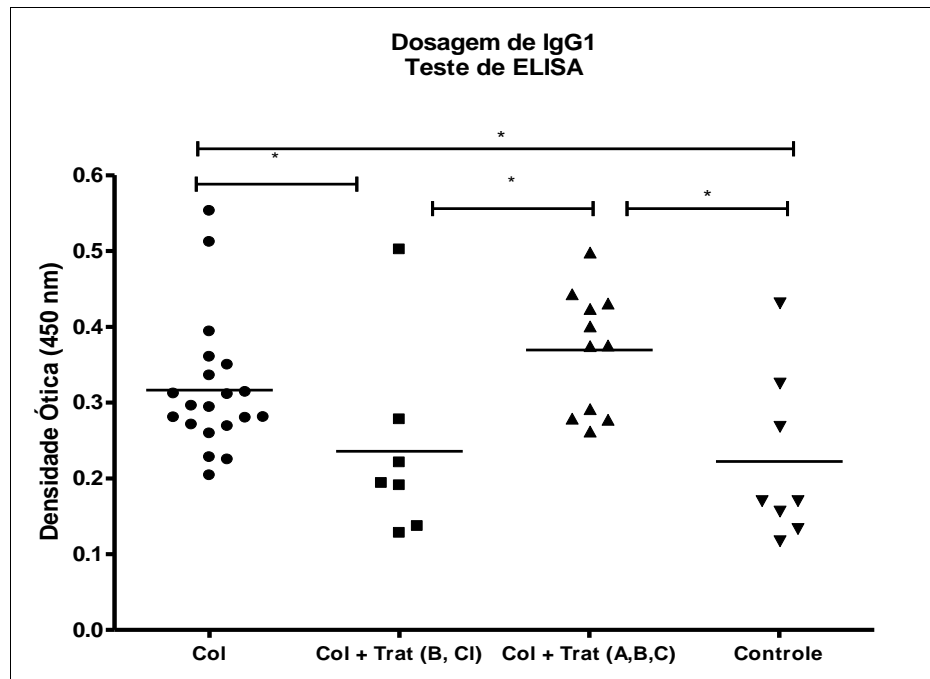


Fig. 15: Dosagem de IgG1 em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col); tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col+Trat (B,Cl)); tratados com Azatioprina Betametasona e Ciclosporina (Col+Trat (A,B,C)); Controles não infectados; Valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

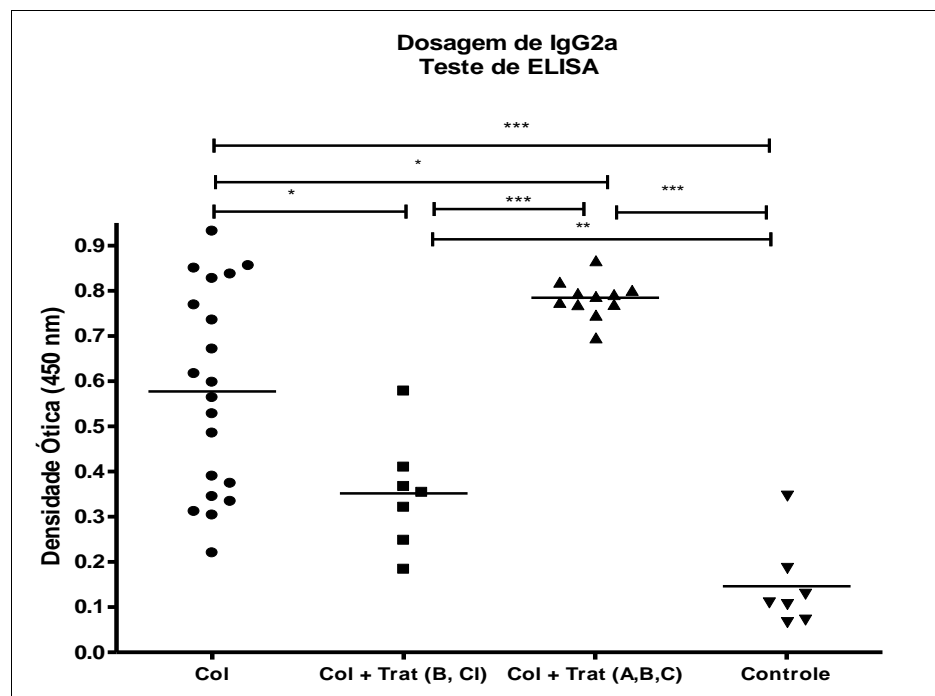


Fig. 16: Dosagem de IgG2a em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col); tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col+Trat (B,Cl)); tratados com Azatioprina Betametasona e Ciclosporina (Col+Trat (A,B,C)); Controles não infectados; Valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

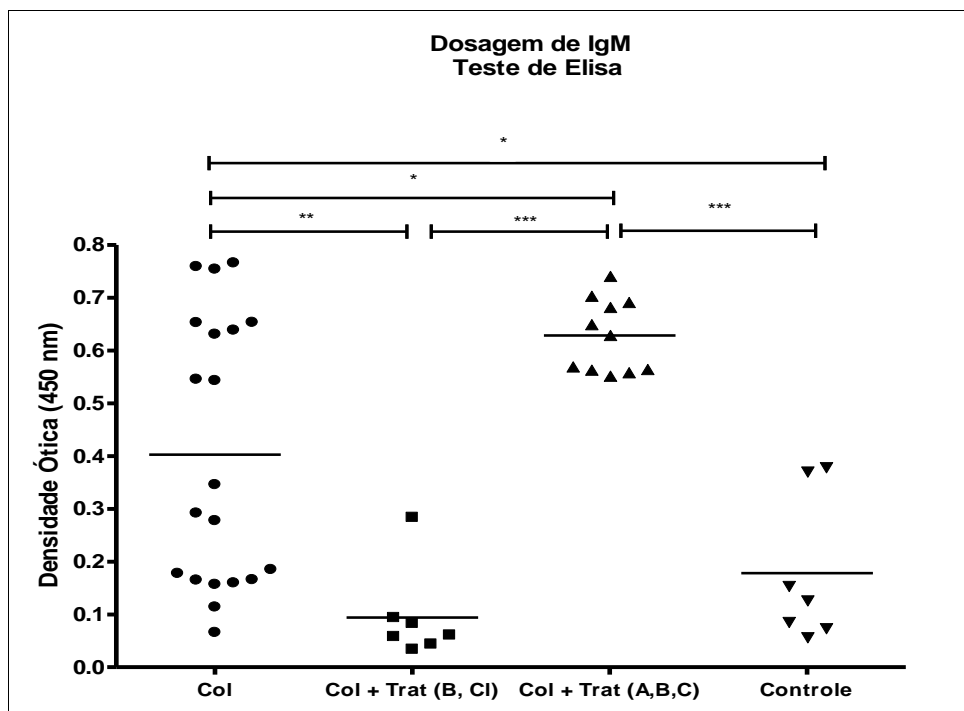


Fig. 17: Dosagem de IgM em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col); tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col+Trat (B,Cl)); tratados com Azatioprina Betametasona e Ciclosporina (Col+Trat (A,B,C)); Controles não infectados; Valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

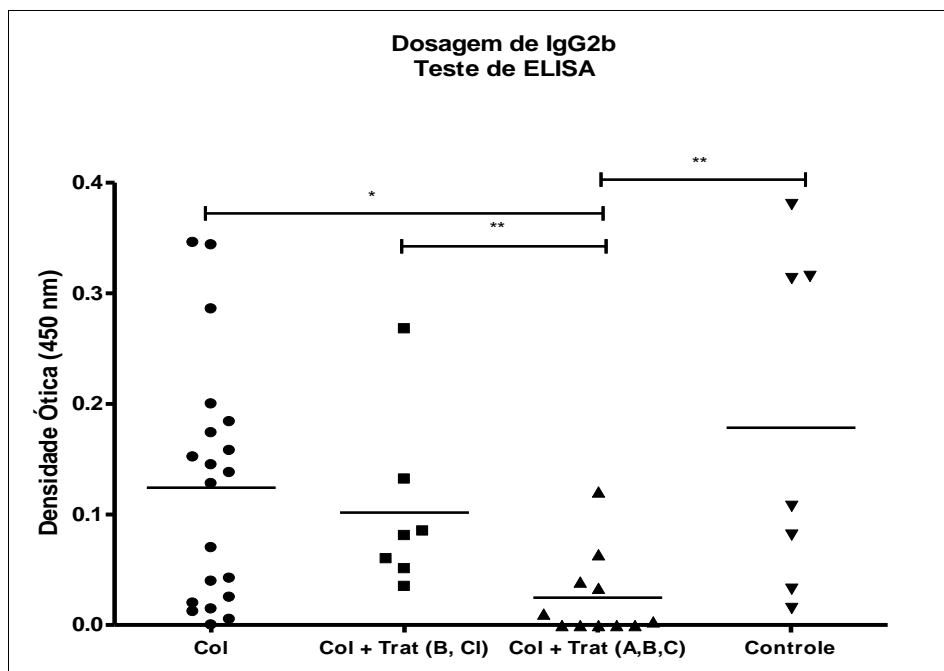


Fig. 18: Dosagem de IgG2b em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col); tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col+Trat (B,Cl)); tratados com Azatioprina Betametasona e Ciclosporina (Col+Trat (A,B,C)); Controles não infectados; Valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

5.4.2 - Camundongos com triplíce infecção com diferentes cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y):

Os camundongos triplíce infectados, apresentaram um aumento nos níveis de IgG1 (Fig. 19), IgG2a (Fig. 20) e IgM (Fig. 21) estatisticamente significante quando comparados ao grupo de camundongos não infectados.

Os resultados demonstraram que camundongos triplíce infectados e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida, apresentaram uma diminuição nos níveis de IgG1 (Fig. 19), IgG2a (Fig. 20), IgM (Fig. 21) e IgG2b (Fig. 22) estatisticamente significante, quando comparados ao grupo infectado sem tratamento.

Nos camundongos triplíce infectados e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina foi observado um aumento nos níveis de IgG2a (Fig. 20) e IgM (Fig. 21) quando comparados ao grupo de camundongos infectados. Além disso, foi observada uma diminuição nos níveis de IgG2b quando comparados aos níveis deste isótipo nos outros grupos (Fig. 22). Entretanto, o isótipo IgG1 não foi observado uma redução estatisticamente significante quando comparado ao grupo de camundongos infectados com a cepa Colombiana e não tratados (Fig. 19).

5.4.3 – Estudo comparativo da dosagem de isótipos de imunoglobulinas entre camundongos infectados com cepa Colombiana do *T. cruzi* e camundongos com triplíce infecção com diferentes cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y):

Os resultados da comparação da dosagem de isótipos mostraram um aumento dos níveis de IgG2b em camundongos com triplíce infecção quando comparados a camundongos somente infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* (Fig. 23).

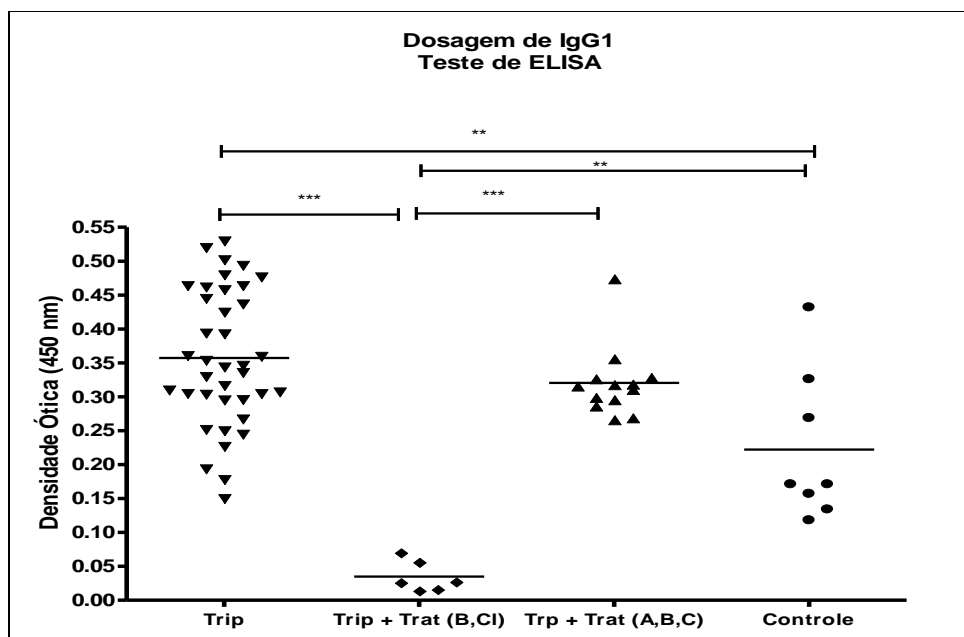


Fig. 19: Dosagem de IgG1 em camundongos triplíce infectados (Col+21SF+Y) com cepas do *T. cruzi* (Trip); tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Trip+Trat (B,Cl)); tratados com Azatioprina Betametasona e Ciclosporina (Trip+Trat (A,B,C)); Controles não infectados; Valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

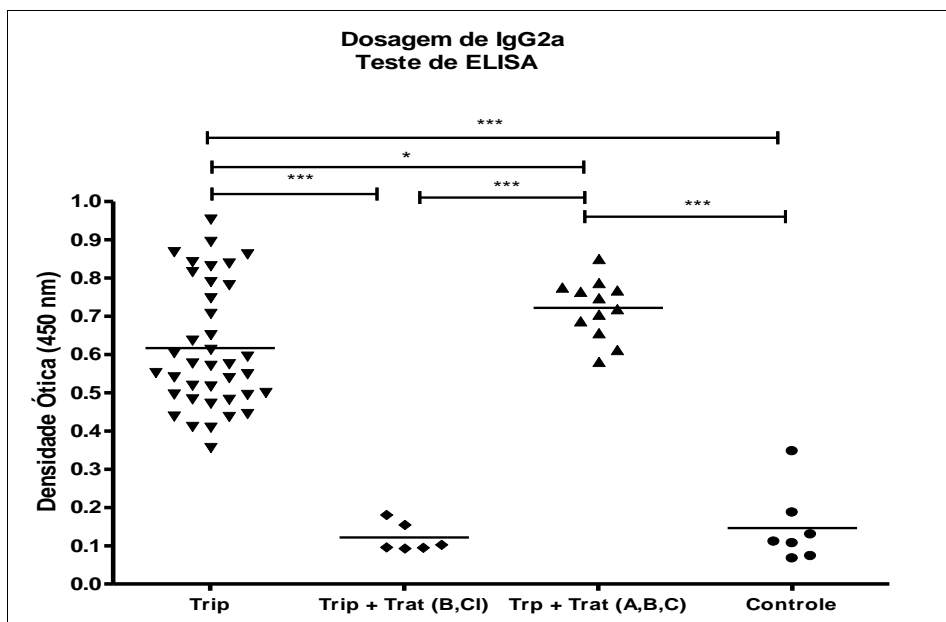


Fig. 20: Dosagem de IgG2a em camundongos triplíce infectados (Col+21SF+Y) com cepas do *T. cruzi* (Trip); tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Trip+Trat (B,Cl)); tratados com Azatioprina Betametasona e Ciclosporina (Trip+Trat (A,B,C)); Controles não infectados; Valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

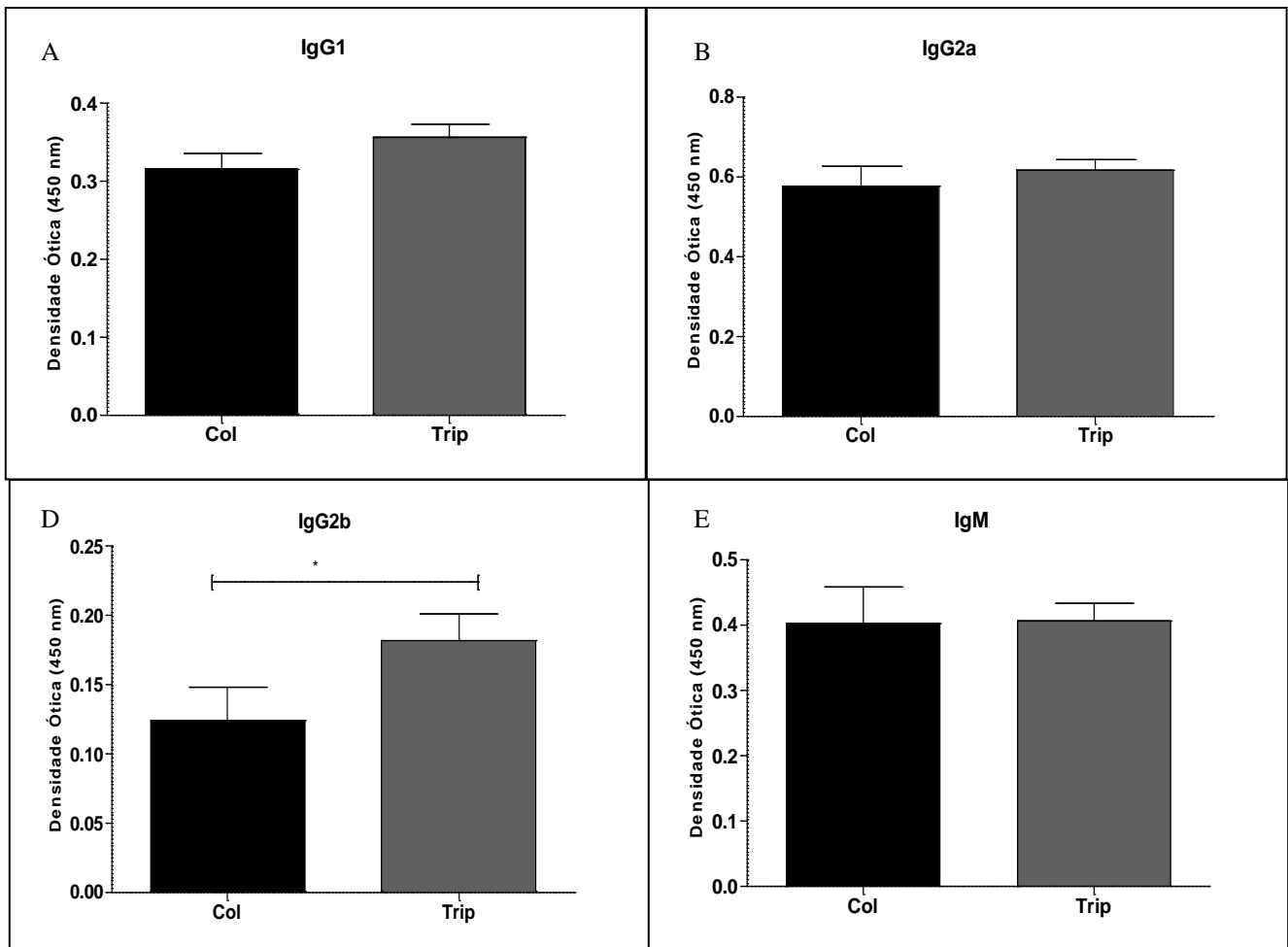


Fig. 23: Estudo comparativo da dosagem de isótipos de imunoglobulinas em camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col) e com triplice infecção (Trip). **A:** IgG1; **B:** IgG2a; **C:** IgG2b; **D:** IgM. Valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$).

5.5 Teste de hipersensibilidade tardia - Teste cutâneo na pata

5.5.1 - Camundongos com infecção única pela cepa Colombiana do *T. cruzi*:

A medição da espessura da pata em camundongos infectados com a cepa Colombiana demonstrou diferença significativa nos pontos de 24h e 48h (Fig. 23).

O grupo de camundongos infectados e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida apresentou um aumento na espessura da pata significativa nos pontos de 24h e 48h (Fig. 24).

Os camundongos infectados e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina, demonstraram um aumento significativo na espessura da pata nos pontos de 24h, 48h e 72h (Fig. 25).

5.5.2 - Camundongos com triplíce infecção com cepas do *T. cruzi* (Col+21SF+Y)

A medição da espessura da pata apresentou diferença significante no ponto de 48h nos grupos de camundongos triplamente infectados não tratados (Fig. 26), camundongos tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Fig. 27) e no grupo de camundongos tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Fig. 28). Além disso, o grupo de camundongos com triplíce infecção e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina demonstraram uma diferença significativa na medição da espessura da pata no ponto de 24h (Fig. 28).

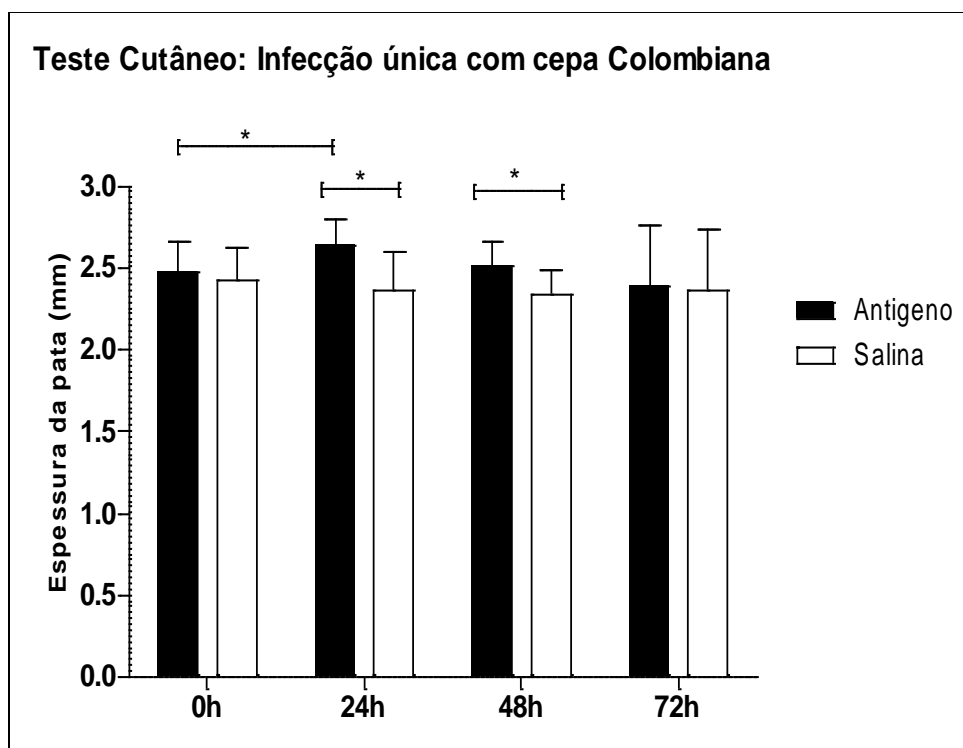


Fig. 24: Medida da espessura da pata (mm) camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* (Col) submetidos a teste de hipersensibilidade tardia. Injeção de antígenos do *T. cruzi* em pata (barra preta) e pata controle com salina injetada (barra branca). Grau de significância com o valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$).

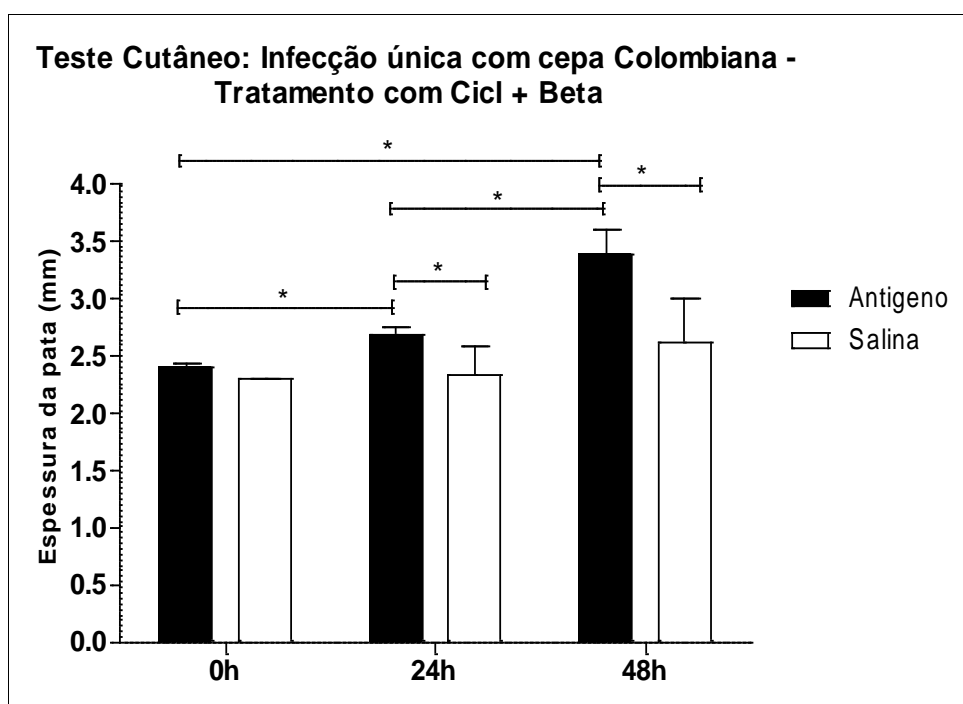


Fig. 25: Medida da espessura da pata (mm) camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Col+Trat (B,Cl)) submetidos a teste de hipersensibilidade tardia. Injeção de antígenos do *T. cruzi* em pata (barra preta) e pata controle com salina injetada (barra branca). Grau de significância com o valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$).

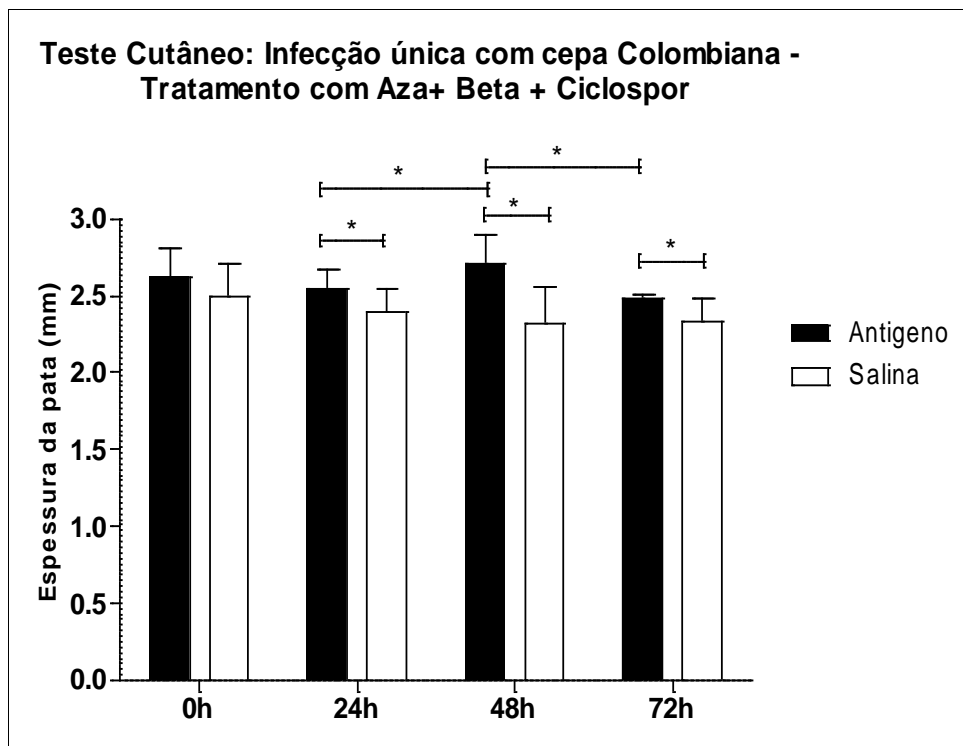


Fig. 26: Medida da espessura da pata (mm) camundongos infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Col+Trat (A,B,C)) submetidos a teste de hipersensibilidade tardia. Injeção de antígenos do *T. cruzi* em pata (barra preta) e pata controle com salina injetada (barra branca). Grau de significância com o valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$).

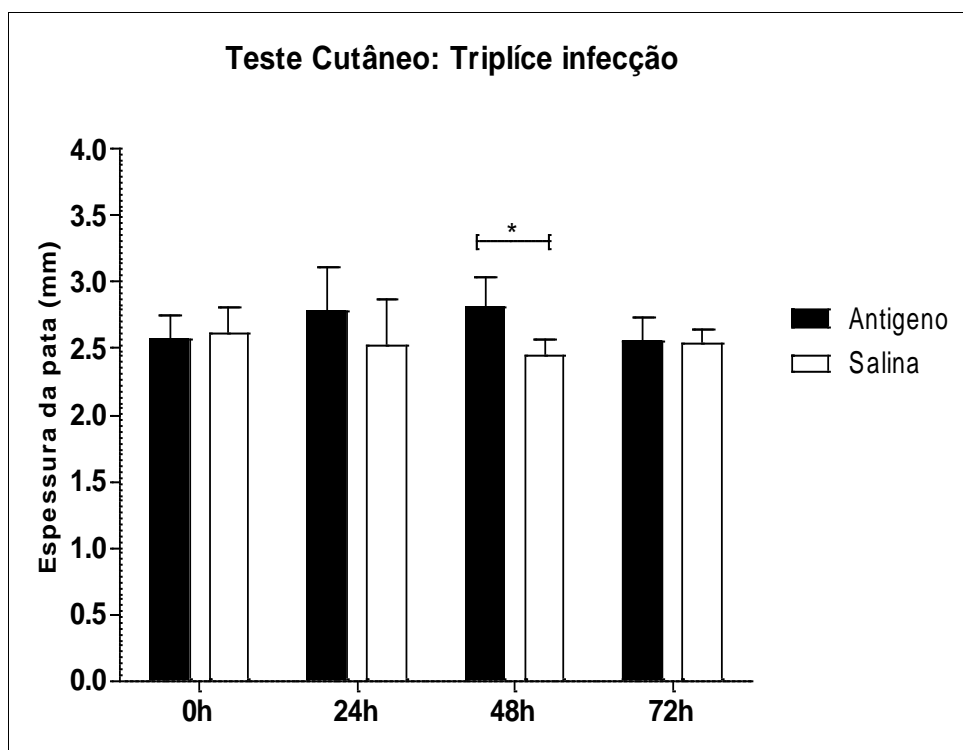


Fig. 27 Medida da espessura da pata (mm) camundongos triplicite infectados (Col+21SF+Y) com cepas do *T. cruzi* (Trip) submetidos a teste de hipersensibilidade tardia. Injeção de antígenos do *T. cruzi* em pata (barra preta) e pata controle com salina injetada (barra branca). Grau de significância com o valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

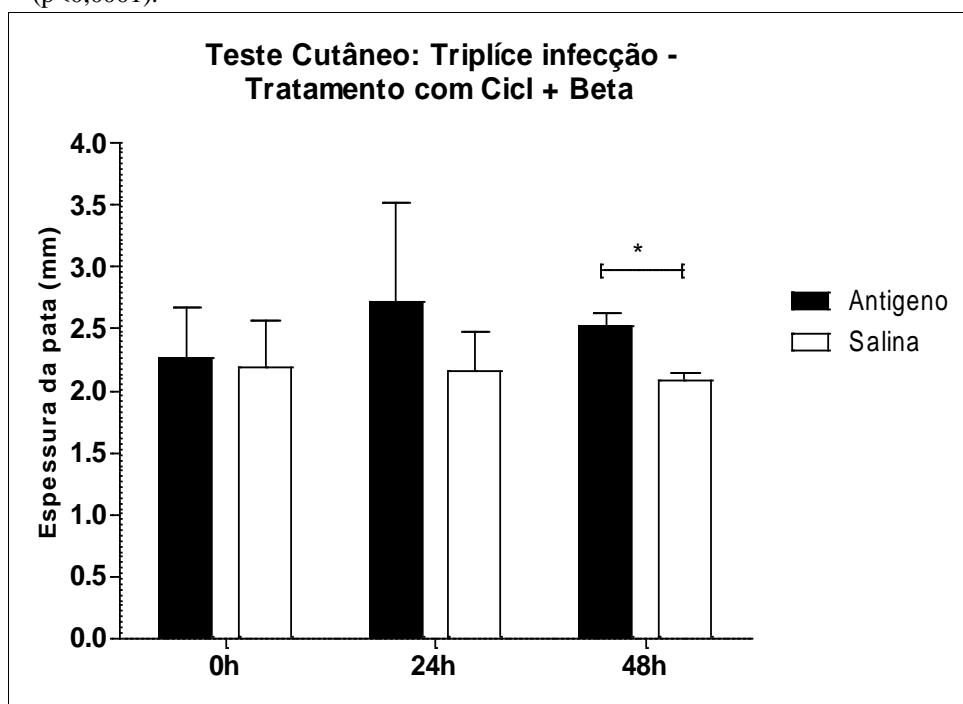


Fig. 28 Medida da espessura da pata (mm) camundongos triplicite infectados (Col+21SF+Y) com cepas do *T. cruzi* e tratados com Betametasona e Ciclofosfamida (Trip+Trat (B,Cl)) submetidos a teste de hipersensibilidade tardia. Injeção de antígenos do *T. cruzi* em pata (barra preta) e pata controle com salina injetada (barra branca). Grau de significância com o valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

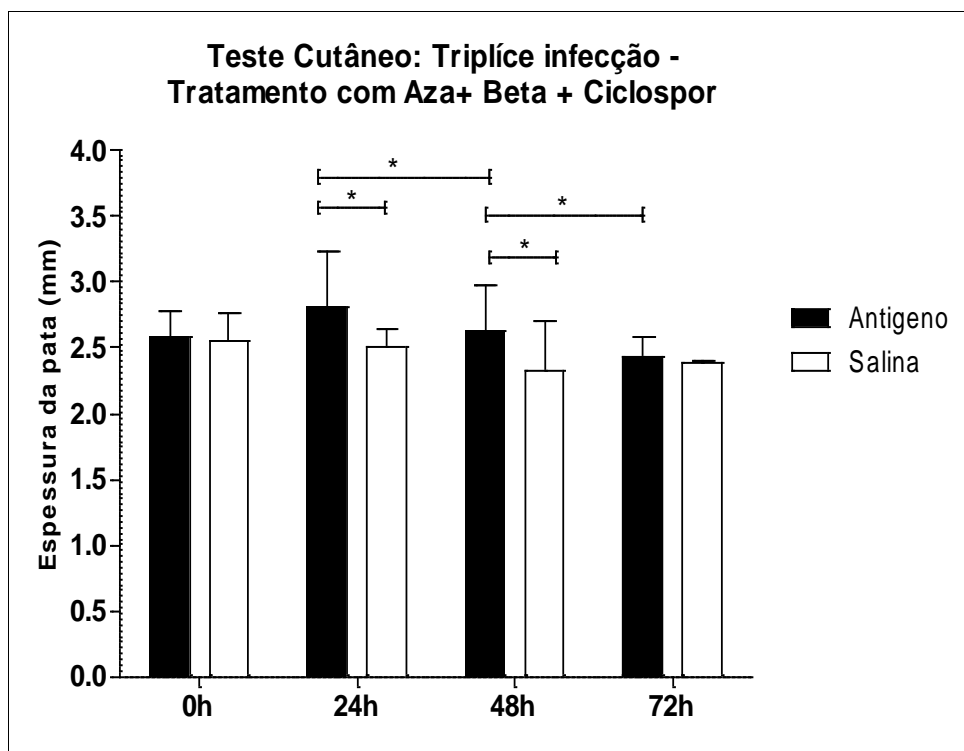


Fig. 29 Medida da espessura da pata (mm) camundongos triplice infectados (Col+21SF+Y) com cepas do *T. cruzi* e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina (Trip+Trat (A,B,C)) submetidos a teste de hipersensibilidade tardia. Injeção de antígenos do *T. cruzi* em pata (barra preta) e pata controle com salina injetada (barra branca). Grau de significância com o valor de $p < 0.05$. Valores de * ($p < 0,05$), ** ($p < 0,001$), *** ($p < 0,0001$).

6. DISCUSSÃO

Nas diferentes abordagens realizadas no presente trabalho, visando analisar múltiplos fatores que podem atuar e modular a resposta do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, a complexidade desta relação ficou bem patente. Para o desenvolvimento do presente estudo foi escolhido o camundongo da linhagem isogênica Balb/c. No estudo das diferentes etapas do trabalho, foram analisadas: 1) as características da infecção única com cepas de três diferentes biotipos no camundongo isogênico da linhagem Balb/c; 2) o papel da triplíce infecção com cepas dos diferentes biotipos na sua capacidade de determinar lesões nos animais infectados, com ênfase na possibilidade de uma potencialização das lesões tissulares; 3) a resposta imunológica humoral e celular nos camundongos dos diferentes grupos; 4) a ação dos imunossupressores no curso da infecção, nos diferentes grupos estudados.

A importância das reinfecções na morbidade da doença de Chagas, já tem sido sugerida por diversos autores, a partir de observações clínicas (MACEDO, 1976; DIAS & SCHOFIELD 1998; COLL-CARDENAS *et al.*, 2004) e experimentais (BUSTAMANTE *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2006). As reinfecções provocadas pelas diferentes exposições ao *T. cruzi*, em áreas endêmicas, têm sido mencionadas como sendo um dos fatores que influenciam na evolução da doença de Chagas e no desenvolvimento de uma miocardite grave (BUSTAMANTE *et al.*, 2002; ANDRADE *et al.*, 2006).

Estudos clínicos de MACEDO (1976) demonstraram que a morbidade da doença de Chagas em áreas de São Felipe onde os *Triatoma infestans* domiciliados foram eliminados foi nitidamente menor do que a observada em pacientes que continuaram a viver em áreas com transmissão ativa da doença. Estudo retrospectivo de DIAS & SCHOFIELD (1998) demonstrou que o controle do *T. infestans* no Brasil levou a um nítido decréscimo das formas graves da doença de Chagas nas áreas endêmicas estudadas.

Em estudos sobre reinfecções, ANDRADE *et al.*, 2006, observaram um agravamento da miocardite crônica em camundongos com triplíce infecção com cepas de três diferentes biotipos, sem exacerbação da parasitemia ou do parasitismo tissular, sugerindo ou uma potencialização do processo inflamatório pelo aumento da carga parasitária, ou a estimulação da resposta imunológica celular nestes animais.

A imunomodulação é um fator de defesa do organismo contra a proliferação do *T. cruzi*. A imunossupressão por fatores como a imunodeficiência adquirida tendo como exemplo a infecção pelo HIV, agente etiológico da AIDS, é capaz de determinar a reagudização da doença de Chagas. Em pacientes com forma crônica da doença de Chagas a infecção pelo HIV, pode determinar a proliferação parasitária, formação de nódulos cutâneos e a presença de lesões do sistema nervoso central com parasitos (FRUMKIN & VICTOROFF, 1990).

No presente estudo, foi demonstrado em camundongos com triplíce infecção e tratados com Ciclofosfamida em altas doses e Betametasona, uma intensificação do parasitismo e um aumento do processo inflamatório mononuclear. Diferentes estudos revelam que o glicocorticoide Betametasona atua na resposta imunológica inibindo a produção de IL-2 atuando sobre a regulação da proliferação de células T *helper* (DAYANES & ARANEO, 1989). Além disso, atua na inibição da secreção de importantes citocinas como IFN γ , IL-4 e IL-5 (BRINKMANN *et al.*, 1995; SNIJDEWINT *et al.*, 1995; FOKKENS *et al.*, 1997).

Em trabalho desenvolvido em cães cronicamente infectados com o *T. cruzi* que estavam na forma indeterminada da doença de Chagas foi observado que o tratamento com Ciclofosfamida em baixas doses, desencadeia o processo de miocardite crônica nestes animais (ANDRADE *et al.*, 1987) sem, entretanto haver uma proliferação parasitária. ANDRADE (1999) sugeriu que a transição da forma indeterminada para a forma crônica cardíaca provavelmente ocorre por interferência nos mecanismos supressores que equilibram o controle imunológico, ou melhor, pela supressão de linfócitos supressores da hipersensibilidade tardia.

A Ciclofosfamida em baixas doses promove uma intensificação da hipersensibilidade tardia aumentando a infiltração de monócitos no local do teste cutâneo (MILON & MARCHAL, 1978). Esse tratamento exacerba as lesões mediadas por células, interferindo na rede imunoregulatória do hospedeiro (ANDRADE *et al.*, 1987; SILVA & ROSSI, 1990). Estudos mais recentes em camundongos sadios tratados com Ciclofosfamida em baixas doses demonstraram uma diminuição não só no número de células Tregs CD4⁺ CD25⁺, como a inibição da sua capacidade de supressão das células sobreviventes (LUTSIK *et al.*, 2004). As células Tregs CD4⁺ CD25⁺ são subpopulações de células T altamente especializadas que exercem uma importante função no controle de respostas autoreativas (BAECKER-ALLAN *et al.*, 2002). Atualmente as células T regulatórias têm sido relacionadas com a inibição da hipersensibilidade tardia em camundongos na infecção crônica pelo *T. cruzi*. Estudos anteriores

em camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* e tratados com Ciclofosfamida em baixas doses mostraram um aumento da hipersensibilidade tardia no período de 24 horas após a injeção intradérmica do antígeno (THÉ, 2006). Esses dados confirmam os nossos achados em relação ao estudo da hipersensibilidade tardia, que mostrou positividade ao teste cutâneo nos camundongos independentemente do número de infecções e nos camundongos tratados com Betametasona e Ciclofosfamida como também nos camundongos tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina.

O efeito do tratamento com Ciclofosfamida em altas doses difere do que tem sido observado com o uso desta droga em baixas doses em camundongos cronicamente infectados

No presente estudo, tratamento realizado com a Ciclofosfamida em altas doses associado à Betametasona determinou uma reativação da fase aguda em camundongos triplíce infectados, através de uma exacerbação da infecção e do parasitismo, com intensificação do processo inflamatório e aumento da parasitemia. Nosso trabalho sugere que células da resposta imunológica que regulam a relação parasito/hospedeiro, foram suprimidas com o tratamento imunossupressor ocasionando uma quebra de tolerância e um aumento significativo dos parasitos e do processo inflamatório.

O tratamento com Ciclofosfamida em altas doses determinou uma reativação da fase aguda da doença de Chagas em grupos de camundongos cronicamente infectados com seis diferentes cepas do *T. cruzi* (PEREIRA *et al.*, 1996). Durante a infecção crônica (BRENER & CHIARI, 1971) a imunossupressão com ciclofosfamida resultou em reativação da infecção, enquanto a administração da azatioprina não afetou o curso da infecção. Estudos também demonstraram que a Ciclosporina não tem influência no curso da infecção, exceto para transformar a parasitemia negativa em um baixo grau de positividade (AMATO NETO *et al.*, 1986). O tratamento combinado com Azatioprina, Ciclosporina e Betametasona em camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi* com diferentes biodemas, não determinou um aumento significativo da parasitemia e da mortalidade. Entretanto, o estudo histopatológico destes animais mostrou uma infiltração mononuclear no miocárdio e músculo esquelético com a presença de plasmócitos (ANDRADE *et al.*, 1997). Esses achados foram confirmados no presente trabalho, referente ao grupo de camundongos tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina e mostrou que não houve uma influencia significativa em relação ao aumento da parasitemia e mortalidade.

Estudos anteriores demonstram a influencia do tratamento com imunossuppressores do tipo Azatioprina e Ciclosporina na resposta celular e humoral. O uso da Azatioprina diminui a proliferação de linfócitos T e reduz a síntese de anticorpos (MASRI, 2003). Além disso, a Ciclosporina influencia na secreção de citocinas, inibindo a expressão da IL-2, IL-4 e INF γ (KAHAN, 1989; FRUMAN *et al.*, 1992), como também inibição de células T CD4 + CD25+ Tregs, no uso desta droga em doses elevadas (KAWAI *et al.*, 2005). Contudo nossos resultados demonstraram que imunossupressão através do uso da Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina determinaram um aumento das lesões imunopatológicas sugestivas de um aumento da reação de hipersensibilidade tardia, tais como: lesões fibrótico–inflamatórias no miocárdio com infiltrados mononucleares e presença de arterite e arteriolite.

A fase crônica da doença de Chagas é caracterizada por uma miocardite crônica difusa progressiva e fibrosante relacionada com o processo de hipersensibilidade tardia, o qual é desencadeado quando os mecanismos regulatórios que mantêm a doença na fase indeterminada são rompidos (ANDRADE, 1999). Os mecanismos responsáveis por esta transição são, entretanto, pouco conhecidos. Na fase crônica da infecção a resposta celular é predominante, envolvendo principalmente os linfócitos T CD4+ e T CD8+, porém os fatores sorológicos também são envolvidos, tendo sido assinalado o papel das imunoglobulinas IgG2a e IgG2b no maior grau de resistência de camundongos à infecção (ANDRADE *et al.*, 1985, BRODSKYN *et al.*, 1989).

Anteriormente já havia sido demonstrado, que a infecção aguda experimental causada pelo parasito ocasiona uma ativação policlonal intensa de linfócitos B, que podem apresentar especificidade para antígenos do *T. cruzi* ou não, com hiperprodução de imunoglobulinas. Essa resposta policlonal é amplamente dependente da atividade de linfócitos TCD4+ auxiliares (MINOPRIO *et al.*, 1989). Estudos experimentais mostraram que a imunossupressão na fase inicial da infecção pelo *T. cruzi* está intimamente associada a uma ativação policlonal de linfócitos, que induz a uma elevada secreção de imunoglobulinas específicas (D' IMPERIO *et al.*, 1985, ANDRADE *et al.*, 1985a). Portanto, a resposta policlonal na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* está associada ao atraso da resposta específica (REINA-SAN-MARTIN *et al.*, 2000). Estudos em camundongos C57BL/6 resistentes à infecção pelo *T. cruzi*, demonstraram que o aumento da resposta parasito-específica foi associado com a diminuição da produção de imunoglobulinas quando comparados a camundongos susceptíveis (BRYAN *et al.*, 2010).

A participação da resposta humoral na infecção por diferentes cepas do *T. cruzi* em camundongos de diferentes linhagens foi motivo de investigação de ANDRADE *et al* (1985b) quando sugeriram a existência de uma correlação entre o grau de resistência de algumas linhagens associado a níveis elevados de IgG2a e IgG2b total, ou ainda a relação de alguns isótipos de imunoglobulinas com diferentes fases da infecção (ANDRADE *et al.*, 1985c)

Por outro lado, tem sido visto que linhagens diferentes de camundongos isogênicos diferem quanto à susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* (ANDRADE *et al.*, 1985b). Estudos experimentais constataram que a infecção pelo *T. cruzi* em camundongos Balb/c induz uma hipergamaglobulinemia, com níveis particularmente altos de IgG2a, IgM e IgE. O predomínio de anticorpos IgG2a é devido às suas concentrações plasmáticas elevadas, em torno de 70% de todos os anticorpos presentes na infecção crônica (EL BOUHDIDI *et al.*, 1994). Esses achados confirmam os resultados encontrados do presente estudo, que demonstraram um padrão de resposta humoral, em camundongos Balb/C infectados pelo *T. cruzi*, em relação ao perfil de imunoglobulinas com níveis elevados de IgG2a. Interessante observar que ANDRADE *et al.* (1985a) observaram que o isotipo IgG2a total revelou-se elevado no soro de camundongos infectados com diferentes cepas do *T. cruzi* coincidindo com o aparecimento e o aumento de intensidade da reação inflamatória nos tecidos, principalmente no miocárdio e no músculo esquelético.

Também foi demonstrado por ANDRADE *et al* (1985b) que diferentes linhagens de camundongos infectados com cepas de diferentes biotemas apresentam uma diminuição precoce de IgG1 e aumento de IgM em todas as linhagens infectadas com qualquer cepa sem entretanto haver correlação direta com a sobrevivência dos animais. E ainda, tentando correlacionar o aumento de isótipos de imunoglobulinas em diferentes fases da infecção. ANDRADE *et al* (1985c) observaram um aumento das frações IgG2a, IgG2b e IgM durante a fase aguda da infecção com queda drástica dos níveis de IgG1.

Posteriormente EL BOUHDIDI *et al* (1994) demonstraram que camundongos infectados pelo *T. cruzi* desenvolvem uma resposta humoral poli isotípica, ou seja, há um aumento na concentração de diferentes classes de anticorpos anti-*T. cruzi* entretanto, com predomínio de alguns isotipos como IgG2a que é o isotipo mais abundante, seguido de IgG1 e de IgM presentes tanto na fase aguda, quanto na fase crônica da infecção.

O aumento da produção das imunoglobulinas observado nos camundongos infectados pelo *T. cruzi* independente do número de infecções e do tipo de cepa, comprova mais uma vez, a hipótese de que existe uma correlação positiva entre os níveis de IgG associados a extensas lesões teciduais (ANDRADE *et al.*, 1985). Estudos indicam que o aumento da IgG2b parasito-específica é associada com um aumento da resistência a infecção pelo *T. cruzi* (BRODSKYN *et al.*, 1989; POWELL *et al.*, 1993). Estes achados confirmam os resultados demonstrados na comparação do aumento da IgG2b em camundongos com triplíce infecção comparada com a infecção única, já que esses camundongos conseguem manter a infecção em equilíbrio, contudo apresentam extensas lesões teciduais.

O tratamento com Betametasona e Ciclofosfamida determinou uma diminuição na produção de todos os isótipos estudados, tanto na infecção única pela cepa Colombiana, como na triplíce infecção. Com exceção do isótipo IgG2b, que não apresentou uma redução estatisticamente significativa em camundongos apenas infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e tratados com esse esquema de tratamento. A secreção de IgG2a é fortemente imunomodulada pela presença da citocina IFN γ , estimulando o perfil de resposta TH1 (MARINHO *et al.*, 2004). Por outro lado, a secreção de IgG1 é regulada pela células Tregs (TILL *et al.*, 2004), que por sua vez são inibidas pela ação da Ciclofosfamida (LUSTSIK *et al.*, 2004).

A capacidade dos anticorpos em conferir proteção ao hospedeiro é segundo TAKEHARA *et al.* (1981), dependente do isótipo de imunoglobulina predominante no curso da infecção; pois os autores consideram que a presença de anticorpos IgG2a e IgG2b anti-*T. cruzi* em animais infectados tem função protetora, pois controlam a diminuição da parasitemia e a mortalidade desses animais. Posteriormente, BRODSKYN *et al.* (1989) demonstraram que existe um importante envolvimento de IgG2a, IgG2b e IgG1 na eliminação de formas do parasita no sangue de camundongos infectados com a cepa Y (Biodema Tipo I) do *T. cruzi*. Contudo o tratamento com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina determinou um aumento na produção de IgG2a e IgM em camundongos com infecção única e com triplíce infecção. Entretanto, foi observada uma diminuição expressiva da produção de IgG2b em camundongos triplamente infectados e tratados com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina.

No presente estudo, a imunossupressão com Betametasona e Ciclofosfamida determinou uma reativação da fase aguda em camundongos, comparável ao visto em pacientes imunossuprimidos, concomitante com uma diminuição significativa das imunoglobulinas do soro,

indicando a importância da resposta humoral no controle da infecção. Por outro lado, nossos resultados sugerem que o tratamento com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina nos camundongos cronicamente infectados determinou uma exacerbação da reação de hipersensibilidade tardia devido ao agravamento das lesões imunopatológicas principalmente no miocárdio.

7. CONCLUSÕES

1. A comparação entre camundongos com infecção única pela cepa Colombiana com camundongos triplíce infectados com cepas do *T. cruzi* de diferentes biotopos, demonstrou níveis mais elevados de IgG2b nos camundongos reinfectedos, porém não houve diferença nas demais imunoglobulinas nem nos níveis de parasitemia e mortalidade entre os dois grupos;

2. Nos camundongos com infecção única pela cepa Colombiana tratados com Betametasona e Ciclofosfamida houve reativação da parasitemia, diminuição do processo inflamatório e presença de parasitos nos tecidos. Houve também uma redução nos níveis de IgG1, IgG2a, IgM e IgG2b e diminuição dos anticorpos específicos anti-*T. cruzi*;

3. Os camundongos com triplíce infecção tratados com Betametasona e Ciclofosfamida mostraram reagudização da infecção, com intensificação do parasitismo tissular, do processo inflamatório com diminuição dos níveis de IgG1, IgG2a, IgM e IgG2b;

4. O tratamento com Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina não determinou aumento significativo da parasitemia e da mortalidade no grupo de camundongos infectados com a cepa Colombiana como também em camundongos triplíce infectados. Contudo, foi observado um aumento nos níveis de IgG2a, diminuição nos níveis de IgG2b e aumento das lesões imunopatológicas características de uma reação de hipersensibilidade tardia;

5. O tratamento com imunossupressores (Betametasona e Ciclofosfamida; Azatioprina, Betametasona e Ciclosporina) em camundongos triplamente infectados determinou uma redução da titulação de anticorpos anti-*T. cruzi* nos dois grupos de tratamento;

6. Nos camundongos não tratados com imunossupressores a infecção crônica pela cepa Colombiana não diferiu na sua evolução da triplíce infecção por três diferentes cepas do *T. cruzi* a não ser nos níveis de IgG2b;

7. Nos camundongos com triplíce infecção, o tratamento com as drogas imunossupressoras determinou diminuição da resposta humoral específica caracterizada por diminuição dos títulos de anticorpos anti- *T. cruzi*. A resposta celular mostrou positividade através do teste cutâneo em todos os grupos experimentais;

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

ALIBERTI, J. C. S; CARDOSO, M. A A G; MARTINS, G. A; GAZZINELLI, R. T; VIEIRA, L. Q; SILVA, J. S. Interleukin-12 mediates resistance of *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect Immun**, 64,1961-1967, 1996.

AMATO NETO, V; MOREIRA, A. A; CAMPOS, R.; DUARTE, M. I; PINTO, P. L; DE SANT'ANA, E. J. Experimental and preliminary observation on the ultimate influence of cyclosporin on chronic infection of mice by *Trypanosoma cruzi*. **Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo**. 41(5), 219-21, 1986.

ANDRADE, S. G; ANDRADE, V; BRODSKYN, C; MAGALHÃES, J. B; NETTO, M. B. Immunological response of Swiss mice to infection with three different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann Trop Med Parasitol**. 79(4), 397-407, 1985bc.

ANDRADE, S. G; CAMPOS, R. F; SOBRAL, K. S; MAGALHÃES, J. B; GUEDES, R. S; GUERREIRO, M. L. Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of different biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. **Rev Soc Bras Med Trop**. 39(1), 1-8, 2006.

ANDRADE, S. G; CARNEIRO FILHO, A; DE SOUZA, A. J; DE LIMA, E. S; ANDRADE, Z. A. Influence of treatment with immunosuppressive drugs in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. **Int J Exp Pathol**. 78(6), 391-9, 1997.

ANDRADE, S. G; CARVALHO, M. L; FIGUEIRA, R. M. Comportamento de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* em hospedeiros com baixa resistência. **Rev Inst Med Trop São Paulo**. 14, 154-161, 1972.

ANDRADE, S. G; CARVALHO, M. L; FIGUEIRA, R. M; ANDRADE, Z. A. Recovery and characterization of trypanosomas inoculated into immune animals (re-inoculation with different strains of *T. cruzi*). **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 12(6), 395-402, 1970.

ANDRADE, S. G; MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: correlations with clinical data and experimental pathology. **Rev Soc Bras Med Trop.** 30(1), 27-35, 1996.

ANDRADE, S. G; MAGALHÃES, LDOS. A; PESSINA, D. H. Importance of TNF-alpha in the course of acute infection with *Trypanosoma cruzi*: influence of its inhibition by pentoxifylline treatment. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 103(1), 21-6, 2008.

ANDRADE, S. G; PIMENTEL, A. R; DE SOUZA, M. M; ANDRADE, Z. A. Interstitial dendritic cells of the heart harbor *Trypanosoma cruzi* antigens in experimentally infected dogs: importance for the pathogenesis of chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg.** 63(1-2), 64-70, 2000.

ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano **Rev. Patol. Trop.** 3, 65-121, 1974.

ANDRADE, V; BARRAL-NETTO, M; ANDRADE, S. G; MAGALHÃES, J. B. Immunological aspects of infection of 6 inbred strains of mice by 3 different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 80(2), 203-11, 1985a.

ANDRADE, V., BARRAL NETO, M., ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Biol. Res.,** 18(4): 499-506, 1985 a.

ANDRADE, V; BRODSKYN, C; ANDRADE, S. G. Correlation between isoenzyme patterns and biological behaviour of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 77(6), 796-9, 1983.

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

ANDRADE, Z. A. Pathogenesis of Chagas' disease. **Res Immunol.** 142(2), 126-9, 1991.

ANDRADE, Z. A; ANDRADE, S. G; SADIGURSKY, M. Damage and healing in the conducting tissue of the heart (an experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*). **J Pathol.** 143(2), 93-101, 1984.

ANDRADE, Z. A; ANDRADE, S. G; SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. **Am J Pathol.** 127(3), 467-73,1987.

ANDREONE, P. A; OLIVARI, M. T; ELICK, B; ARENTZEN, C. E; SIBLEY, R. K; BOLMAN, R. M; SIMMONS, R. L; RING, W. S. Reduction of infectious complications following heart transplantation with triple-drug immunotherapy. **J Heart Transplant.** 5(1), 13-9, 1986.

ANONYMOUS. Recommendations from Satellite Meeting. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 94, 29-432, Suplemento, 1999.

ARNOLD, H; BOURSEAU, F; BROCK, N. Chemotherapeutic action of a cyclic nitrogen mustard phosphamide ester (B 518-ASTA) in experimental tumours of the rat. **Nature.** 29, 181(4613), 931, 1958.

BAECHER-ALLAN, C; VIGLIETTA, V; HAFLER, D. A. Inhibition of human CD4(+)CD25(+high) regulatory T cell function. **J Immunol.** 169(11):6210-7, 2002.

BARRETT, T V; HOFF, R; MOTT, K. E; GUEDES, F; SHERLOCK, I. A. An outbreak of acute Chagas's disease in the São Francisco Valley region of Bahia, Brazil: triatomine vectors and animal reservoirs of *Trypanosoma cruzi*. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 73(6), 703-9, 1979.

BOREL, J. F; KIS, Z. L. The discovery and development of cyclosporine (Sandimmune). **Transplant Proc.** 23(2), 1867-74, 1991.

BOREL, J. F; WIESINGER, D. Studies on the mechanism of action of cyclosporin A [proceedings]. **Br J Pharmacol.** 66(1), 66P-67P, 1979.

BORGES, E. C; PIRES, H. H; BARBOSA, S. E; NUNES, C. M; PEREIRA, M. H; ROMANHA, A. J; DIOTAIUTI, L. Genetic variability in Brazilian triatomines and the risk of domiciliation. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94, Suppl 1:371-3, 1999.

BRENER, Z. Some aspects of acquired immunity in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 9(4), 233-8, 1967.

BRENER, Z. The behavior of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. **Ann Trop Med Parasitol.** 63(2) 215-20, 1969.

BRENER, Z; CHIARI, E. The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas's disease. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 65(5), 629-36, 1971.

BRENER, Z; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **Int Arch Allergy Immunol.** 114(2), 103-10, 1997.

BRINKMANN, V; KRISTOFIC, C. Regulation by corticosteroids of Th1 and Th2 cytokine production in human CD4+ effector T cells generated from CD45RO- and CD45RO+ subsets. **J Immunol.** 155(7), 3322-8, 1995.

BRODSKYN, C. I., BARRAL-NETO, M. Resposta Imune Humana da Doença de Chagas.. In: Z. BRENER, Z. A ANDRADE E M. BARRAL-NETTO, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Ed. , 2^a, Guanabara Koogan S.A., 201-230,2000.

BRODSKYN, C. I; SILVA, A. M; TAKEHARA, H. A; MOTA, I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol Cell Biol.** 67 (Pt 6), 343-8, 1989.

BRYAN, M. A; GUYACH, S. E; NORRIS, K. A. Specific humoral immunity versus polyclonal B cell activation in *Trypanosoma cruzi* infection of susceptible and resistant mice. **PloS Negl Trop Dis.** 6, 4(7), e733, 2010.

BUSTAMANTE, J. M; RIVAROLA, H. W; FERNÁNDEZ, A. R; ENDERS, J. E; FRETES, R; PALMA, J. A; PAGLINI-OLIVA, P. A. *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. **Int J Parasitol.** 15, 32(7), 889-96, 2002.

CALABRESE, K. S. Immunosuppressive drugs as a tool to explore immunopathology in experimental Chagas disease. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 94 Suppl 1, 273-6, 1999.

CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American trypanosomiasis. Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in a slide test. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 8(5), 227-35, 1966.

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

CHRISTENSEN, E; NEUBERGER, J; CROWE, J; ALTMAN, D. G; POPPER, H; PORTMANN, B; DONIACH, D; RANEK, L; TYGSTRUP, N; WILLIAMS, R. Beneficial effect of azathioprine and prediction of prognosis in primary biliary cirrhosis. Final results of an international trial. **Gastroenterology.** 89(5), 1084-91, 1985.

COLL-CÁRDENAS, R; ESPINOZA-GÓMEZ, F; MALDONADO-RODRÍGUEZ, A; REYES-LÓPEZ, P. A; HUERTA-VIERA, M; ROJAS-LARIOS, F. Active transmission of human chagas disease in Colima Mexico. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 99(4), 363-8, 2004.

DAYNES, R. A; ARANEO, B. A. Contrasting effects of glucocorticoids on the capacity of T cells to produce the growth factors interleukin 2 and interleukin 4. **Eur J Immunol**. 19(12), 2319-25, 1989.

DE SILVA, M; HAZLEMAN, B. L. Long-term azathioprine in rheumatoid arthritis: a double-blind study. **Ann Rheum Dis**. 40(6), 560-3, 1981.

DE SOUZA, W. O parasito e sua Interação com os hospedeiros. In: Z. BRENER, Z. A ANDRADE E M. BARRAL-NETTO, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Ed. 2ª, Guanabara Koogan S.A., 88-126,2000.

DEANE, M. P; SOUSA, M. A; PEREIRA, N. M; GONÇALVES, A. M; MOMEN, H; MOREL, C M. *Trypanosoma cruzi*: inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. **J Protozool**. 31(2), 276-80, 1984.

DIAS, E. Os efeitos da superinfecção sobre a evolução da cardiopatia crônica chagásica. **Rev Goiana Med**. 9 (supl), 233-239, 1963.

D' IMPERIO LIMA, M. R; EISEN, H; MINOPRIO, P; JOSKOWICKZ, M; COUTINHO, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas ' disease. **J. Immunol.**, 137, 353-356, 1985.

DIAS, J. C; SCHOFIELD, C. J. The control of the transmission by transfusion of Chagas' disease in the Southern Cone Initiative. **Rev Soc Bras Med Trop**. 31(4), 373-83, 1998.

DIAS, J.C, SILVEIRA, A.C, SCHOFIELD, C.J. The impact of Chagas disease control in Latin-America – A review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz** 97: 603-612, 2002.

DIMITRIU, A; FAUCI, A. S. Activation of human B lymphocytes. XI. Differential effects of azathioprine on B lymphocytes and lymphocyte subpopulations regulating B cell function. **J Immunol**. 121(6), 2335-9, 1978.

DIOTAIUTI, L; PEREIRA, A. S; LOIOLA, C. F; FERNANDES, A. J; SCHOFIELD, J. C; DUJARDIN, J. P; DIAS, J. C; CHIARI, E. Inter-relation of sylvatic and domestic transmission of *Trypanosoma cruzi* in areas with and without domestic vectorial transmission in Minas Gerais, Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 90(4), 443-8, 1995.

DOS REIS, G. Cell-mediated immunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Parasitol Today**. 13, 335-342, 1997.

EL BOUHDIDI, A; TRUYENS, C; RIVERA, M. T; BAZIN, H; CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. **Parasite Immunol**. 16(2), 69-76, 1994.

FERNANDES, O; SANTOS, S; JUNQUEIRA, A; JANSEN, A; CUPOLILLO, E; CAMPBELL, D; ZINGALES, B; COURA, J.R. Populational heterogeneity of Brazilian *Trypanosoma cruzi* isolates revealed by the mini-exon and ribosomal spacers. **Mem Inst Oswaldo Cruz**. 94 Suppl 1, 195-7, 1999.

FERNANDES, O; STURM, N. R; DERRÉ, R; CAMPBELL, D. A. The mini-exon gene: a genetic marker for zymodeme III of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol**. Sep 1, 95(1), 129-33, 1998.

FOKKENS, W. J; GODTHELP, T; HOLM, A. F; BLOM, H; KLEIN-JAN, A. Allergic rhinitis and inflammation: the effect of nasal corticosteroid therapy. **Allergy**. 52(36 Suppl), 29-32, 1997.

FRUMAN, D. A; KLEE, C. B; BIERER, B. E; BURAKOFF, S. J. Calcineurin phosphatase activity in T lymphocytes is inhibited by FK 506 and cyclosporin A. **Proc Natl Acad Sci U S A**. 89(9), 3686-90, 1992.

FRUMKIN, L. R; VICTOROFF, J. I. Chronic factitious disorder with symptoms of AIDS. **Am J Med**. 88(6), 694-6, 1990.

FUJIMURA, A. E; KINOSHITA, S. S; PEREIRA-CHIOCCOLA, V. L; RODRIGUES, M. M. DNA sequences encoding CD4+ and CD8+ T-cell epitopes are important for efficient protective immunity induced by DNA vaccination with a *Trypanosoma cruzi* gene. **Infect Immun**. 69(9), 5477-86, 2001.

GARCIA, E. S; AZAMBUJA, P. Fisiologia de Triatomíneos: Desenvolvimento, Reprodução e Interação com *Trypanosoma cruzi*. In: Z. BRENER, Z. A ANDRADE E M. BARRAL-NETTO, ***Trypanosoma cruzi e doença de Chagas***, Ed. 2000, 2ª, Guanabara Koogan S.A, 201-230,2000.

GOLAN, D. E. *et al*. Princípios de Farmacologia: A Base Fisiopatológica da Farmacoterapia. 2 edição. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.

GRAHAM, R. M. Cyclosporine: mechanisms of action and toxicity. **Cleve Clin J Med**. 61(4), 308-13, 1994.

HIGUCHI, MDE. L; GUTIERREZ, P. S; AIELLO, V. D; PALOMINO, S; BOCCHI, E; KALIL, J; BELLOTTI, G; PILEGGI, F. Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process. **Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol**. 423(3), 157-60, 1993.

HOFT, D. F; SCHNAPP, A. R; EICKHOFF, C. S; ROODMAN, S. T. Involvement of CD4(+) Th1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*. **Infect Immun.** 68(1), 197-204, 2000.

JONES, E. M; COLLEY, D. G; TOSTES, S; LOPES, E. R; VNENCAK-JONES, C. L; MCCURLEY, T. L. Amplification of a *Trypanosoma cruzi* DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **Am J Trop Med Hyg.** 48(3), 348-57, 1993.

KAHAN, B. D. Cyclosporine. **N Engl J Med.** 21, 321(25),1725-38, 1989.

KAWAI, M; KITADE, H; MATHIEU, C; WAER, M; PIRENNE, J. Inhibitory and stimulatory effects of cyclosporine A on the development of regulatory T cells in vivo. **Transplantation.** 79(9), 1073-7, 2005.

KUMAR, R; KLINE, I. K; ABELMANN, W. H. Immunosuppression in experimental acute and subacute Chagasic myocarditis. **Am J Trop Med Hyg.** 19(6), 932-9, 1970.

KUMAR, S; TARLETON, R. L. Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J Immunol.** Apr 1;166(7):4596-603. 2001

LARANJA, F. S. Clinical aspects of Chagas' disease. **Rev Bras Med.** 10(7):482-91, 1953.

LENNARD, L. The clinical pharmacology of 6-mercaptopurine. **Eur J Clin Pharmacol.** 43(4), 329-39, 1992.

LOPES, M. F; DA VEIGA, V. F; SANTOS, A. R; FONSECA, M. E; DOSREIS, G. A. Activation-induced CD4+ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. **J Immunol.** 15, 154(2), 744-52, 1995.

LUMSDEN, W. H. Biological aspects of trypanosomiasis research, 1965; a retrospect, 1969. **Adv Parasitol.** 8, 227-49, 1970.

LUQUETTI, A. O; MILES, M. A; RASSI, A; DE REZENDE, J. M; DE SOUZA, A. A; PÓVOA, M. M; RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in central Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg.** 80(3), 462-70, 1986.

LUTSIK, M. E; SEMNANI, R. T; DE PASCALIS, R; KASHMIRI, S. V; SCHLOM, J; SABZEVARI, H. Inhibition of CD4(+)25+ T regulatory cell function implicated in enhanced immune response by low-dose cyclophosphamide. **Blood.** 105(7), 2862-8, 2004.

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

MACHADO, E. M; FERNANDES, A. J; MURTA, S. M; VITOR, R. W; CAMILO, D. J. JR; PINHEIRO, S. W; LOPES, E. R; ADAD, S. J; ROMANHA, A. J; PINTO DIAS, J. C. A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. **Am J Trop Med Hyg.** 65(6), 958-65, 2001.

MARINHO, C. R; BASTOS, K. R; SARDINHA, L. R; GRISOTTO, M. G; LIMA, M. R; ALVAREZ, J. M. Challenge of *Trypanosoma cruzi* chronically infected mice with trypomastigotes activates the immune system and reduces subpatent parasitemia levels. **J Parasitol.** 90(3), 516-23, 2004.

MARIN-NETO, J. A; SIMÕES, M. V; SARABANDA, A. V L. Forma Crônica Cardíaca. In: Z. BRENER, Z. A ANDRADE E M. BARRAL-NETTO, *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*, Ed. , 2^a, Guanabara Koogan S.A., 266-296,2000.

MASRI, M. A. The mosaic of immunosuppressive drugs. **Molecular Immunology**, 39, 1073–1077, 2003.

MCGEOWN, M. G; DOUGLAS, J. F; DONALDSON, R. A; HILL, C. M; KENNEDY, J. A; LOUGHRIDGE, W. G; MIDDLETON, D. Ten-year results of renal transplantation with azathioprine and prednisolone as only immunosuppression. **Lancet**. 1(8592), 983-5, 1988.

MILES, M. A; CIBULSKIS, R. E. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitol Today**. 2(4), 94-7, 1986.

MILES, M. A; LANHAM, S. M; DE SOUZA, A. A; PÓVOA, M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans R Soc Trop Med Hyg**. 74(2), 221-37, 1980.

MILON, G; MARCHAL, G. Increased infiltration by monocytes in delayed type hypersensitivity site following cyclophosphamide treatment. **Immunology**. 35(6), 989-95, 1978.

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

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

MOREL, C; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Am J Trop Med Hyg**. 29(5 Suppl), 1070-4, 1980.

MURATA, Y; OGAWA, Y; YOSHIDA, S; KUBOTA, K; ITOH, S; FUKUMOTO, M; NISHIOKA, A; MORIKI, T; MAEDA, H; TANAKA, Y. Utility of initial MRI for predicting extent of residual disease after neoadjuvant chemotherapy: analysis of 70 breast cancer patients. **Oncol Rep**. 12(6), 1257-62, 2004.

PEREIRA, M. E; SANTOS, L. M; ARAÚJO, M. S; BRENER, Z. Recrudescence induced by cyclophosphamide of chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice is influenced by the parasite strain. **Mem Inst Oswaldo Cruz.** 91(1), 71-4, 1996.

POWELL, M. R; WASSOM, D. L. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. I. Antibody isotype profiles. **Parasite Immunol.** 15(4), 215-21, 1993.

RASSI, A. JR; RASSI, A; LITTLE, W. C. Chagas' heart disease. **Clin Cardiol.** 23(12), 883, 2000.

REED, S. G. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. **Chem Immunol.** 70, 124-43, 1998.

REINA-SAN-MARTIN, B; COSSON, A; MINOPRIO, P. Lymphocyte polyclonal activation: a pitfall for vaccine design against infectious agents. **Parasitol Today.** 16(2), 62-7, 2000.

REIS, D. D; JONES, E. M; TOSTES, S. JR; LOPES, E. R; GAZZINELLI, G; COLLEY, D. G; MCCURLEY, T. L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. **Am J Trop Med Hyg.** 48(5), 637-44, 1993.

REVELLI, S; BERRA, H; VALENTI, J; MORENO, H; BERNASCONI, M; POLI, H; MORINI, J. Effect of reinfection on the development of rats infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo.** 32(4), 260-8, 1990.

REY, L. *Trypanosoma cruzi* e Doença de Chagas: o parasito. In. **Parasitologia.** Rio de Janeiro. Editora Guanabara Koogan, 138p, 2002.

ROCHA, A; DE MENESES, A. C; DA SILVA, A. M; FERREIRA, M. S; NISHIOKA, S. A; BURGARELLI, M. K; ALMEIDA, E; TURCATO JÚNIOR, G; METZE, K; LOPES, E. R. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. **Am J Trop Med Hyg.** 50(3), 261-8, 1994.

ROMANHA, A. J. Heterogeneidade isoenzimática em *Trypanosoma cruzi*. Tese de Doutorado – UFMG, Belo Horizonte, 1982.

SADIGURSKY, M; ACOSTA, A. M; SANTOS-BUCH, C. A. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a *Trypanosoma cruzi* clone. **Am J Trop Med Hyg.** 31(5), 934-41, 1982.

SCHUT, N. H; HARDEMAN, M. R; WILMINK, J. M. Decrease of erythrocyte deformability in cyclosporine-treated renal transplant patients: correction with fish oil as well as corn oil. **Transpl Int.** Suppl 1, S536-8, 1992.

SILVA, J. S; ROSSI, M. A. Intensification of acute *Trypanosoma cruzi* myocarditis in BALB/c mice pretreated with low doses of cyclophosphamide or gamma irradiation. **J Exp Pathol (Oxford).** 71(1), 33-9, 1990.

SNIJDEWINT, F. G; KAPSENBERG, M. L; WAUBEN-PENRIS, P. J; BOS, J. D. Corticosteroids class-dependently inhibit in vitro Th1- and Th2-type cytokine production. **Immunopharmacology.** 29(2), 93-101, 1995.

SOUTO, R. P; FERNANDES, O; MACEDO, A. M; CAMPBELL, D. A; ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. **Mol Biochem Parasitol.** 83(2), 141-52, 1996.

STITES, D. P; TERR, A. I; PARSLow, T. G. **Imunologia Médica.** Editora Guanabara Koogan, 9ª edição, 2000.

STOLF, N. A; HIGUSHI, L; BOCCHI, E; BELLOTTI, G; AULER, J. O; UIP, D; AMATO NETO, V; PILEGGI, F; JATENE, A. D. Heart transplantation in patients with Chagas' disease cardiomyopathy. **J Heart Transplant.** 6(5), 307-12, 1987.

SUN, J; TARLETON, R. L. Predominance of CD8+ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. **Am J Trop Med Hyg.** 48(2), 161-9, 1993.

TAKEHARA, H. A; PERINI, A; DA SILVA, M. H; MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp Parasitol.** 52(1), 137-46, 1981.

TARLETON, R. L.; GRUSBY, M. J; POSTAN, M; GLIMCHER, L. H. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: further evidence for the role of both class I- and class II-restricted T cells in immune resistance and disease. **Int Immunol.** 8(1), 13-22, 1996.

TARLETON, R. L.; SUN, J; ZHANG, L; POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. **Infect Immun.** 62(5), 1820-9, 1994.

THÉ, T. S. **Estudo da hipersensibilidade tardia na infecção murina experimental pelo *Trypanosoma cruzi*: Efeito da ciclofosfamida em baixas doses na exacerbação das lesões.** Dissertação de Mestrado, UFBA, Salvador – Bahia, 2006.

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

TIEDE, I., et al. CD28-dependent Rac1 activation is the molecular target of azathioprine in primary human CD4+ T lymphocytes. **J Clin Invest.** 111(8), 1133-45, 2003.

TILL, S. J; FRANCIS, J. N; NOURI-ARIA, K; DURHAM, S. R. Mechanisms of immunotherapy. **J Allergy Clin Immunol.** 113(6), 1025-34, 2004.

WARREN, L. G. Metabolism of *Schizotrypanum cruzi* Chagas. I. Effect of culture age and substrate concentration on respiratory rate. **J Parasitol.** 46, 529-39, 1960.

WHO Expert Committee. Control of Chagas disease. **World Health Organ Tech Rep Ser.** 905:i-vi, 1-109, 2002.

WIZEL, B; GARG, N; TARLETON, R. L. Vaccination with trypomastigote surface antigen 1-encoding plasmid DNA confers protection against lethal *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect Immun.** 66(11), 5073-81, 1998.

ZINGALES, B; SOUTO, R. P; MANGIA, R. H; LISBOA, C. V; CAMPBELL, D. A; COURA, J. R; JANSEN, A; FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. **Int J Parasitol.** 28(1), 105-12, 1998.