

**Universidade Federal de Ouro Preto – UFOP
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas – NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas**

Influência da reinfecção com diferentes clones do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental em camundongos

Bruna Estefânia Diniz Frias

Ouro Preto - 2013

Bruna Estefânia Diniz Frias

Influência da reinfecção com diferentes clones do *Trypanosoma cruzi* na doença de Chagas experimental em camundongos

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Ouro Preto, como parte integrante dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Ciências Biológicas, área de concentração Imunobiologia de Protozoários.

Orientador: Evandro Marques de Menezes Machado

Co-orientadora: Paula Melo de Abreu Vieira

Ouro Preto

F897iFrias, Bruna Estefânia Diniz

Influência da reinfecção com diferentes clones do *Trypanosoma cruzi* doença de Chagas experimental em camundongos [manuscrito] / Bruna Estefânia Diniz Frias-2013.

xii, 63 f.: il. color.; graf.; tabs.

Orientador: Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado.

Co-orientadora: Prof^aDr^a Paula Melo de Abreu Vieira.

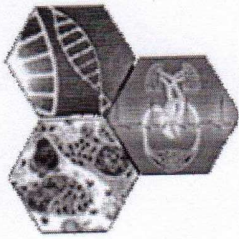
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Ouro Preto. Instituto de Ciências Exatas e Biológicas. Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas.

Área de concentração: Imunobiologia de Protozoários.

1. Chagas, Doença de - Teses. 2. Infecção - Teses. 3. Diversidade genética - Teses. 4. *Trypanosoma cruzi* - Teses. I. Machado, Evandro Marques de Menezes. II. Vieira, Paula Melo de Abreu. III. Universidade Federal de Ouro Preto. IV. Título.

CDU: 577.27:616.937

Catálogo: sisbin@sisbin.ufop.br



Universidade Federal de Ouro Preto
Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas - NUPEB
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas



Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

“Influência da reinfecção com diferentes clones do *Trypanosoma cruzi* na Doença de Chagas Experimental em camundongos”

Aos nove dias do mês de Maio de 2013, às 09:00, na Sala Multimídia do ICEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação da aluna **Bruna Estefânia Diniz Frias**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pela candidata e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por **APROVAR**..... a candidata. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Evandro Marques

Prof. Dr. Evandro Marques de Menezes Machado
Presidente

Simone Aparecida Rezende

Prof.^a Dr.^a Simone Aparecida Rezende
Examinadora (CIPHARMA)

Wanderson Geraldo de Lima

Prof. Dr. Wanderson Geraldo de Lima
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: 09/05/2013

“A persistência é o melhor caminho para o êxito.”

Charles Chaplin

Dedico este trabalho aos meus pais
Jaime e Luzia, exemplos de força e
determinação. AMO VOCÊS!!!

A Deus por me permitir chegar até aqui e por colocar tantas pessoas especiais na minha vida.

Aos meus pais, Jaime e Luzia, pela confiança e pelo apoio e amor incondicionais.

Ao meu irmão Vinícius, por me fazer rir até mesmo quando queria chorar.

Aos padrinhos, Rosa e Valter, por sempre ajudarem a transformar meus sonhos em realidade.

Ao professor Evandro, pela oportunidade e orientação.

À Paula Melo pela co-orientação e por ter me “adotado” em um momento tão conturbado. Você foi um anjo!

À professora Marta de Lana pelos ensinamentos e por ter me acolhido em seu laboratório.

À professora Cláudia Carneiro pelas valiosas contribuições e pelo apoio ao projeto desenvolvido.

Ao pessoal do LIMP pelas contribuições na execução do trabalho.

Aos professores Maria Terezinha Bahia e André Talvani pela boa convivência e disponibilidade.

A todos os amigos do Laboratório de Doença de Chagas por terem me acolhido e me ajudado sempre quando precisei. Em especial a Jack, Auffy e Maykon.

À Aninha e Lud pelo apoio técnico e por serem sempre tão agradáveis.

À Cida, Gabriel e Suzana, secretários do NUPEB, por sempre estarem dispostos a ajudar.

Às amadinhas, Jam, Gau e Flá, pelo companheirismo, amizade, gordices, rocks e horas de conversas “jogadas fora”.

Ao “expertise” Levis, pela amizade e disponibilidade em me ajudar sempre com MUITO bom humor, rs.

Aos amigos Cyntia, Zorel, Maurício, Diogo e Rafa pelas comilanças de fim de semana onde risadas eram garantidas.

À Dani por ter me aturado por mais esses dois anos (sei que não foi fácil, rs). É sempre bom ter você ao meu lado amiga!

À brodinha (Carol) que mesmo longe, sempre esteve presente em minha vida.

À toda minha família pelo apoio.

Aos amigos de Arcos por compreenderem minha ausência em tantos momentos importantes.

A todos que de alguma forma me apoiaram na realização deste sonho e que não me deixaram desistir nem nos momentos mais difíceis...

Muito Obrigada!!!

Figura 1: Delineamento Experimental dos grupos infectados/reinfectados pelos clones P209 e IVV do <i>T. cruzi</i>	20
Figura 2: Cronograma de inoculações	20
Figura 3: Curvas de parasitemia dos grupos AP1 e RE1.	27
Figura 4: Curvas de parasitemia dos grupos AP2 e RE2..	28
Figura 5: Taxa de mortalidade de camundongos Swiss infectados/reinfectados com os diferentes clones do <i>T. cruzi</i>	29
Figura 6: Percentual médio de células NK (CD49b ⁺) e Mac-3 ⁺ (Monócitos) no sangue periférico dos camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do <i>T. cruzi</i> 155 após o primeiro inóculo	30
Figura 7: Percentual médio de células CD4 ⁺ (Linfócitos TCD4 ⁺) e CD8 ⁺ (Linfócitos TCD8 ⁺) no sangue periférico dos camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do <i>T. cruzi</i> 155 após o primeiro inóculo.....	31
Figura 8: Quantificação de células presentes no músculo cardíaco de camundongos inoculados com diferentes clones do <i>T. cruzi</i> avaliados na fase crônica da infecção.	32
Figura 9: Quantificação de células presentes no músculo esquelético de camundongos inoculados com diferentes clones do <i>T. cruzi</i> avaliados na fase crônica da infecção	33
Figura 10: Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do <i>Trypanosoma cruzi</i>	34
Figura 11: Fotomicrografias de cortes histológicos do músculo esquelético de camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do <i>Trypanosoma cruzi</i>	35
Figura 12: Quantificação da fibrose no músculo cardíaco de camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do <i>T. cruzi</i>	36

Figura 13: Quantificação da fibrose no músculo esquelético de camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do *T. cruzi*..... 37

Figura 14: Fotomicrografias ilustrativas de cortes histológicos do coração de camundongos *Swiss* infectados/reinfectados por diferentes clones do *T. cruzi* 38

Figura 15: Fotomicrografias ilustrativas de cortes histológicos do músculo esquelético de camundongos *Swiss* infectados/reinfectados por diferentes clones do *T. cruzi*.....39

Figura 16: Correlação entre a porcentagem de células TCD8⁺ e a inflamação nos animais do grupo RE2 40

Tabela 1: Sequência de inoculações dos diferentes clones do *Trypanosoma cruzi*..... 20

Tabela 2: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares. 22

CCA	Centro de Ciência Animal
CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
COBEA	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
DCH	Doença de Chagas Humana
DTU	<i>Discrete Typing Units</i>
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
IFN-γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IL – 4	Interleucina 4
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
iNOS	Óxido Nítrico Sintase induzível
kDNA	<i>Kinetoplast DNA (DNA do cinetoplasto)</i>
M1	Macrófago tipo 1 ou macrófago inflamatório
M2	Macrófago tipo 2 ou macrófago alternativo
NK	Células <i>Natural Killer</i>
NO	Óxido Nítrico
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
Th1	Linfócito T <i>helper 1</i>
Th2	Linfócito T <i>helper 2</i>
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral-alfa

A diversidade e severidade dos sintomas observados na doença de Chagas estão relacionados a inúmeros fatores, dentre eles: cepa do parasito, imunidade do hospedeiro, tempo de infecção e reinfecções. Considerando que a reinfecção está presente no ciclo natural da doença de Chagas e que a diversidade genética de populações do *Trypanosoma cruzi* apresenta influência no desenvolvimento da infecção, o objetivo do presente trabalho foi avaliar a influência de reinfecções por dois clones em camundongos experimentalmente infectados e/ou reinfectedados, por meio de análises parasitológicas, fenotipagem de células mononucleares do sangue periférico e histopatologia dos músculos cardíaco e esquelético. Os animais foram agrupados conforme as características a seguir: 1) não infectados (NI); 2) infectados pelo clone P209 (AP1); 3) infectados pelo clone IVV (AP2); 4) primoinfectados pelo clone P209 e posteriormente reinfectedados (RE1); 5) primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente reinfectedados (RE2). O nível de parasitemia foi estimado diariamente e 155 dias após o inóculo inicial os animais foram eutanasiados. Foi observada mortalidade apenas entre os animais primoinfectados com o clone P209 (AP1 e RE1). Houve prolongamento da parasitemia entre os animais reinfectedados, não sendo os níveis parasitêmicos característicos da fase aguda, sugerindo o desenvolvimento de uma resistência após a primoinfecção. A imunofenotipagem do sangue periférico mostrou aumento no percentual de monócitos entre os animais primoinfectados com o clone P209 (AP1 e RE1) e redução no percentual de linfócitos TCD4⁺ entre os primoinfectados com o IVV (AP2 e RE2). Animais dos grupos primoinfectados pelo clone IVV (AP2 e RE2), apresentaram infiltrado inflamatório (músculos cardíaco e esquelético), em comparação com o grupo controle (NI), o que pode estar relacionado ao recrutamento dos linfócitos TCD4⁺ para o foco inflamatório. Os camundongos do grupo RE2 também apresentaram maior deposição de colágeno em ambos os tecidos, processo que indica a reparação do tecido lesionado pela inflamação. Em conjunto estes dados sugerem que a sequência de inoculações, bem como a genética do parasito, possuem grande importância, influenciando diretamente o curso da infecção.

The diversity and severity of symptoms observed in Chagas disease are related to different factors, including: parasite strain, host immunity, time of infection and reinfections. Considering the role of reinfection and genetic diversity of populations of *Trypanosoma cruzi* as factors that influence the disease development, the aim of this study was to evaluate the influence of reinfections by two clones of *T. cruzi* (P209 and IVV) in experimentally infected/reinfected mice through parasitological, phenotyping of peripheral blood mononuclear cells and histopathology of cardiac and skeletal muscles. The animals were grouped in five groups: 1) uninfected (NI), 2) infected with P209 (AP1), 3) infected with IVV (AP2), 4) primoinfected by P209 and subsequently reinfected (RE1), 5) primoinfected by IVV and then reinfected (RE2). The level of parasitemia was evaluated daily and after 155 days after first inoculum the animals were euthanized. Mortality occurred only among animals primoinfected with P209 (AP1 and RE1). There was a prolongation of parasitemia among reinfected animals, being the parasitemia levels smaller than the acute stage levels, suggesting the development of resistance after the first infection. Immunophenotyping of peripheral blood showed an increase in the percentage of monocytes among animals primoinfected with P209 (AP1 and RE1) and reduction in the percentage of CD4⁺ T cells among primoinfected with IVV (AP2 and RE2). Animal groups primoinfected by IVV (AP2 and RE2), presented inflammatory infiltrate (cardiac and skeletal muscles) compared with the control group (NI), which may be related to the recruitment of CD4⁺ T cells to the inflammatory site. The mice RE2 group also presented collagen deposition in both tissues, a process that indicates the repair of injured tissue by inflammation. Based on these data we suggest that the sequence of inoculations as well as the genetic of parasite have great importance directly influence the course of infection.

1 - INTRODUÇÃO	1
1.1 - A doença de Chagas	2
1.2 - Controle da doença de Chagas	4
1.3 - O <i>Trypanosoma cruzi</i>	5
1.4 - Variabilidade genética do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.5 - Imunopatologia da doença de Chagas.....	9
1.6 - Papel das reinfecções na doença de Chagas.....	12
2 - JUSTIFICATIVA.....	14
3 - OBJETIVOS	16
2.1 - Objetivo geral	17
2.2 - Objetivos específicos	17
3 - MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1 - Animais	19
3.2 - Clones do <i>Trypanosoma cruzi</i>	19
3.3 - Infecção dos animais	19
3.4 - Taxa de mortalidade	21
3.5 - Exames parasitológicos	21
3.6 - Imunofenotipagem do sangue periférico	21
3.7 - Análises histológicas.....	23
3.7.1 - Coloração de H&E	23
3.7.2 - Coloração de Tricômico de Masson.....	23
3.7.3 - Morfometria.....	24
3.8 - Análises estatísticas.....	24
4 - RESULTADOS.....	25
4.1 - Curvas de Parasitemia.....	26
4.2 – Taxa de mortalidade	29
4.3 - Imunofenotipagem do sangue periférico.....	30
4.3.1 - Células NK e monócitos/macrófagos	30

4.3.2 - Células CD4 ⁺ e CD8 ⁺	29
4.4 - Alterações Histopatológicas no músculo cardíaco e músculo esquelético.....	31
4.4.1 - Quantificação do processo inflamatório	31
4.4.2 - Determinação da fibrose.....	36
4.5 - Correlação entre células TCD8 ⁺ e a inflamação.....	40
5 - DISCUSSÃO	41
6 - CONCLUSÕES	50
7 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52

1 - INTRODUÇÃO

1.1 - A doença de Chagas

O *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909), protozoário hemoflagelado pertencente à família Trypanosomatidae, é o agente causador da doença de Chagas, uma das doenças parasitárias de maior impacto social e econômico na América Latina, sendo considerada a sexta doença negligenciável mais importante do mundo (Dias e Schofield, 1999; Prata, 2001). Nas últimas décadas, tem-se observado a ocorrência dessa parasitose em países como Estados Unidos, Canadá, alguns países do Pacífico Ocidental, entre outros. Tal fato se deve ao processo migratório de latino-americanos para esses países, aliado à falta de controle de bancos de sangue e de transplante de órgãos nos mesmos (Castro *et al.*, 2009, WHO, 2010).

Originalmente de natureza enzoótica, a doença de Chagas passou à condição de antropozoonose, a partir de intervenções humanas no ambiente silvestre, alterando o ambiente natural de circulação do *T.cruzi* (Dias, 2000; Coura *et al.*, 2007).

O mecanismo de transmissão deste protozoário aos humanos está relacionado com o hábito de vida dos insetos vetores, hemípteros da subfamília Triatominae, cuja existência em ecótopos artificiais expõe os humanos e os animais domésticos ao contato com as fezes/urina, possivelmente infectadas pelo *T. cruzi*. A via clássica de transmissão, responsável pela manutenção da endemia é a vetorial, em especial nas regiões mais pobres e/ou desprovidas de programa profilático da doença de Chagas Humana (Dias, 1979).

Quando descoberta, a doença de Chagas era predominantemente rural e diretamente relacionada ao subdesenvolvimento social e econômico. No entanto, o êxodo rural transformou o padrão epidemiológico da doença (Freitas *et al.*, 1952), fazendo com que ela se tornasse um problema de saúde em áreas urbanas. Os eventos migratórios também contribuíram para dispersão da doença para áreas não endêmicas (em todos os continentes). Nestes locais, esta enfermidade passou a ser transmitida verticalmente, por transfusão sanguínea ou por transplantes de órgãos (Dias, 1992; Prata, 2001; Dias e Neto, 2011). Desta forma, muitas iniciativas têm sido tomadas a fim de controlar a

transmissão da Doença de Chagas em seus países endêmicos, inclusive no Brasil (Schofield e Dias, 1991). Este controle pôde ser alcançado a partir do desenvolvimento social e melhoria das condições de vida das populações dos países afetados pela doença.

Em sua história natural, a infecção pelo *T.cruzi* caracteriza-se por duas fases distintas e sucessivas, havendo a possibilidade de manifestação de diferentes formas clínicas. A fase inicial ou aguda é caracterizada pela presença de numerosos parasitos circulantes no sangue periférico (forma tripomastigota), facilmente visualizados pelo exame de sangue a fresco (Franco *et al.*, 2003). Geralmente assintomática, nesta fase podem ocorrer manifestações clínicas como sinais de porta de entrada (sinal de Romaña e chagoma de inoculação), adenopatia generalizada, febre e hepatoesplenomegalia (Prata, 2001). Miocardite severa e meningoencefalites podem ser observadas, geralmente, entre crianças menores de dois anos, podendo, em 5 a 10% dos casos não tratados, provocar a morte do indivíduo (Zhang e Tarleton, 1999).

Indivíduos que sobrevivem à fase aguda podem evoluir para a fase crônica, sendo que a maioria (50 a 70%) não apresenta manifestações clínicas da infecção, permanecendo por longos períodos ou até mesmo por toda a vida nesta forma da doença. Nestes casos a forma clínica em questão é denominada forma indeterminada. Pacientes nestas condições apresentam sorologia positiva, podendo ainda, apresentar testes laboratoriais parasitológicos também positivos (Dias, 1992; WHO, 2007).

Em outros indivíduos, a evolução da infecção pode evoluir para formas sintomáticas, caracterizadas pelo comprometimento funcional principalmente do coração, do esôfago e do intestino, ou mesmo a combinação de alterações em um ou mais desses órgãos, resultando nas três principais formas clínicas: cardíaca, digestiva e mista (Moncayo, 2003).

1.2 - Controle da doença de Chagas

As iniciativas de controle da doença de Chagas nos países do cone Sul (Brasil, Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai e Uruguai) em 1991, países Andinos (Colômbia, Equador, Peru e Venezuela) em 1997, América Central e no México em 1998 e na Amazônia em 2004, foram de grande importância para o controle da enfermidade em alguns países latino-americanos. Estas medidas visavam à interrupção do ciclo domiciliar pela eliminação dos vetores domésticos, principalmente o *Triatoma infestans*, redução e eliminação da transmissão por transfusão sanguínea através do controle em bancos de sangue e tratamento específico de recém-nascidos, crianças e casos agudos da doença (Dias *et al.*, 2002). A partir destes programas alguns países como Uruguai, Chile e Brasil conseguiram eliminar o *T. infestans*, e Paraguai e Argentina caminham para alcançar tal objetivo. Nestes países observou-se uma diminuição no número de gestantes e doadores de sangue infectados, o que conseqüentemente diminuiu os riscos de transmissão transfusional e congênita. No entanto, na Bolívia, México, países Andinos e na região amazônica estas medidas de controle ainda são bastante limitadas e precisam de maiores impulsos (Coura e Borges-Pereira, 2010).

Embora tenha ocorrido notável decréscimo no número de novos casos da doença de Chagas após a implantação destas medidas de controle (Schofield e Dias, 1999; Moncayo, 2006; Dias, 2007), estima-se que cerca de 10 milhões de pessoas em todo o mundo estejam infectadas pelo *T. cruzi*, principalmente nas áreas endêmicas de 21 países da América Latina (WHO, 2010). No entanto, muitos destes países não possuem conhecimento da extensão da doença em seus territórios, não aderindo aos programas de controle (Dias, 2000). Além do mais, os triatomíneos que habitam o peridomicílio são uma ameaça constante pois, com o “vazio ecológico” determinado pela eliminação das espécies domiciliadas, outras espécies consideradas de importância “secundária” vêm ocupando e colonizando o interior das residências (Silveira, 1992). Desta forma, é importante dar continuidade aos programas de controle a fim de evitar o surgimento de novos casos da doença de Chagas.

1.3 - O *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário hemoflagelado pertencente à classe Kinetoplastida e a família Trypanosomatidae, cujos membros apresentam uma organela autoreplicável que contém DNA – o cinetoplasto. Este parasito é digenético, ou seja, seu ciclo de vida consiste em passagens obrigatórias por dois hospedeiros distintos (Brener, 1992).

Este protozoário pode ser encontrado no trato digestório de aproximadamente 140 espécies de triatomíneos, insetos de hábito exclusivamente hematófago. No entanto, apenas algumas espécies são consideradas competentes na transmissão do *T. cruzi* (Schofield e Galvão, 2009).

O ciclo evolutivo do *T. cruzi* envolve formas morfolologicamente diferenciadas com capacidade multiplicativa e infectante. A morfogênese do *T. cruzi* no microambiente de seus vetores envolve transformações a partir da forma tripomastigota sanguínea, ingerida durante o repasto em hospedeiros vertebrados infectados, que no estômago se diferencia na forma epimastigota poucas horas após a infecção, as quais, após divisões binárias sucessivas e posterior metacicloogênese na região final do trato digestório, diferenciam-se em formas tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante para o hospedeiro vertebrado (Dias, 1934; Brener, 1972; Alvarenga e Brener, 1978; Schaub, 1989). Considerando a via de transmissão vetorial, formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes e na urina do inseto, durante ou após o repasto sanguíneo, podem penetrar através de mucosas ou de lesões epiteliais, visto que este parasito não é capaz de penetrar a pele intacta do hospedeiro. Estas lesões podem ocorrer pela própria picada do triatomíneo ou podem ser ocasionadas pelo hospedeiro (Soares e Marsden, 1986). Após a penetração, o parasito poderá invadir diferentes células, onde ocorre a diferenciação na forma amastigota, que irá se replicar formando ninhos, originando as formas tripomastigotas sanguíneas que serão liberadas no meio extracelular através da ruptura da célula parasitada. O vetor se infecta ao realizar o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado, dando continuidade

ao ciclo de vida do protozoário (Brenner e Andrade, 1979; Kollien e Schaub, 2000).

Todas as formas do *T. cruzi* que originam do vetor podem interagir com o hospedeiro vertebrado, no entanto, apenas algumas são capazes de infectar e completar o ciclo no interior das células deste hospedeiro. Diversos fatores influenciam nesta interação, dentre eles a cepa do parasito e o tipo de célula hospedeira (De Souza, 2002).

1.4 - Variabilidade genética do *Trypanosoma cruzi*

Pacientes com doença de Chagas podem desenvolver diferentes formas clínicas da doença (cardíaca, digestiva, mista ou indeterminada). Acredita-se que este fator é diretamente influenciado pela genética do hospedeiro e do próprio parasito.

O *T. cruzi* é um protozoário com ampla distribuição geográfica, representado por um conjunto de populações que circulam entre hospedeiros vertebrados e invertebrados e em ambientes domiciliares e silvestres (Brenner, 1992; Souto *et al.*, 1996). Estas populações, que também podem ser chamadas de isolados ou cepas, são heterogêneas, tanto em nível molecular quanto biológico. O alto grau de diversidade deste protozoário pode estar relacionado à necessidade de adaptação e sobrevivência em diferentes hospedeiros, e a explicação para tal diversidade fenotípica reside no fato do *T. cruzi* ser um organismo diplóide que se multiplica predominantemente por divisão binária. Assim, o genoma de cada cepa evolui independentemente (Tibayrenc e Ayala, 2002).

Apesar das análises genéticas indicarem que o *T. cruzi* é um organismo diplóide que apresenta evolução predominantemente clonal, alguns estudos demonstram que eventos de hibridização ou troca genética podem ocorrer e assim contribuir para a diversidade apresentada nas populações do parasito (Sturm e Campbell, 2009).

Assim como nos demais eucariontes, o *T. cruzi* possui dois genomas distintos, situados em dois compartimentos celulares: o núcleo e a mitocôndria. A mitocôndria dos tripanossomatídeos apresenta uma concentração de DNA sob a forma de uma complexa rede de moléculas circulares, denominada cinetoplasto, a qual se localiza próxima à base do flagelo (Myler, 1993). O DNA do *T. cruzi* tem sido estimado através de diversas metodologias e todos os resultados demonstram que o conteúdo de DNA total é variável entre as diferentes cepas e clones e até mesmo entre clones derivados de uma mesma cepa.

O DNA do cinetoplasto, chamado de kDNA (*kinetoplast DNA*), exhibe estrutura de uma rede formada por milhares de moléculas circulares de DNA, e está localizado no interior de uma mitocôndria única e ramificada por todo citoplasma do flagelado representando cerca de 20-25% do DNA total da célula. Este kDNA é composto por moléculas que diferem em tamanho e função, denominadas minicírculo e maxicírculo (Simpson, 1987). Os minicírculos possuem cerca de 1400 pares de bases e estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias por célula. Sua população não é homogênea, havendo variações nas sequências de nucleotídeos entre as moléculas que formam a rede. Sabe-se que o kDNA é formado por classes de moléculas de minicírculos, que podem variar entre as diferentes cepas ou isolado do parasito (Macina *et al.*, 1987). Os maxicírculos possuem cerca de 40.000 pares de bases e o número de cópias varia de 20 a 50 por célula. Ele abriga os genes das proteínas e dos rRNAs mitocondriais, por isso é considerado análogo ao DNA mitocondrial dos demais eucariontes.

A heterogeneidade intraespecífica do *T. cruzi* tem sido observada desde os estudos realizados por Chagas (1909), que demonstrou diferenças morfológicas entre as formas tripomastigotas sanguíneas. Posteriormente, Brener e Chiari (1963) agruparam isolados de diferentes procedências em três grupos, de acordo com a predominância de formas tripomastigotas sanguíneas delgadas, largas e muito largas. Brener (1969) correlacionou as diferenças morfológicas dos diferentes grupos ao curso clínico da infecção experimental em camundongos. Ele observou que formas delgadas penetravam mais rapidamente nas células, e eram mais susceptíveis aos processos imunes do

hospedeiro; enquanto as formas largas permaneciam por mais tempo no sangue, sendo desta forma mais resistentes aos mecanismos imunológicos do hospedeiro. A partir das diferenças biológicas as populações do *T. cruzi* foram agrupadas em três diferentes categorias chamadas de Biodemas (Andrade 1974; Andrade *et al.*, 2010). Essa heterogeneidade pode ocasionar diferenças regionais quanto à variabilidade das manifestações clínicas, resposta ao tratamento e transmissão do parasito.

Devido aos diferentes grupos criados por pesquisadores a fim de classificar o *T. cruzi*, tornou-se necessária a criação de uma nomenclatura comum. Desta forma, foi proposto o primeiro consenso taxonômico do *T. cruzi* na tentativa de padronizar a classificação desta espécie. Ficou estabelecido no Encontro Satélite, durante o “Simpósio Internacional sobre os Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 anos após sua descoberta” (Anonymous, 1999), o seguinte critério para nomenclatura do *T. cruzi*:

- ***T. cruzi* I** quando equivalentes ao Z1 (Miles *et al.*, 1977), Tipo III (Andrade, 1974), Linhagem 2 (Souto *et al.*, 1996), Grupo 1 (Tibayrenc, 1995);
- ***T. cruzi* II** quando forem equivalentes ao Z2 (Miles *et al.*, 1977), Zimodema A (Romanha *et al.*, 1979), Tipo II (Andrade, 1974), Linhagem 1 (Souto *et al.*, 1996), Grupo 2 (Tibayrenc, 1995);
- ***T. cruzi*** quando possuem caracterização inconclusiva. Cepas aparentemente híbridas como o Zimodema 3 (Miles *et al.*, 1978), Zimodema B (Romanha *et al.*, 1979), Tipo I (Andrade, 1974), Grupo 1/2 (Souto *et al.*, 1996).

A partir do avanço nas análises utilizadas para avaliar a diversidade genética do *T. cruzi*, Zingales e colaboradores (2009) propuseram a divisão da espécie em seis sublinhagens adotando o conceito de “Discrete Typing Unit” - DTU. Atualmente os isolados são classificados em DTU I a VI, sendo a DTU I correspondente ao *T. cruzi* I, e as demais DTUs correspondem às subdivisões correspondentes ao *T. cruzi* II. Essa classificação, utilizando marcadores

moleculares, permite o agrupamento de isolados que apresentam características fenotípicas epidemiológicas semelhantes (Lewis *et al.*, 2009).

A DTU I é prevalente no ciclo silvestre, predominante em países da América central, onde está associada a graves manifestações clínicas, e na região da Bacia Amazônica, onde são registrados raros casos em humanos. Essa DTU tem sido frequentemente associada a casos agudos graves resultantes de surtos de infecção oral (Coura, 2006; Dias *et al.*, 2008; Cura *et al.*, 2010). A DTU II é predominante na região do Cone Sul da América Latina (Zingales *et al.*, 1999), sendo encontrada em hospedeiros vertebrados e vetores provenientes tanto do ciclo doméstico, quanto do ciclo silvestre. Ela está associada a casos graves da doença principalmente nas regiões central, sul e sudeste do Brasil (Freitas *et al.*, 2005). As DTU V e VI são híbridas e estão envolvidas em infecções humanas na região do Chaco e países vizinhos, como Bolívia, Chile, norte da Argentina, e sul Brasil (Virreira *et al.*, 2006; Cardinal *et al.*, 2008). Finalmente, as DTUs TcII e TcIV são raramente encontradas em áreas endêmicas e estão associadas ao ciclo silvestre, com poucos relatos de infecção humana (Brenière *et al.*, 2010).

1.5 - Imunopatologia da doença de Chagas

A resposta imune do hospedeiro apresenta importante papel no controle da infecção causada pelo *T. cruzi*. Ao entrar em contato com as células do hospedeiro, os antígenos do parasito desencadeiam uma série de eventos, para que haja a eliminação do patógeno. Tanto o parasito quanto a resposta imune podem persistir por um longo período no organismo hospedeiro, resultando em lesões teciduais características da doença (Tarleton, 2001).

A resistência do hospedeiro durante a doença de Chagas experimental está diretamente ligada à ação de diversas células, tais como os macrófagos, células NK, linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ e linfócitos B (Russo *et al.*, 1988; Corbett *et al.*, 2001), que atuam no combate ao parasito.

A presença de moléculas antigênicas na superfície das formas tripomastigotas do *T. cruzi* induz a ativação das células “Natural Killer” (NK), fonte de IFN- γ e TNF- α , que são citocinas importantes na ativação de outras células do sistema imune. Estas células também apresentam atividade citotóxica que pode variar conforme a subpopulação (Rottenberg *et al.*, 1988; Cardillo *et al.*, 1996).

A partir da infecção, o *T. cruzi* estimula a produção de IL-12 pelos macrófagos, que induz o aumento da produção de IFN- γ e TNF- α , que irão atuar no controle da parasitemia (Vespa *et al.*, 1994). Além de levar à diminuição da parasitemia, a produção de IFN- γ favorece a diferenciação dos linfócitos T em células Th1, produtoras de IFN- γ e, que juntamente com o TNF- α , auxiliam na ativação de macrófagos que irão produzir óxido nítrico (NO), molécula com função microbicida com importante papel no controle parasitário na fase inicial da infecção (Kumar e Tarleton, 2001).

Os linfócitos T são importantes no controle da infecção chagásica, sendo que estas células são as mais abundantes no infiltrado inflamatório do miocárdio de pacientes com a forma cardíaca da doença (Reis *et al.*, 1993). Os linfócitos TCD4⁺ possuem importante papel na produção de anticorpos líticos e de citocinas, como o INF- γ , que auxiliam na destruição de formas intracelulares do parasito (Brenner, 1986; Tarleton *et al.*, 1996). Estas células também atuam na diferenciação e ativação de linfócitos TCD8⁺, sendo componentes essenciais na resistência ao parasito (Brenner e Gazzinelli, 1997).

Os linfócitos TCD8⁺ são células importantes devido a sua citotoxicidade contra células infectadas do hospedeiro, desempenhando um papel protetor principalmente durante a fase inicial da infecção (Tarleton, 1994; Brenner e Gazzinelli, 1997; Padilla *et al.*, 2009). No infiltrado inflamatório de pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC), os linfócitos TCD8⁺ (citotóxicos) são maioria em relação aos linfócitos TCD4⁺ (Higuchi *et al.*, 1993). Eles são responsáveis pela eliminação da célula infectada, através da produção de IFN- γ , granzimas e perforinas, além de ativarem mecanismos de transdução do sinal em macrófagos, com a ativação da iNOS e consequente produção de NO (Martin e Tarleton, 2004; Borges *et al.*, 2009). No entanto alguns estudos

demonstraram que estas células também podem estar envolvidas na gênese das lesões cardíacas na fase crônica através de danos causados aos cardiomiócitos (Leavey e Tarleton, 2003; Silverio *et al.*, 2010; Silverio *et al.*, 2012).

Durante a fase aguda, a produção de citocinas inflamatórias (perfil Th1) ativa macrófagos e estimula a proliferação de linfócitos TCD8⁺, sendo importante no controle da proliferação do parasito (Kumar e Tarleton, 2001). Durante a fase crônica da infecção pode ocorrer o aumento da secreção de IL-10 com a finalidade de proteger o organismo dos processos patológicos desencadeados pela produção de citocinas do perfil Th1. Alguns estudos apontam a importância das citocinas durante o processo inflamatório desencadeado pela infecção chagásica (Ferreira *et al.*, 2003; Talvani *et al.*, 2004; D'Ávila *et al.*, 2009). O balanço entre a produção de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias é uma das melhores formas de se obter o controle da morbidade da doença durante a fase crônica (Gomes *et al.*, 2003).

Os anticorpos também são importantes componentes da imunidade humoral envolvidos nos mecanismos de defesa do organismo contra o *T. cruzi*. A partir da infecção chagásica, ocorre uma ativação policlonal de linfócitos B e produção de imunoglobulinas (Minoprio *et al.*, 1989). O conhecimento da ativação de diferentes classes de anticorpos é um importante fator para o esclarecimento de mecanismos envolvidos na proteção do hospedeiro.

O sistema imune do hospedeiro não é capaz de eliminar totalmente a infecção. Assim, a permanência do *T. cruzi* no organismo mantém a produção de compostos citotóxicos. A resposta inflamatória desencadeada pela presença do parasito no tecido possui importante papel na proteção contra o *T. cruzi*, no entanto, essa mesma resposta pode contribuir para patologia da doença. Desta forma se torna importante a regulação desta, para que não ocorra exacerbação das lesões inflamatórias (Rodrigues *et al.*, 2010).

1.6 - Papel das reinfecções na doença de Chagas

A grande variabilidade e severidade nos sintomas da doença de Chagas podem ocorrer devido a inúmeros fatores, dentre eles: cepa do parasito (Montamante *et al.*, 1996; Vago *et al.*, 2000), carga parasitária (Fernández *et al.*, 1996), imunidade e aspectos nutricionais do hospedeiro (Koberle, 1968), tempo de infecção e possíveis eventos de reinfecção (Andrade *et al.*, 2006). Nas áreas endêmicas para doença de Chagas, os indivíduos estão expostos a múltiplas infecções pelo *T. cruzi*, devido a repetidas chances de contato com triatomíneos infectados (Andrade *et al.*, 1968).

Os primeiros estudos sobre as manifestações clínicas em pacientes provenientes de áreas endêmicas enfatizou a importância das reinfecções na manutenção do parasitismo e na gravidade das lesões cardíacas desenvolvidas durante a fase crônica da infecção (Chagas, 1910). Evandro Chagas (1935) sugeriu que a evolução da doença era dependente de diversos fatores, dentre eles da patogenicidade do parasito e de sucessivas infecções. Koeberle (1956) sugeriu o agravamento das lesões teciduais devido à reinfecção, no entanto, ele afirmava que o destino do chagásico se definia na fase aguda da doença.

Estudos têm apontado que indivíduos que habitam áreas endêmicas para doença de Chagas por prolongado período de tempo podem estar sujeitos a reinfecções pelo *T. cruzi*, talvez agravando o processo patológico da doença (Dias, 1963; Ávila *et al.*, 1987). No entanto, as evidências que suportam esta teoria têm se mostrado controversas.

A importância das reinfecções na morbidade cardíaca da doença de Chagas tem sido sugerida através de observações clínicas (Dias, 1963). Dias e seus colaboradores (2002) realizaram uma revisão sobre o impacto do controle da doença de Chagas humana na América Latina através da eliminação de vetores domésticos e da transmissão transfusional. Uma visível redução da morbidade e da mortalidade precoce pela infecção com o *T. cruzi* foi detectada, o que indica que múltiplas reinfecções em áreas endêmicas podem ser consideradas como um importante fator na morbidade da doença de Chagas e

que a ruptura desta cadeia através do controle vetorial, tem influenciado positivamente a evolução da doença.

Experimentalmente, diferentes autores têm estudado a influência das reinfecções no curso da doença e os resultados sugerem o desenvolvimento de uma resistência após uma primeira infecção (Brumpt, 1913; Culbertson *et al.*, 1938; Torres e Tavares, 1958; Brener, 1967; Andrade *et al.*, 1970). No entanto, esta resistência seria apenas parcial, não impedindo o desenvolvimento de parasitos de uma nova inoculação.

Estudando a influência das reinfecções na doença de Chagas experimental, Andrade e colaboradores (1968) não encontraram diferenças no parasitismo e no grau das lesões nos tecidos analisados. Em um estudo um pouco mais recente, Andrade e colaboradores (2006), constataram que inoculações sucessivas podem ocasionar o agravamento de lesões teciduais, no músculo cardíaco ou esquelético de camundongos, dependendo da sequência de inoculação de diferentes cepas. Lauria-Pires e Teixeira (1997), concluíram que reinfecções não agravaram a morbidade e a mortalidade da doença de Chagas em camundongos. No entanto, em hamsters a reinfecção parece ser um dos fatores que influenciam no desenvolvimento do processo inflamatório (Cabrine-Santos *et al.*, 2001). Estes dados demonstram a variabilidade de resultados encontrados a partir de experimentos com reinfecção.

Deste modo, o estudo das reinfecções possui grande importância no esclarecimento de diversas questões relacionadas à interação parasito-hospedeiro e ao desenvolvimento e evolução da doença. O papel das reinfecções, tanto na doença de Chagas humana quanto na experimental, tem sido investigado por diversos autores (Brumpt, 1913; Chagas, 1932; Prata, 1959; Macedo, 1976; Davila *et al.*, 1987; Lauria-Pires e Teixeira, 1997, Machado *et al.*, 2001; Bustamante *et al.*, 2002; Andrade *et al.*, 2006), no entanto, estes estudos apresentaram resultados bastante controversos.

2- JUSTIFICATIVA

Se a reinfecção está presente no ciclo natural da doença de Chagas e a diversidade genética de populações do *T. cruzi* apresenta influência no desenvolvimento da infecção, tanto no hospedeiro vertebrado quanto invertebrado, então, o presente trabalho propõe estudar o curso da infecção em camundongos experimentalmente inoculados e/ou reinoculados com diferentes clones de *T. cruzi*, a fim de compreender os diferentes mecanismos possivelmente envolvidos na progressão da infecção chagásica.

3- OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral

Avaliar o papel das reinfecções em camundongos experimentalmente infectados com clones do *Trypanosoma cruzi* que apresentam distintos perfis genéticos.

3.2 - Objetivos específicos

Avaliar em camundongos infectados e/ou reinfectedados:

3.2.1 - A taxa de mortalidade e a curva de parasitemia na fase aguda e após cada inóculo;

3.2.2 - O fenótipo das células mononucleares do sangue periférico na fase crônica;

3.2.3 - O processo inflamatório e a fibrose no coração e músculo esquelético na fase crônica.

3.1 - Animais

Foram utilizados 30 camundongos *Swiss* albinos, machos, pesando entre 18-21g, provenientes do Centro de Ciência Animal (CCA) da UFOP e mantidos no mesmo local, recebendo água e ração *ad libidum*. Todas as atividades realizadas estavam de acordo com o preconizado pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA) e o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Animais da Universidade Federal de Ouro Preto (protocolo 2009/39).

3.2 - Clones do *Trypanosoma cruzi*

Foram utilizados dois clones do *T. cruzi*: o clone P209, pertencente ao genótipo 20 (DTU TcI), isolado de um paciente em fase crônica proveniente da Bolívia; e o clone IVV, pertencente ao genótipo 32 (DTU TcII), isolado de um paciente em fase crônica proveniente do Chile (Zingales *et al.*, 2009). Amostras destes parasitos foram criopreservados no banco de cepas do Laboratório de Doença de Chagas da UFOP, e foram descongelados para utilização no presente trabalho. Os clones foram inoculados intraperitonealmente em camundongos albinos *Swiss* para a obtenção de formas tripomastigotas sanguíneas.

3.3 - Infecção dos animais

A inoculação foi realizada por via intraperitoneal com 5000 formas tripomastigotas sanguíneas. Os 30 camundongos foram separados em cinco grupos (Tabela 1), de acordo com o delineamento experimental da Figura 1.

Os animais pertencentes aos grupos reinfecçados foram reinoculados no 46º (1ª reinfecção) e no 87º (2ª reinfecção) dia após a primoinfecção (Figura 2). Ao final de 155 dias de experimento os animais foram eutanasiados.

Tabela 1: Sequência de inoculações dos clones do *Trypanosoma cruzi*, nos animais pertencentes aos diferentes grupos.

Grupos	Sequência de Infecções		
	Infecção	1ª Reinfecção	2ª Reinfecção
Apenas Primoinfectado 1 (AP1)	Tcl (P209)	-	-
Apenas Primoinfectado 2 (AP2)	TcII (IVV)	-	-
Reinfectado 1 (RE1)	Tcl (P209)	TcII (IVV)	Tcl (P209)
Reinfectado 2 (RE2)	TcII (IVV)	Tcl (P209)	TcII (IVV)

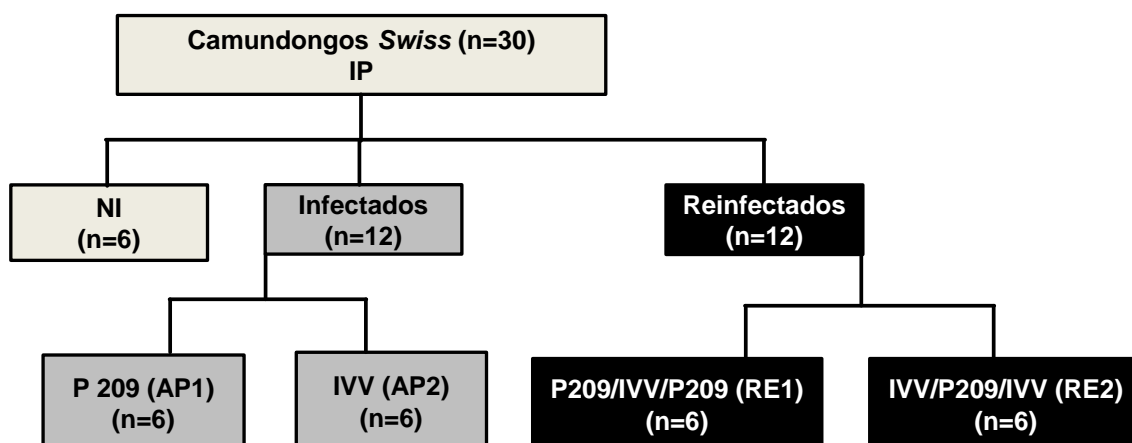


Figura 1: Delineamento Experimental dos grupos infectados/reinfectados pelos clones P209 e IVV do *T. cruzi*: **NI** (não infectado); **AP1** (infectado apenas uma vez pelo clone P209); **AP2** (infectado apenas uma vez pelo clone IVV); **RE1** (primoinfectado pelo clone P209 e posteriormente reinfectado alternadamente: IVV/P209); **RE2** primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectado alternadamente: P209/IVV).

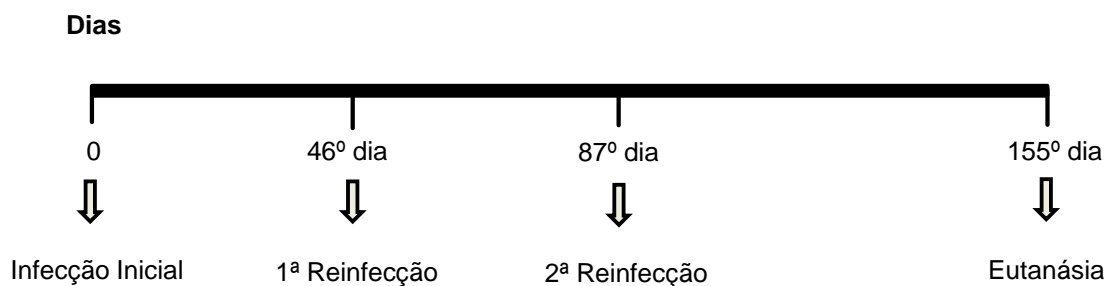


Figura 2: Cronograma de inoculações

3.4 - Taxa de mortalidade

Os animais foram acompanhados diariamente a partir do primeiro dia de inóculo até 155 dias após a primeira infecção. A taxa de mortalidade foi calculada considerando a mortalidade cumulativa no período avaliado e expressa em porcentagem.

3.5 - Exames parasitológicos

Os animais submetidos a infecções/reinfecções tiveram as curvas de parasitemias determinadas, a partir da contagem diária iniciada no quinto dia após cada inóculo até a negativação dos exames por cinco dias consecutivos. Para tal, foram obtidas amostras de sangue coletadas da cauda de cada animal, sendo a contagem feita conforme padronizado por Brener (1962).

A curva de parasitemia foi plotada utilizando a média diária de parasitemia dos animais. Foi realizada a média dos valores encontrados para cada animal, para determinar o valor de cada grupo. Os parâmetros período patente (PP), pico máximo de parasitemia (PM) e dia do pico máximo de parasitemia (DPM) foram também determinados.

3.6 - Imunofenotipagem do sangue periférico

Dentre os parâmetros imunológicos, foi realizada a caracterização do perfil fenotípico das células do sangue periférico, coletado do plexo orbital dos animais. Em tubos de poliestireno 12x75mm, foi adicionado 2 μ L do anticorpo monoclonal específico para o marcador de superfície celular de interesse conjugado com fluorocromo (Tabela 2). Para cada tubo com anticorpo monoclonal, foram adicionadas alíquotas de 25 μ L de sangue periférico total coletado em EDTA. Após homogeneização, em vórtex, as preparações foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Em seguida, as amostras foram submetidas à lise dos eritrócitos, utilizando 2mL de solução de lise diluída 10 vezes em água destilada. Posteriormente a nova homogeneização em vórtex, as preparações foram incubadas por 10 minutos a

temperatura ambiente e então submetidas à centrifugação (1300rpm, 7 minutos a 18°C). O sobrenadante foi descartado e os leucócitos lavados com 3 mL de PBS (pH7,4), empregando-se as mesmas condições de centrifugação anteriormente citadas. Numa etapa final, os leucócitos foram fixados com 200µL de solução fixadora (10g/L de paraformaldeído, 1 % de cacodilato de sódio, 6,67g/L de cloreto de sódio, pH 7,2). Após um período de pelo menos 15 minutos a 4°C, os parâmetros fenotípicos e morfométricos das células presentes em cada tubo foram determinados no citômetro de fluxo (FACScalibur® – Becton Dickinson). O programa CELLQuest® foi utilizado para a aquisição de dados e o programa o FlowJo® para a análise dos resultados empregando diferentes estratégias.

Tabela 2: Anticorpos monoclonais marcados com fluorocromos utilizados para análise de populações celulares.

Anticorpos	Fluorocromo	Fabricante	Clone	Fenótipo alvo no estudo
Anti-CD4	FITC	Caltag	RM4-5	Linfócitos T auxiliares
Anti-CD8	FITC	Caltag	5H10	Linfócitos T citotóxicos
Anti-CD49b	FITC	Pharmingen	DX5	Células NK
Anti-Mac-3	FITC	Pharmingen	M3/84	Monócitos/Macrófagos
Anti-IgG2a	FITC	Caltag	-	Controle de isotipo

3.7 - Análises histológicas

Os fragmentos de coração e músculo esquelético (coletados no dia da necropsia dos animais) fixados em formol foram processados rotineiramente e posteriormente incluídos em parafina. Os blocos de parafina foram submetidos à microtomia para a obtenção de cortes com espessura de 4 µm. Foram confeccionadas duas lâminas tanto do coração quanto do músculo esquelético, sendo a primeira submetida à coloração pelo método de Hematoxilina-Eosina (H&E) para quantificação do processo inflamatório e a segunda submetida a coloração de Tricrômico de Masson para a quantificação da área de colágeno no tecido (determinação da fibrose).

3.7.1 - Coloração de H&E

As lâminas contendo os cortes dos tecidos do coração e do músculo esquelético foram desparafinizadas em duas trocas de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de álcool etílico (100, 90, 80 e 70%) e então lavados em água corrente. Em seguida, foram corados pela Hematoxilina, por 10 minutos e lavados, para retirada do excesso do corante. Os cortes foram diferenciados em álcool acidulado (200 mL de álcool absoluto e 10 gotas de ácido clorídrico) e outra vez lavado em água corrente para evitar excesso de acidificação. Posteriormente, foram corados pela Eosina por 30 segundos. Após a última lavagem, eles foram desidratados, em dois banhos de álcool absoluto e levados à estufa a 56°C para secagem e montados com lamínula e Entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.7.2 - Coloração de Tricrômico de Masson

Para análise da deposição de colágeno e determinação da fibrose, cortes histológicos do coração e do músculo esquelético foram corados pela técnica de tricrômico de Masson. Após desparafinização e hidratação dos cortes, estes foram corados com hematoxilina por 2 min, lavados em água corrente e corados durante 5min pela solução número 1 (90mL Sudam 1% em solução alcoólica, 10mL fucsina ácida 1% em solução aquosa e 1mL de ácido acético glacial). Em seguida, foram lavados em água corrente, corados durante 10min pela solução número 2 (2,5g ácido fosfotúngstico, 2,5g ácido fosfomolibdico em 100mL de água destilada) e novamente lavados. Em seguida foram corados por 5min pela solução número 3 (2,5g azul de anilina, 2mL de ácido acético glacial em 100mL água destilada), lavados e submetidos à solução de água acética 10% durante 5min. Realizado o último processo de lavagem, os cortes foram desidratados, secos em estufa (56°C) e montados em lâminas com auxílio de entellan (Merck, Darmstadt, Germany).

3.7.3 – Morfometria

Para as análises quantitativas, as imagens visualizadas pela objetiva 40x foram digitalizadas através do microscópio Leica DM5000B com uma microcâmara acoplada. Todas as imagens foram analisadas pelo software Leica QwinV3 no Laboratório de Multiusuários do Núcleo de Pesquisas em Ciências Biológicas da UFOP.

Para avaliação do processo inflamatório, as células foram quantificadas, sendo analisados 20 campos aleatórios em cada lâmina (área total percorrida igual a $1,5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$). O infiltrado inflamatório foi determinado pela diferença entre o número células presentes nos animais infectados/reinfectados pelo *T. cruzi* e o valor observado nos animais não infectados \pm desvio padrão (Caliari, 1997; Maltos *et al.*, 2004). Para a avaliação da fibrose, 30 imagens aleatórias foram capturadas e utilizando a função de segmentação de imagens, todos os pixels com tons azuis foram selecionados para a criação de uma imagem binária e posterior cálculo da área total ocupada por fibrose nos camundongos infectados e pelo tecido conjuntivo fibroso normal nos camundongos controle.

3.8 - Análises Estatísticas

Os testes estatísticos foram realizados com o apoio instrumental do software GraphPad Prism 5 (Prism Software, Irvine, CA, USA). Foi realizado o teste de Kolmogorov-Smirnov para avaliar se os dados eram paramétricos ou não-paramétricos.

Para comparação longitudinal foi realizada análise de variância (ANOVA one-way), seguido pelo teste de comparações múltiplas, o teste de Tukey. Para a análise da área sobre a curva de parasitemia foi utilizado teste T de Student pareado. As análises de correlação foram executadas através do teste de Pearson.

Foram consideradas significativas as diferenças entre médias com valores de $p < 0,05$.

4- RESULTADOS

4.1 - Curvas de Parasitemia

As curvas de parasitemia obtidas em camundongos Swiss infectados/reinfectados com os clones P209 (Tcl) e IVV (Tcll) do *T. cruzi* estão representadas nas Figuras 3 e 4.

Nos animais infectados/reinfectados pelo clone P209 (Grupos AP1 e RE1), observou-se período pré-patente médio de cinco dias, sendo o pico de parasitemia no 24^o dia pós-infecção ($5,1 \times 10^3$ parasitos/0,1mL de sangue para o Grupo AP1 e $8,6 \times 10^3$ parasitos/0,1mL de sangue para o Grupo RE1). No grupo AP1 houve uma diminuição gradativa da parasitemia em torno do 35^o dia, tornando-se sub-patente 109 dias após a inoculação dos parasitos. Nos animais do grupo RE1, a parasitemia caiu gradativamente a partir do 55^o dia e tornou-se subpatente no 83^o dia após a primoinfecção. Observou-se o prolongamento da parasitemia do grupo reinfectado (RE1) em relação ao grupo apenas primoinfectado (AP1) pelo clone P209 (Figura 3).

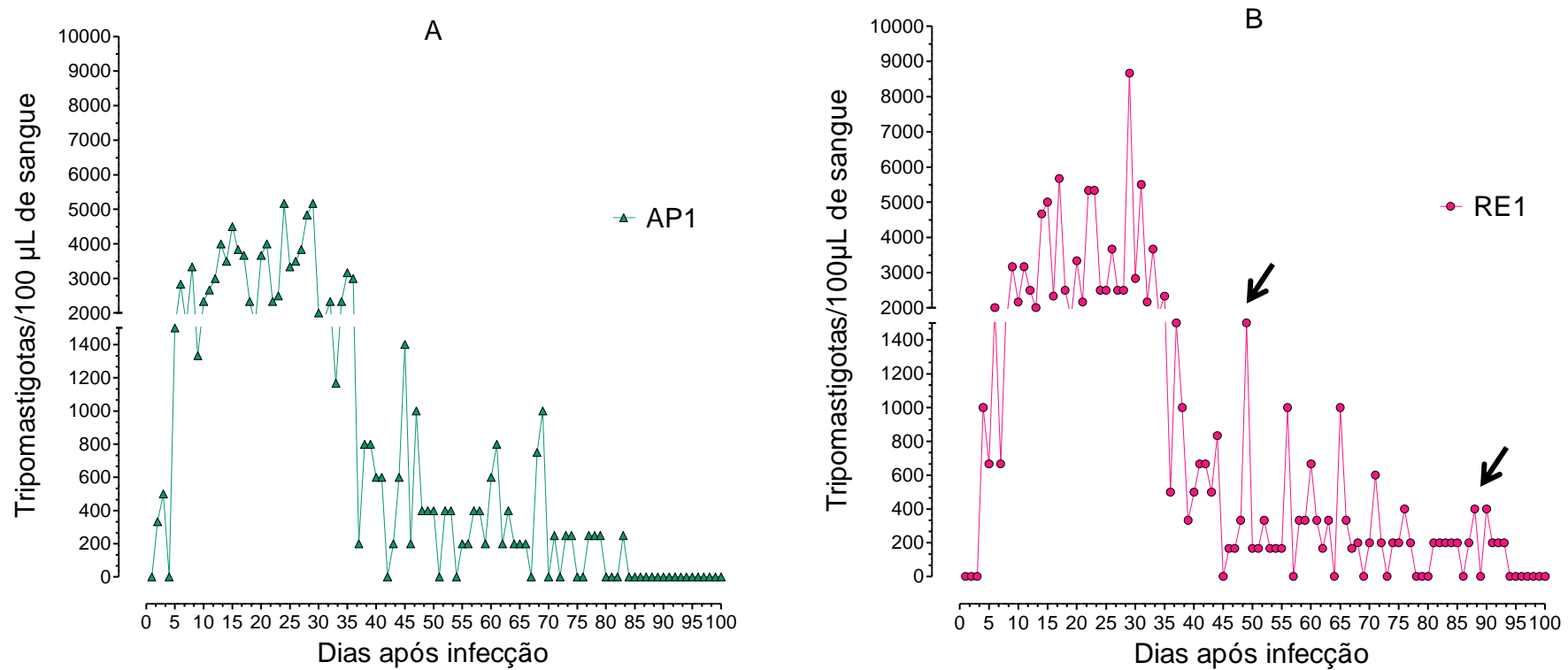


Figura 3: Curvas de parasitemia observadas em camundongos *Swiss* infectados/reinfectados com 5.000 tripomastigotas sanguíneas dos diferentes clones do *T. cruzi*. A) Animais apenas primoinfectados com o clone P209 (**AP1**); B) Animais primoinfectados pelo clone P209 e posteriormente reinfectados alternadamente (IVV/P209) (**RE1**). As setas indicam os eventos de reinfeção.

Os animais infectados/reinfectados com o clone IVV (Grupos AP2 e RE2) apresentaram um período pré-patente médio de cinco dias, sendo o pico de parasitemia em torno do 27º dia após a infecção ($3,1 \times 10^5$ parasitos/0,1mL de sangue para o grupo AP2 e $4,1 \times 10^5$ parasitos/0,1mL de sangue para o grupo RE2). Observou-se que o pico de parasitemia destes grupos foi significativamente maior do que o observado entre os animais primoinfectados pelo clone P209. A partir do 30º dia a parasitemia

diminuiu gradativamente, tornando-se subpatente após o 54º dia para o grupo AP2. No grupo RE2 a parasitemia diminuiu a partir do 41º dia e se manteve patente até o 94º dia após o primeiro inóculo (Figura 4).

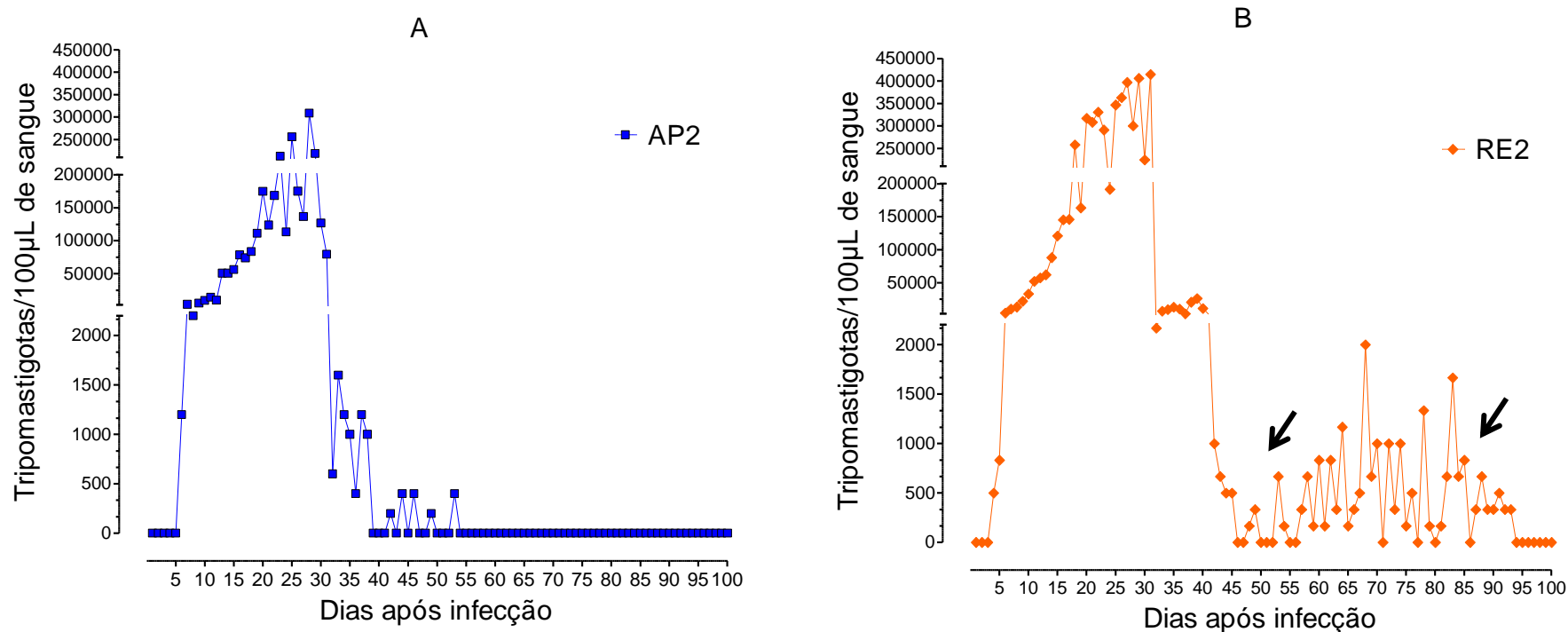


Figura 4: Curvas de parasitemia observadas em camundongos Swiss inoculados com 5.000 tripomastigotas sanguíneos dos diferentes clones do *Trypanosma cruzi*. A) Animais apenas primoinfectados com o clone IVV (**AP2**); B) Animais primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente reinfectedos alternadamente (P209/IVV) (**RE2**). As setas indicam os eventos de reinfecção.

4.2 – Taxa de mortalidade

A taxa de mortalidade foi nula entre os animais infectados/reinfectados com o clone IVV. Entretanto, entre os animais inoculados com o clone P209 observou-se mortalidade de 33,3% no grupo AP1 e de 16,6% nos animais do grupo RE1 (Figura 5).

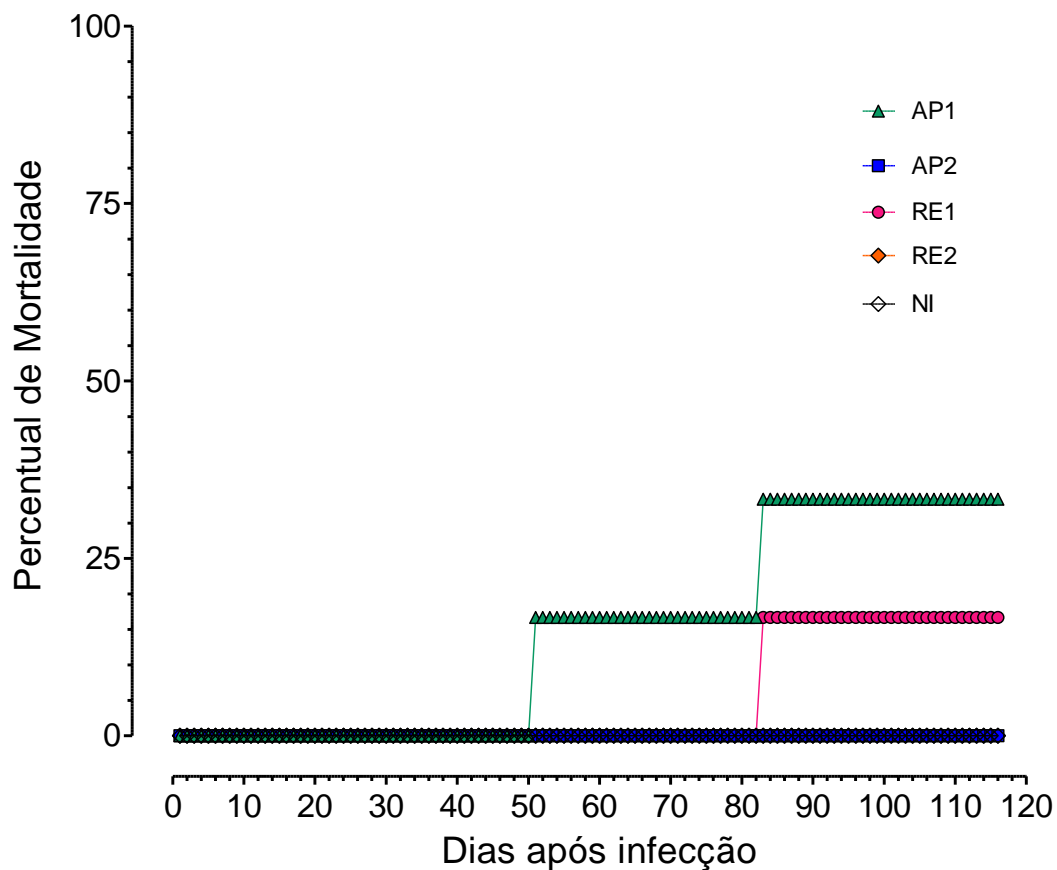


Figura 5: Taxa de mortalidade de camundongos Swiss infectados/reinfectados com diferentes clones do *Trypanosma cruzi*: Animais não infectados (**NI**); Animais apenas infectados pelo clone P209 (**AP1**); Animais apenas infectados pelo clone IVV (**AP2**); Animais primoinfectados pelo clone P209 e posteriormente reinfectados alternadamente (IVV/P209) (**RE1**); Animais primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente reinfectados alternadamente (P209/IVV) (**RE2**).

4.3 - Imunofenotipagem do sangue periférico

4.3.1 - Células NK e monócitos:

O efeito da infecção/reinfecção por diferentes clones do *T. cruzi* sobre a resposta imune inata foi avaliado a partir de uma análise fenotípica das células NK e Monócitos (Mac-3⁺) no sangue periférico dos camundongos pertencentes aos diferentes grupos.

Observou-se que não houve diferença no percentual de células NK entre os grupos experimentais (infectados/reinfectados). No entanto, a primoinfecção pelo clone P209 (grupos AP1 e RE1) proporcionou uma maior porcentagem de monócitos ($p < 0,05$) em relação ao grupo infectado apenas uma vez pelo clone P209 (AP2). Os animais do grupo RE1 também apresentaram uma maior porcentagem de monócitos quando comparados aos grupos controle (NI) e RE2 (Figura 6).

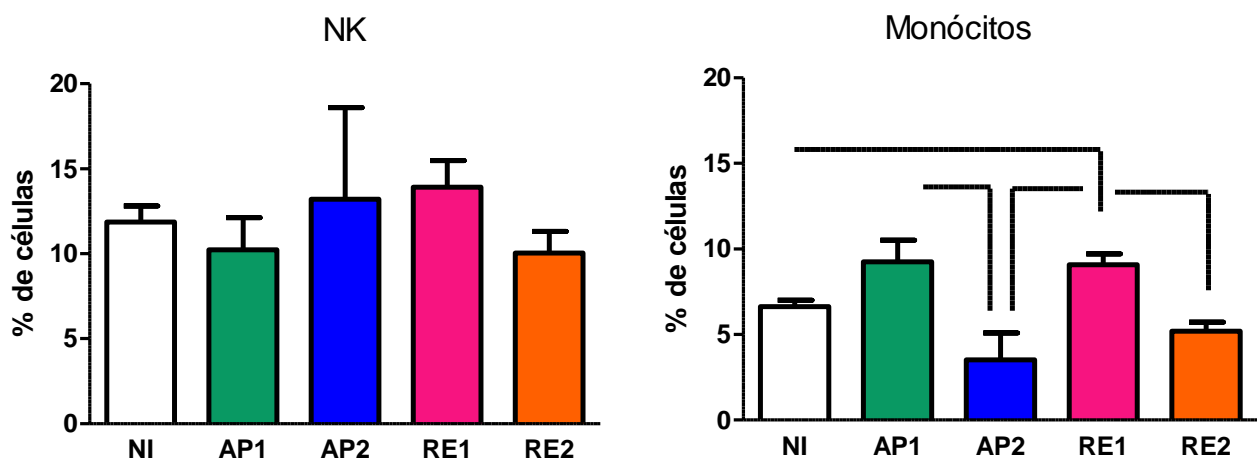


Figura 6: Percentual médio de células NK (CD49b⁺) e Monócitos (Mac-3⁺) no sangue periférico dos camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do *T. cruzi* 155 após o primeiro inóculo. Grupo não infectado (NI); Grupo infectado apenas com o clone P209 (AP1); Grupo infectado apenas com o clone IVV (AP2); Grupo primoinfectado pelo clone P209 e posteriormente reinfectado alternadamente: IVV/P209 (RE1); Grupo primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectado alternadamente: P209/IVV (RE2). Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.

4.3.2 - Células CD4⁺ e CD8⁺

Para caracterizar a influência da infecção/reinfecção por diferentes clones do *T. cruzi* sobre a resposta imune adquirida foi realizada uma análise fenotípica das células CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico dos camundongos dos diferentes grupos experimentais.

A infecção pelo clone IVV (grupos AP2 e RE2) promoveu significativa redução no percentual de linfócitos TCD4⁺ em relação aos animais do grupo controle não infectado (NI) ($p < 0,05$). Não houve diferença na porcentagem de linfócitos TCD8⁺ entre os grupos estudados (Figura 7).

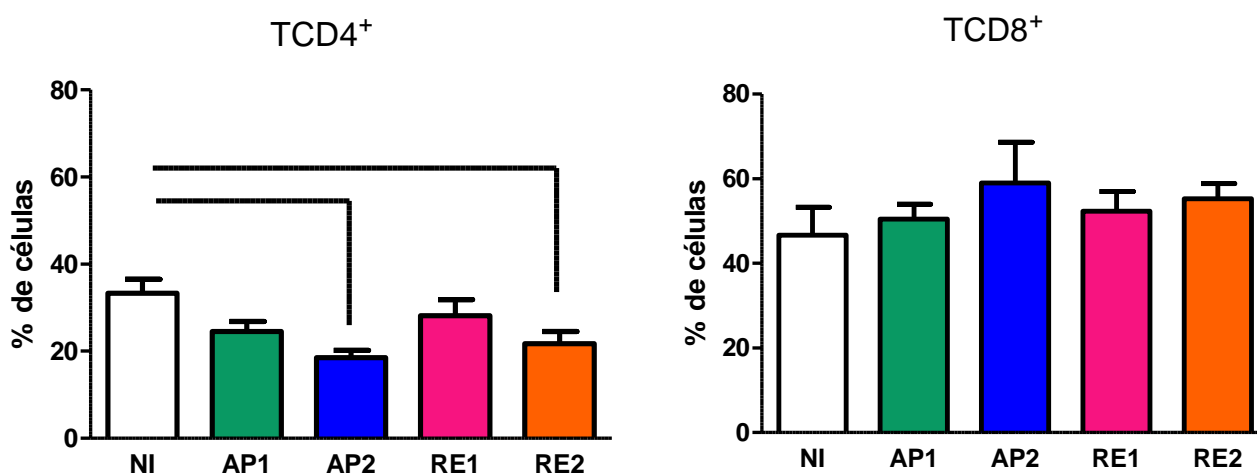


Figura 7: Percentual médio de células CD4⁺ (Linfócitos TCD4⁺) e CD8⁺ (Linfócitos TCD8⁺) no sangue periférico dos camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do *T. cruzi* 155 após o primeiro inóculo. Grupo não infectado (NI); Grupo infectado apenas com o clone P209 (AP1); Grupo infectado apenas com o clone IVV (AP2); Grupo primoinfectado pelo clone P209 e posteriormente reinfectado alternadamente: IVV/P209 (RE1); Grupo primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectado alternadamente: P209/IVV (RE2). Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelas linhas conectoras. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão.

4.4 - Alterações Histopatológicas nos músculos cardíaco e esquelético

4.4.1 – Quantificação do processo inflamatório

Foi observada a presença de infiltrado inflamatório no coração de todos os animais infectados. Entretanto, nos animais primoinfectados pelo clone IVV (grupos AP2 e RE2) foi detectado um número significativamente maior células em relação aos animais do grupo controle não infectado (NI). O grupo RE2 também apresentou uma maior quantidade de infiltrado em relação ao grupo

RE1, assim como os animais infectados uma única vez pelo clone IVV (AP2) apresentaram um maior número de células em relação ao grupo infectado uma única vez pelo clone P209 (AP1) (Figura 8).

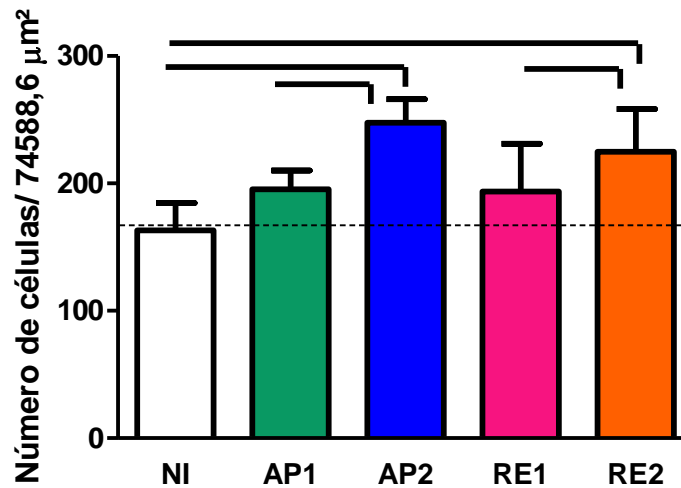


Figura 8: Quantificação de células presentes no músculo cardíaco de camundongos inoculados com diferentes clones do *T. cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. Grupo não infectado (NI); Grupo infectado apenas com o clone P209 (AP1); Grupo infectado apenas com o clone IVV (AP2); Grupo primoinfectado pelo clone P209 e posteriormente reinfectado alternadamente: IVV/P209 (RE1); Grupo primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectado alternadamente: P209/IVV (RE2). Diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os grupos estão representadas pelas linhas conectoras. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão dos camundongos de cada grupo. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados. ($74588,6 \mu\text{m}^2 =$ campo microscópico)

Também foi observado processo inflamatório no músculo esquelético dos animais infectados. Os animais primoinfectados pelo clone IVV (grupos AP2 e RE2) e infectados uma única vez pelo clone P209 (AP1) apresentaram um número significativamente maior de células em relação aos animais do grupo controle não infectado (NI). O grupo RE2 também apresentou uma maior quantidade de células em relação ao grupo RE1 (Figura 9).

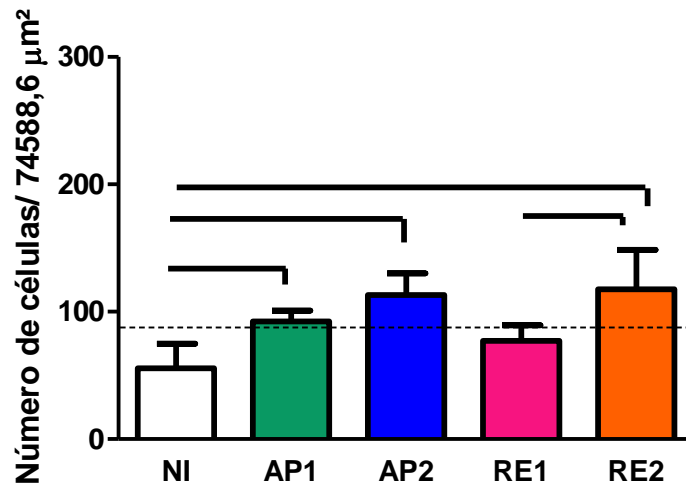


Figura 9: Quantificação de células presentes no músculo esquelético de camundongos inoculados com diferentes clones do *T. cruzi* avaliados na fase crônica da infecção. Grupo não infectado (**NI**); Grupo infectado apenas com o clone P209 (**AP1**); Grupo infectado apenas com o clone IVV (**AP2**); Grupo primoinfectado pelo clone P209 e posteriormente reinfectado alternadamente: IVV/P209 (**RE1**); Grupo primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectado alternadamente: P209/IVV (**RE2**). Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos estão representadas pelas linhas conectoras. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão dos camundongos de cada grupo. A linha tracejada representa o número médio de núcleos celulares quantificados em cortes histológicos do músculo esquelético de animais não infectados. ($74588,6\text{mm}^2 =$ campo microscópico)

Em todos os animais infectados, o infiltrado inflamatório foi predominantemente constituído de células mononucleadas (Figura 10 e Figura 11), sendo a maioria com morfologia de linfócitos.

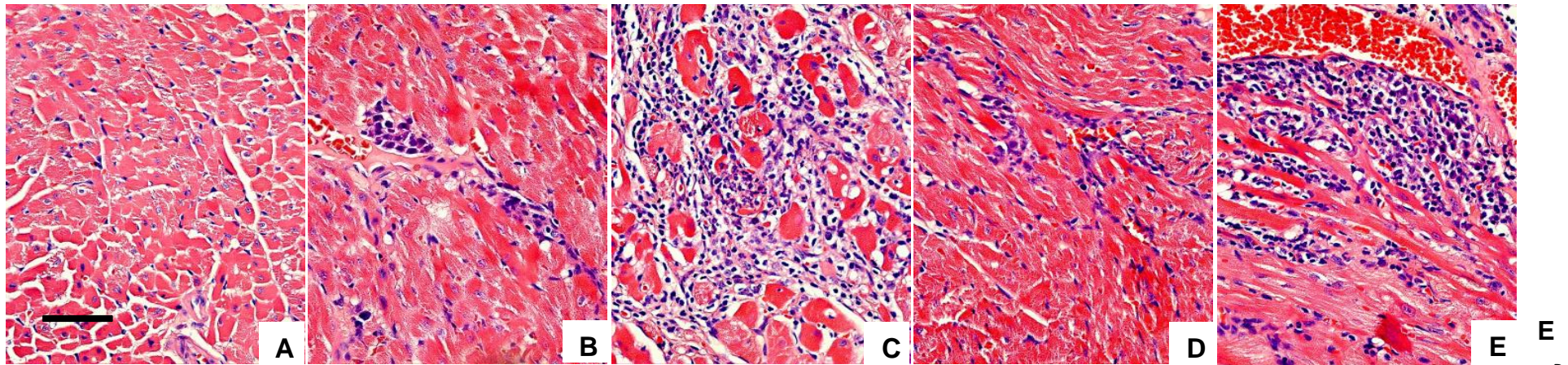


Figura 10 – Fotomicrografias de cortes histológicos do coração de camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do *Trypanosoma cruzi*. A) aspecto histológico cardíaco normal em animais não-infectados (**NI**); B) infiltrado inflamatório discreto em animais apenas primoinfectados pelo clone P209 (**AP1**); C) infiltrado inflamatório intenso em animais apenas primoinfectados pelo clone IVV (**AP2**); D) infiltrado inflamatório discreto em animais primoinfectados pelo clone P209 e posteriormente reinfectados alternadamente (**RE1**); E) infiltrado inflamatório intenso em animais primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente reinfectados alternadamente (**RE2**). Hematoxilina-Eosina. Barra=50 μ m.

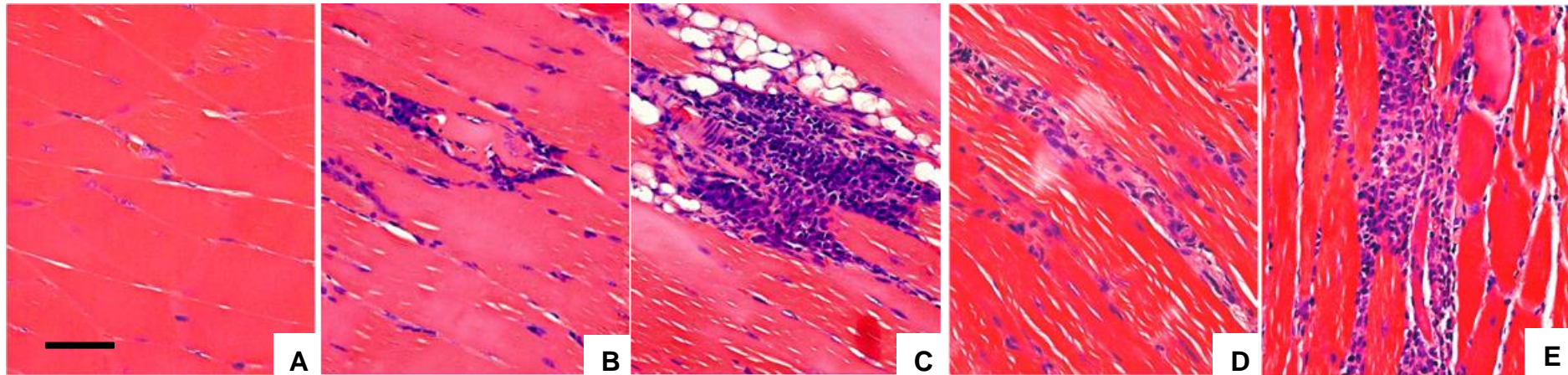


Figura 11 – Fotomicrografias de cortes histológicos do músculo esquelético de camundongos infectados/reinfectados por diferentes clones do *Trypanosoma cruzi*. A) aspecto histológico normal em animais não-infectados (**NI**); B) infiltrado inflamatório discreto em animais apenas primoinfectados pelo clone P209 (**AP1**); C) infiltrado inflamatório moderado em animais apenas primoinfectados pelo clone IVV (**AP2**); D) infiltrado inflamatório discreto em animais primoinfectados pelo clone P209 e posteriormente reinfectados alternadamente (**RE1**); E) infiltrado inflamatório moderado em animais primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente reinfectados alternadamente (**RE2**). Hematoxilina-Eosina. Barra=50 μ m.

4.4.2 – Determinação da fibrose

Com o objetivo de investigar a influência da infecção/reinfecção por diferentes clones do *T. cruzi* no processo de fibrose do músculo cardíaco e do músculo esquelético durante a fase crônica da infecção, foi realizada coloração com Tricrômico de Masson e posterior cálculo da área total ocupada por colágeno (Figuras 12 e 13).

A partir da análise morfométrica observou-se presença de fibrose no músculo cardíaco dos animais do grupo primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectedos alternadamente (RE2) em relação a todos os outros grupos testados (Figura 12).

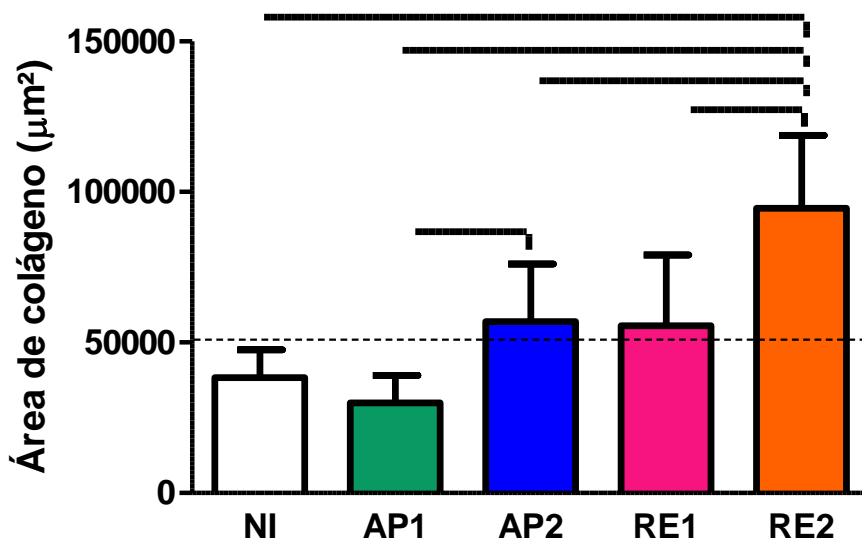


Figura 12: Quantificação da fibrose no músculo cardíaco de camundongos inoculados com diferentes clones do *T. cruzi* e avaliados na fase crônica da infecção. Grupo não infectado (NI); Grupo infectado apenas com o clone P209 (AP1); Grupo infectado apenas com o clone IVV (AP2); Grupo primoinfectado pelo clone P209 e posteriormente reinfectedo alternadamente: IVV/P209 (RE1); Grupo primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectedo alternadamente: P209/IVV (RE2). Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos estão representadas pelas linhas conectoras. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão dos camundongos de cada grupo. A linha tracejada representa o valor médio da área de deposição de colágeno quantificado em cortes histológicos cardíacos de animais não infectados.

Através das análises realizadas a partir do fragmento do músculo esquelético constatou-se que os animais do grupo RE2 novamente apresentaram maior área de fibrose em relação aos demais grupos. Também

verificou-se maior área de fibrose no grupo RE1 em relação ao grupo AP2 (Figura 13).

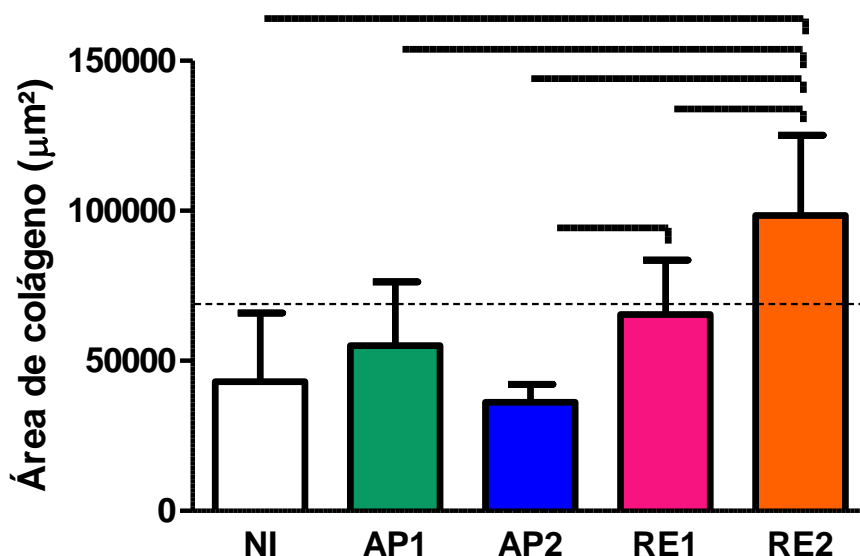


Figura 13: Quantificação da fibrose no músculo esquelético de camundongos infectados por diferentes clones do *T. cruzi* e avaliados na fase crônica da infecção. Grupo não infectado (NI); Grupo infectado apenas com o clone P209 (AP1); Grupo infectado apenas com o clone IVV (AP2); Grupo primoinfectado pelo clone P209 e posteriormente reinfectado alternadamente: IVV/P209 (RE1); Grupo primoinfectado pelo clone IVV e posteriormente reinfectado alternadamente: P209/IVV (RE2). Diferenças significativas ($p < 0.05$) entre os grupos estão representadas pelas linhas conectoras. Os valores foram expressos como média \pm desvio padrão dos camundongos de cada grupo. A linha tracejada representa o valor médio da área de deposição de colágeno quantificado em cortes histológicos do músculo esquelético de animais não infectados.

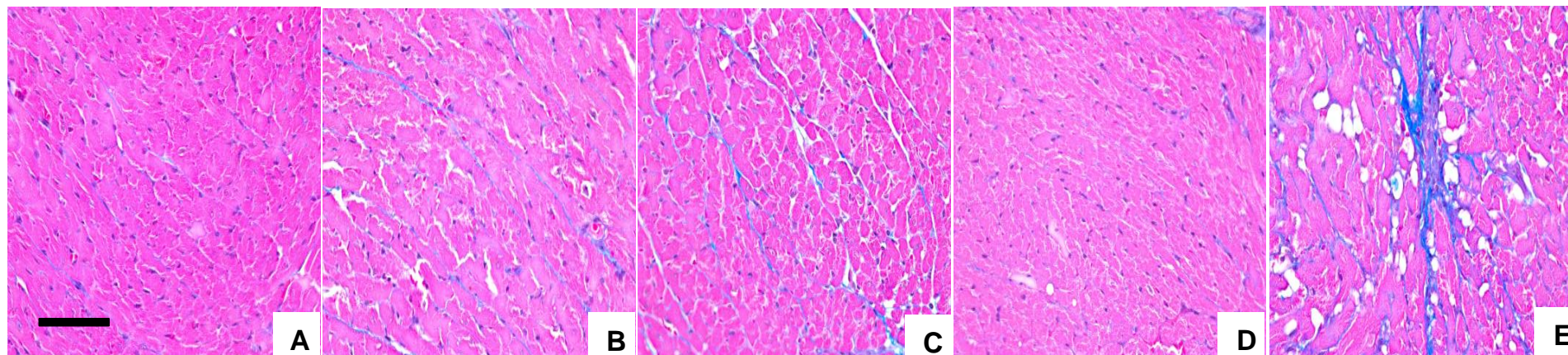


Figura 14: Fotomicrografias ilustrativas de cortes histológicos do coração de camundongos *Swiss* infectados por diferentes clones do *Trypanosoma cruzi*. A) Animais não infectados (**NI**) apresentando aspecto histológico cardíaco normal; B) Animais infectados apenas com o clone P209 (**AP1**) apresentando aspecto histológico cardíaco normal; C) Animais apenas infectados pelo clone IVV (**AP2**) apresentando aspecto histológico cardíaco normal; D) Animais primoinfectados com o clone P209 e posteriormente reinfetado alternadamente (**RE1**) apresentando aspecto histológico cardíaco normal; E) Animais primoinfectados com o clone IVV e posteriormente reinfetados alternadamente (**RE2**) apresentando área de colágeno no músculo cardíaco. Tricrômico de Masson. Barra=50µm.

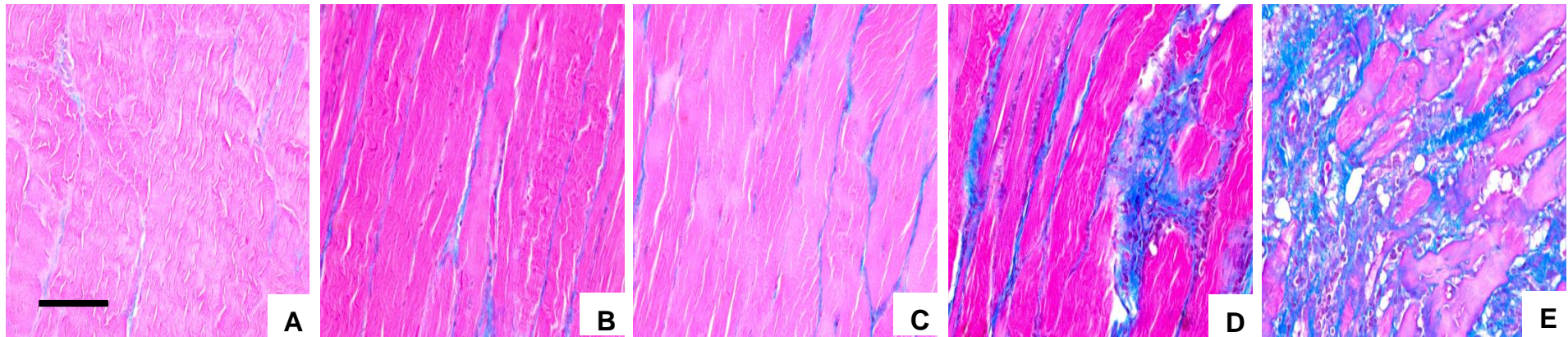


Figura 15: Fotomicrografias ilustrativas de cortes histológicos do músculo esquelético de camundongos *Swiss* infectados por diferentes clones do *T. cruzi*. A) Animais não infectados (**NI**) apresentando aspecto histológico normal; B) Animais infectados apenas com o clone P209 (**AP1**) apresentando aspecto histológico normal; C) Animais apenas infectados pelo clone IVV (**AP2**) apresentando aspecto histológico normal; D) Animais primoinfectados com o clone P209 e posteriormente reinfetado alternadamente (**RE1**) apresentando área de fibrose; E) Animais primoinfectados com o clone IVV e posteriormente reinfetados alternadamente (**RE2**) apresentando área de fibrose no músculo esquelético. Tricrômico de Masson. Barra=50µm

4.5 – Correlação entre células TCD8⁺ e a inflamação

Foram realizadas análises estatísticas a fim de detectar possíveis correlações entre os dados encontrados a partir das análises histológicas e da imunofenotipagem do sangue periférico, dos diferentes grupos testados. No entanto somente foi encontrada uma correlação, positiva, entre a porcentagem de Linfócitos TCD8⁺ e a área do infiltrado inflamatório no músculo cardíaco dos animais do primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente re infectados alternadamente (grupo RE2) (Figura 16).

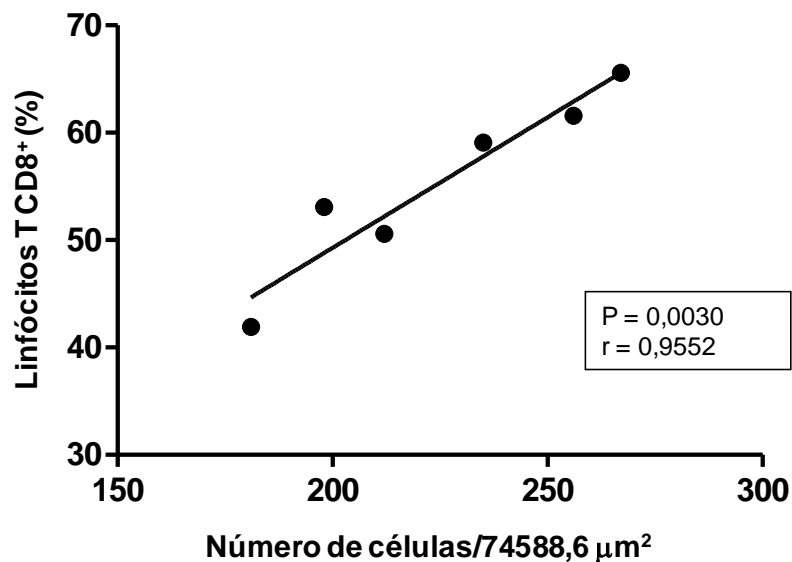


Figura 16 – Correlação entre a porcentagem de Linfócitos TCD8⁺ e o número de células encontrados no músculo cardíaco dos animais primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente re infectados alternadamente (RE2).

A grande variabilidade na severidade dos sintomas da doença de Chagas pode estar relacionada a inúmeros fatores, dentre eles: cepa do parasito (Montamant *et al.*, 1996; Vago *et al.*, 2000), carga parasitária (Fernández *et al.*, 1996), imunidade do hospedeiro (Köberle, 1968) e possíveis eventos de reinfecção. Vários estudos têm investigado este aspecto, tanto na infecção humana quanto na experimental (Chagas, 1909; Chagas, 1932; Prata, 1959; Dias, 1963; Andrade *et al.*, 1968; ; Macedo, 1976; Coura *et al.*, 1984; Dias, 1985; Davila *et al.*, 1987; Revelli *et al.*, 1990; Lauria-Pires e Teixeira, 1997; Machado *et al.*, 2001; Andrade *et al.*, 2006), no entanto este assunto ainda não está totalmente esclarecido, pois os resultados encontrados se mostram controversos.

Desde os estudos iniciais sobre as manifestações clínicas em indivíduos na fase crônica da infecção chagásica, residentes em áreas endêmicas, era ressaltada a importância das reinfecções como fator de manutenção do parasitismo e agravamento das lesões cardíacas (Chagas, 1909). Avaliações temporais realizadas por Dias em Bambuí (MG), e Macedo em São Felipe (BA) (Dias, 1963; Macedo, 1976), comparando a incidência de cardiopatia chagásica grave em áreas onde o vetor foi eliminado, confirmaram a importância das reinfecções na doença de Chagas.

A transmissão do *T. cruzi* nas áreas endêmicas está diretamente relacionada com a densidade e com o índice de triatomíneos infectados no intradomicílio, bem como com a espécie presente. Assim, indivíduos que permanecem por longos períodos em áreas endêmicas, estão expostos a reinfecções, que podem ocorrer tanto por cepas homólogas (perfis genéticos semelhantes), quanto por cepas heterólogas (distintos perfis genéticos), do parasito. A ocorrência de infecções mistas em um mesmo hospedeiro, vertebrado ou invertebrado, já foi demonstrada em situações naturais (Romanha, 1982; Vago *et al.*, 2000; Mantilla *et al.*, 2010), sugerindo a possibilidade da reinfecção humana pelo *T. cruzi* e evidenciando a importância desta no contexto da patogenia e da epidemiologia da doença de Chagas.

Neste trabalho no qual, em parte, tentamos reproduzir estas condições, procedemos a investigação da possível influência das reinfecções por dois diferentes clones do *T. cruzi*, denominados P209 e IVV, pertencentes a

diferentes grupos genéticos TcI e TcII, respectivamente, em camundongos da linhagem Swiss.

Os quatro meses de acompanhamento dos animais durante a fase crônica foram suficientes para revelar alterações nos perfis das curvas de parasitemia. Os níveis parasitêmicos foram maiores entre os animais inicialmente inoculados com o clone IVV (grupos AP2 e RE2), e os animais expostos à reinfeção (RE1 e RE2) apresentaram prolongamento da parasitemia e não apresentaram níveis de parasitêmicos tão altos, como os característicos de fase aguda. Brumpt (1913) foi o primeiro pesquisador a demonstrar que animais sobreviventes à fase aguda da infecção chagásica adquiriam forte resistência a uma segunda infecção. Em estudos experimentais, diferentes autores têm estudado a influência das reinfeções, e os resultados, assim como os encontrados no presente estudo, apontam para o desenvolvimento de resistência após um primeiro inóculo (Brumpt, 1913; Brener, 1967; Andrade *et al.*, 1970). Esta proteção evitaria um processo de reagudização com altos níveis de parasitemia, como demonstrado por Andrade e colaboradores (Andrade *et al.*, 1968). No entanto, como também já relatado por outros autores, essa resistência é apenas parcial, com prolongamento da parasitemia, propiciando desta forma a manutenção dos parasitos circulantes. Assim, podemos inferir que as reinfeções possuem grande importância na epidemiologia da doença de Chagas, uma vez que o prolongamento da parasitemia com manutenção de parasitos circulantes levaria, em áreas com triatomíneos intradomiciliares, a um aumento da possibilidade de ingestão do parasito pelos vetores e, conseqüentemente, dos índices de infecção.

Foi observada taxa de mortalidade apenas entre os animais inicialmente infectados pelo clone P209, independente do grupo experimental, cujas taxas foram de 33,3% e de 16,6% - grupos AP1 e RE1, respectivamente. Os dados aqui apresentados corroboram resultados já publicados de outros autores que também não observaram aumento da mortalidade entre animais que foram experimentalmente reinfectedos (Lauria-Pires e Teixeira, 1997). Ainda considerando este critério de avaliação, confirmamos que populações do parasito que apresentam características genéticas e fenotípicas distintas, tem fundamental importância no decorrer da infecção. Tal observação é possível,

pois não foi constatado aumento na taxa de mortalidade entre os animais que foram reinfectedados em comparação com o respectivo grupo de animais apenas primoinfectados. Animais reinfectedados podem apresentar uma “memória imunológica” que seria responsável pela eliminação da maior parte dos parasitos logo no local da infecção (Gomez e Garcia *et al.*, 2005), diminuindo assim a taxa de mortalidade entre os animais destes grupos. Uma vez que foi observada relação direta entre a mortalidade e cepa inicialmente inoculada, e não com as reinfecções, confirmamos, sob este aspecto, a afirmativa de Köberle (1956), de que o “destino do chagásico se define na fase aguda”. Juntamente com outros fatores como carga parasitária, virulência da cepa e resposta imune do hospedeiro, o inóculo inicial influencia diretamente no decorrer da infecção (Andrade *et al.*, 1968).

O *T. cruzi* é capaz de penetrar em uma grande variedade de células do hospedeiro vertebrado, sendo que o sucesso de sua penetração e sobrevivência no interior destas células depende de diversas moléculas presentes na superfície celular e, até mesmo do próprio parasito, que são essenciais no processo de infecção (Andrade e Andrews, 2005). Essas moléculas são capazes de estimular a resposta imune inata do hospedeiro (Gazzinelli e Denkers, 2006), sendo esta primeira resposta frente ao contato com o parasito fundamental para o controle do parasitismo, bem como para a orientação da resposta imune adaptativa, ativada logo a seguir. Este fato justifica as análises de parâmetros imunológicos e histopatológicos desenvolvidos ao longo deste estudo.

Foi proposta a avaliação da resposta imune através da identificação de populações celulares presentes no sangue dos animais. Nesse sentido, foi realizada a imunofenotipagem das células mononucleares do sangue periférico (monócitos, células NK, linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺) a fim de avaliar possíveis alterações, causadas pela infecção e/ou reinfecção por diferentes clones do *T. cruzi*.

Os macrófagos e as células NK são provavelmente as células mais importantes na proteção inicial contra o *T. cruzi* (Rottenberg *et al.*, 1988). Os macrófagos possuem grande importância durante a fase inicial da infecção chagásica. Eles podem ser classificados em dois tipos: M1, caracterizados pela

expressão de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , e M2 os quais são identificados pela expressão de outras citocinas como a IL-4 e a IL-13 (Movahedi *et al.*, 2010). Os macrófagos M1 são potentes células efetoras que apresentam antígenos e produzem grandes quantidades de citocinas pró-inflamatórias (Verreck *et al.*, 2004; Biswas *et al.*, 2006). Já os macrófagos do tipo M2 possuem pouca capacidade de apresentar antígenos, no entanto são mais bem adaptados à eliminação de restos celulares, promoção da angiogênese e reparação e remodelação de tecidos danificados, através do processo de fibrose (Mantovani, 2004).

A primoinfecção pelo clone P209 (grupos AP1 e RE1) proporcionou um aumento significativo no percentual de monócitos circulantes em relação aos demais grupos, resultado que reflete nos baixos níveis de parasitemia e na menor quantidade de infiltrado inflamatório apresentado por estes animais. Também não foi constatada fibrose no músculo cardíaco dos animais destes grupos, sendo, uma possível explicação, o fato de que os macrófagos que estariam migrando para o foco inflamatório presente no coração estariam se diferenciando no tipo M1, que não induzem reparo tecidual, e deste modo não desencadeiam o processo fibrótico (Movahedi *et al.*, 2010).

As células *Natural killer* (NK) são as primeiras a atuarem na resposta imune inata. Elas possuem mecanismos semelhantes aos dos linfócitos T citotóxicos (Lieberman, 2003), sendo responsáveis pela produção de IFN- γ , citocina que irá promover a estimulação da atividade microbicida dos macrófagos. Ao investigarmos o perfil fenotípico destas células no sangue periférico dos animais não foi constatada diferença no percentual de células entre os diferentes grupos. Análises do perfil fenotípico de linfócitos no sangue periférico de humanos com doença de Chagas aguda indicam que as células NK são ativadas pelo *T. cruzi* anteriormente ao desenvolvimento da imunidade celular (Sathler-Avelar *et al.*, 2003). Como as análises do presente estudo foram realizadas na fase crônica, a produção de IFN- γ pelas células NK já não seria tão importante, pois os linfócitos T são capazes de produzir maior quantidade desta citocina neste estágio da infecção.

A importância dos linfócitos TCD4⁺ e TCD8⁺ no controle da infecção pelo *T. cruzi* tem sido demonstrada tanto em infecções humanas quanto

experimentais (Rosemberg *et al.*, 1992; Silva *et al.*, 1999; Tarleton *et al.*, 1996). Considerando que a infecção pelo *T. cruzi* também pode promover alterações na resposta imune adaptativa, como a ativação policlonal de linfócitos, produção de auto-anticorpos e danos no músculo cardíaco do hospedeiro (Petry e Eisen, 1989; Sun e Tarleton, 1993), foi realizada a análise fenotípica dos linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ no sangue periférico dos camundongos.

Observou-se uma redução no percentual de linfócitos TCD4⁺ nos animais dos grupos que foram inicialmente infectados pelo clone IVV (grupos AP2 e RE2), em relação ao grupo de animais não infectado (NI). Independente do modelo experimental utilizado em estudos sobre a infecção chagásica, a resposta inflamatória desencadeada pela infecção do tecido, envolve o recrutamento coordenado de componentes do sangue para o local (Franco *et al.*, 2003). Provavelmente, a primoinfecção pelo clone IVV desencadeou um intenso recrutamento das células TCD4⁺ para os focos inflamatórios, tanto do coração quanto do músculo esquelético, onde estariam concentradas. Uma segunda hipótese é que a infecção por este clone ocasionaria uma depleção nos órgãos linfoides dessa população celular, pois já foi demonstrado por outros autores que durante a infecção pelo *T. cruzi* pode ocorrer a apoptose dessas células no baço (de Meis *et al.*, 2009). É importante ressaltar que os animais destes grupos também apresentaram menores níveis de parasitemia e taxa de mortalidade nula.

Não houve alteração na porcentagem de linfócitos TCD8⁺, células cruciais para o controle do *T. cruzi* durante a fase aguda da infecção (Padilla *et al.* 2009), em nenhum dos grupos experimentais. Na fase crônica, a predominância destas células no infiltrado inflamatório cardíaco aponta que elas podem estar envolvidas na formação de lesões cardíacas (Silverio *et al.*, 2012). Observou-se uma correlação positiva entre a porcentagem de células TCD8⁺ e a quantidade de infiltrado inflamatório no músculo cardíaco dos animais primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente reinfectados (RE2). A partir deste resultado podemos inferir que estas células estão diretamente envolvidas na formação das lesões ocasionadas pela inflamação neste tecido (Silverio *et al.*, 2012).

A partir das análises histológicas observou-se que os animais primoinfectados pelo clone IVV (AP2 e RE2) apresentaram infiltrado inflamatório em relação aos animais do grupo controle não infectado (NI), tanto no coração quanto no músculo esquelético. Como já mencionado anteriormente, em conjunto com os resultados obtidos a partir da imunofenotipagem, os dados do perfil inflamatório sugerem uma queda no percentual de células CD4⁺ no sangue periférico dos animais primoinfectados pelo clone IVV (AP2 e RE2), devido ao recrutamento destas para o local da inflamação nos tecidos cardíaco e esquelético. De acordo com os resultados encontrados por Andrade e colaboradores (1968), que mostram que não há diferença entre o grau da reação inflamatória entre os animais inoculados uma única vez ou reinoculados, não foi constatado no presente estudo a intensificação do infiltrado inflamatório em animais que passaram por reinfecções alternadas em comparação com os grupos que sofreram apenas uma infecção.

Diversos autores sugerem que indivíduos que habitam áreas endêmicas para doença de Chagas por um prolongado período de tempo podem estar sujeitos a reinfecções pelo *T. cruzi*, provavelmente agravando o processo patológico da doença (Dias, 1963; Ávila *et al.*, 1987). No entanto, evidências que suportam esta teoria têm sido bastante controversas. Reinfecções em camundongos e em ratos, por exemplo, podem não levar ao desenvolvimento de lesões patológicas mais severas (Andrade *et al.*, 1968; Revelli *et al.*, 1990; Lauria-Pires e Teixeira, 1997). Em hamsters, a reinfecção parece ser um dos fatores que influenciam no desenvolvimento do processo inflamatório, embora ele não seja um fator determinante, pois os animais infectados uma ou duas vezes podem apresentar lesões moderadas e severas enquanto animais reinfectados cinco vezes podem apresentar lesões mais leves (Cabrine-Santos *et al.*, 2001). Em cães, a reinoculação do *T. cruzi* não alterou a evolução dos danos cardíacos, sendo que estes permaneceram na fase indeterminada durante todo o experimento (Machado *et al.*, 2001). Em conjunto estes resultados demonstram a variabilidade entre os resultados histopatológicos encontrados a partir de experimentos de reinfecção.

Também foi realizada a análise de deposição de colágeno no coração e músculo esquelético com a finalidade de quantificar a fibrose. A fibrose reparativa é um processo consequente da persistente inflamação presente no tecido.

Apesar de ainda apresentarem intenso infiltrado inflamatório, os animais reinfectados pelo clone IVV (grupo RE2), apresentaram maior área de deposição de colágeno, tanto no músculo cardíaco quanto no músculo esquelético, quando comparados aos demais grupos experimentais. No músculo cardíaco também foi observada maior área de fibrose nos animais infectados uma única vez pelo clone IVV (grupo AP2) em relação ao grupo infectado uma única vez por P209 (AP1). O aumento na fibrose pode estar diretamente relacionado com uma reação inflamatória composta principalmente por células T e macrófagos. As células inflamatórias poderiam promover a fibrose pela liberação de citocinas que ativam os fibroblastos (Rossi, 1998). Apesar de terem apresentado menor número de monócitos e uma diminuição no número de linfócitos TCD4⁺ no sangue periférico, os animais infectados pelo clone IVV (grupos AP2 e RE2), apresentaram um intenso infiltrado inflamatório com consequente fibrose reparativa. A fibrose se inicia com a finalidade substituir os tipos celulares perdidos a partir da lesão inflamatória (Rossi, 1998). No entanto, tanto a fibrose difusa quanto a focal interrompem, parcial ou totalmente, a disposição dos feixes musculares, provocando danos ao tecido (Mady *et al.*, 1999). Desta forma, a precoce deposição de colágeno nestes animais do grupo reflete o processo de cicatrização de tecidos que foram lesionados devido à formação de um intenso infiltrado inflamatório desencadeado a partir da reinfecção pelo clone IVV do *T. cruzi*.

De acordo com Bustamante e colaboradores (2007), a gravidade da cardiopatia apresentada na fase crônica estaria diretamente relacionada da cepa do parasito utilizada na infecção. Ao contrário do que foi encontrado a partir do nosso estudo, eles também apontaram que as reinfecções durante a fase aguda poderiam produzir uma fase crônica mais grave nos animais. Provavelmente, a estrutura genética da população do *T. cruzi* pode determinar o curso clínico da doença (Macedo *et al.*, 2004)

A variabilidade dos resultados encontrados a partir de estudos de reinfecção com diferentes modelos animais pode ocorrer devido à variação de protocolos utilizados (Gomez e Garcia *et al.*, 2005). Por exemplo, em um estudo realizados com cães, as análises histopatológicas foram realizadas 10 meses após o último inóculo, não estabelecendo correlação entre a reinfecção e cardiopatia grave (Machado *et al.*, 2001). Por outro lado, em modelos murinos as análises histopatológicas foram realizadas 1 ou 2 meses após a última reinoculação do parasito, demonstrando uma correlação positiva entre a reinfecção e patologias mais graves (Cabrine-Santos *et al.* 2001; Bustamante *et al.* 2002).

Este estudo demonstra que infecções sucessivas pelo *T. cruzi* podem ocasionar o agravamento das lesões teciduais em camundongos. No entanto, a sequência de inoculação dos diferentes clones influencia os resultados encontrados (Andrade *et al.*, 2006).

Os animais reinfectedos apresentaram prolongamento da parasitemia;

Os níveis de parasitemia observados após as reinfecções foram menores que os observados na fase aguda, o que caracteriza um processo de resistência a uma segunda infecção desenvolvida após o primeiro inóculo;

Foram observadas alterações na intensidade do infiltrado inflamatório, tanto no coração quanto no músculo esquelético, entre os animais primoinfectados com o clone IVV (AP2 e RE2), não estando relacionadas às reinfecções;

Entre os animais primoinfectados pelo clone IVV e posteriormente reinfectedos alternadamente (grupo RE2), detectou-se maior deposição de colágeno, tanto no músculo cardíaco, quanto no esquelético;

Os resultados apresentados sugerem que tanto a genética do parasito quanto as reinfecções, promovem variações em nível parasitológico, imunológico e histopatológico, o que teria repercussão na evolução da infecção.

8 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Alvarenga NJ, Brener Z. (1978). Development of *Trypanosoma cruzi* in the vector in the absence of blood. *Acta Trop*, v. 35, n. 4, p. 315–317.
- Andrade LO, Galvão LMC, Meirelles MNSL, Chiari E, Pena SDJ, Macedo AM. (2010). Differential tissue tropism of *Trypanosoma cruzi* strains: an in vitro study. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, p. 6 -105.
- Andrade SG, Campos RF, Sobral KSC, Magalhães JB, Guedes RSP, Guerreiro ML. (2006). Reinfections with strains of *Trypanosoma cruzi*, of diferente biotopes as a factor of aggravation of myocarditis and myositis in mice. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, n. 1, p. 1-8.
- Andrade SG. (1974). Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Rev Pat Trop*, p. 65-121.
- Andrade SG, Andrade, ZA. (1968). Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev Inst Med Trop*, v. 10, n. 3, p. 180-187.
- Andrade LO e Andrews NW. (2005). The *Trypanosoma cruzi*-hostcell interplay: location, invasion, retention. *Nat Rev Microbiol*, v. 3, n. 10, p. 819–823.
- Andrade SG, Carvalho ML e Figueira RM. (1970). Caracterização morfológica e histopatológica de diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Gaz Méd Bahia*, p. 32-42.
- Andrade SG, Magalhães JB, Sobral KSC, Rosado AP, Oliveira FLS. (2006). Caracterização de cepas do *Trypanosoma cruzi* isoladas durante o surto agudo de doença de Chagas por transmissão oral, em Santa Catarina, Brasil. XLII Congresso Teresina, março de 2006. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, n. 4, p. 370-375.
- Anonymous. (1999). Recommendations from a satellite meeting. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, n. 1, p. 429-432.
- Ávila H, Beloscar JS, Bottasso AO e Morini JC. (1987). Alteraciones electrocardiográficas en individuos infectados com *Trypanosoma cruzi* com distinto tiempo de residência em áreas de alta endemicidad. *Medicina* (Buenos Aires), v. 47, n. 2, p. 154–158.
- Biswas SK, Gangi L, Paul S, Schioppa T, Sacconi A, Sironi M, Bottazzi B, Doni A, Vincenzo B, Pasqualini FI. (2006). A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood*, v. 107, n. 5, p. 2112–2122.
- Borges CRB, Rodrigues-Junior V, Reis MA, Castellano LR, Chica JEL, Pereira SAL, Santos ES, Rodrigues DBR. (2009). Papel do óxido nítrico no desenvolvimento de lesões cardíacas na fase aguda da infecção

- experimental pelo *Trypanosoma cruzi*. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 42, n. 2, p. 170-174.
- Brener Z. (1962). Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*, v. 4, p. 389-396.
- Brener Z. (1967). Alguns aspectos de imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*, v. 9, n. 4, p. 233-238.
- Brener Z. (1969). The behaviour of slender and stout forms of *Trypanosoma cruzi* in the blood-stream of normal and immune mice. *Ann Trop Med Parasitol*, v. 63, n. 2, p. 215-220.
- Brener Z. (1972). A new aspect of *Trypanosoma cruzi* life cycle in the invertebrate host. *J Protozool*, v.19, n. 1, p. 23-27.
- Brener Z. (1986). Why vaccines do not work in Chagas' Disease. *Parasitol Today*, v. 2, n. 7, p. 196-197
- Brener Z. (1992). *Trypanosoma cruzi*: taxonomy, morphology and life cycle. Cap 3, p. 13-30. In Wendel S, Brener Z, Camargo ME, Rassi A (eds). Chagas Disease (American Trypanosomiasis): its impact on transfusion and clinical medicine.
- Brener Z, Andrade Z. (1979). *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. *Guanabara Koogan*, Rio de Janeiro, 643 pp.
- Brener Z e Chiari E. (1963). Morphological variations observed in different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*, v. 19, n. 2, p. 220-224.
- Brener Z, Gazzinelli RT. (1997). Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. *Int Arch Allergy Immunol*, v. 114, n. 2, p. 103-110.
- Brisse S, Barnabe C e Tibayrenc M. (2000). Identification of six *Trypanosoma cruzi* phylogenetic lineages by random amplified polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Int J Parasitol*, v. 30, n. 1, p. 35-44.
- Brumpt E. (1913). Précis de parasitologie. 2.éd. Paris: Masson.
- Breniere SF, Bosseno MF, Magallón-Gastélum E, Soto-Gutiérrez MM, Kasten-Monges MJ, Barraza-Salas JH, Romero-Paredes JJ, Lozano-Kasten FJ (2010). Community participation and domiciliary occurrence of infected *Meccus longipennis* in two Mexican villages in Jalisco state. *Am J Trop Med Hyg*, v. 83, p. 382-387.

- Bustamante J, Novarese M, Rivarola HW, Lo Presti MS, Fernandez AR. (2007). Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. *Parasitol Res*, v. 100, n. 6, p. 1407–1410.
- Bustamante J, Rivarola H, Fernández A, Enders J, Fretes R, Palma J, Paglini-Oliva P. (2002). *Trypanosoma cruzi* re-infections in mice determine the severity of cardiac damage. *Int J Parasitol*, v. 32, n. 7, p. 889-896.
- Cabrine-Santos M, Lages SE, Chapadeiro E & Ramirez LE. (2001). *Trypanosoma cruzi*: characterization of reinfection and search for tissue tropism in hamsters (*Mesocricetus auratus*). *Exp Parasitol*, v. 99, n. 3, p. 160–167.
- Carayannopoulos LN, Yokoyama WM. (2004). Recognition of infected cells by natural killer cells. *Curr Opin Immunol*, v. 16, n. 1, p. 26–33.
- Cardillo F, Voltarelli JC, Reed SG e Silva JS. (1996). Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. *Infect Immun*, v. 64, p. 128–134
- Cardinal MV, Lauricella MA, Ceballos LA, Lanati L, Marcet PL, Levin MJ, Kitron U, Gürtler RE, Schijman AG. (2008). Molecular epidemiology of domestic and sylvatic *Trypanosoma cruzi* infection in rural northwestern Argentina. *Int J Parasitol*, v. 38, n. 13, p. 1533-1543.
- Castro AM, Vinaud MC, Teixeira A. (2009). Chagas disease: a global health problem. In: Emerging Chagas Disease. *Bentham Book*, p. 18-23.
- Chagas C. (1909). Nova tripanozomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, agente etiológico de nova entidade morbida do homem. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, p. 159-218.
- Chagas CRJ. (1910). Nova entidade mórbida do homem. *Brazil-Medico*, v. 24, n. 43-44-45, p. 423-428.
- Chagas E. (1932). Novos estudos sobre a forma cardíac da Trypanozomíase Americana. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 26, p. 329-338.
- Chagas E. (1935). Revisão dos processos patogênicos da tripanozomíase americana. *9º Reunión de la Sociedad Argentina de Patología Regional*, p.1-9.
- Corbett C, Ribeiro E, Prianti U JR, Habr-Gama MG, Okumura AM e Gama-Rodrigues J. (2001). Cell-mediated immune response in megacolon from patients with chronic Chagas' disease. *Dis Colon Rectum*, v. 44, n. 7, p. 993-998.

- Coura JR. (2006). Transmission of chagasic infection by oral route in the natural history of Chagas disease. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 39, n. 3, p. 113-117.
- Coura JR. (2007). Chagas disease: what is known and what is needed--a background article. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 113-122.
- Coura JR, Abreu JL, Dubois LEG, Correia-Lima F, Arruda Junior E, Willcox HPF, Anunziato N e Petana W. (1984). Morbidade da doença de Chagas. II. Estudos seccionais em quatro áreas de campo no Brasil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 79, n. 1, p. 101-124.
- Coura JR, Borges-Pereira J. (2010). Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. *Acta Trop*, v. 115, n. 1-2, p. 5-13.
- Culbertson JT, Kolodny MH, Maxwell H. (1938). Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. *J Parasitol*, n. 24 p.83-90,
- Cura CI, Mejia-Jaramillo AM, Duffy T, Burgos JM, Rodriguero M. (2010). *Trypanosoma cruzi* I genotypes in different geographical regions and transmission cycles based on a microsatellite motif of the intergenic spacer of spliced-leader genes. *Int J Parasitol*, v. 40, n. 14, 1599–1607.
- D'avila DA, Guedes PM, Castro AM, Gontijo ED, Chiari E, Galvão LM. (2009). Immunological imbalance between IFN-gamma and IL-10 levels in the sera of patients with the cardiac form of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 1, p. 100-105.
- Davila H, Beloscar JS, Bottasso, AO, Morino, JC. (1987). Alteraciones electrocardiograficas em indivíduos infectados com o *Trypanosoma cruzi* com distinto tempo de residência em área de alta endemecidad. *Medicina*, v. 47, n. 2, p. 154-158.
- de Meis J, Morrot A, Farias-de-Oliveira D, Villa-Verde D, Savino W. (2009). Differential regional immune response in Chagas disease. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 3, n. 7, p. 417.
- Dias E. (1934). Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* v. 28, p. 1-110
- Dias E. (1963). Os efeitos da superinfecção sobre a evolução da cardiopatia crônica chagásica. *Rev Goiana Med*, v. 9, p. 233-239.
- Dias JC. (1979). Mecanismos de transmissão. Brener, Z, Andrade Z, ed *Trypanosoma cruzi* e a doença de Chagas. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 152-174.
- Dias JC. (1985). História natural. In: Cançado R. e Chuster M eds. Cardiopatia chagásica. *Fund Carlos Chagas de Pesquisa Médica*, p. 99-113.

- Dias JC. (1992). Epidemiology of Chagas disease (American trpanosomiasis): Its impact on Transfusion and Clinical Medicine. *ISBT*, p. 49-80.
- Dias JC. (2000). Epidemiological surveillance of Chagas disease. *Cad Saude Publica*, v. 2, p. 43-59.
- Dias JC. (2007). Southern Cone Initiative for the elimination of domestic populations of *Triatoma infestans* and the interruption of transfusional Chagas disease. Historical aspects, present situation, and perspectives. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, n. 1, p. 11-18.
- Dias JC, Amato-Neto V. (2011). Prevenção referente às modalidades alternativas de transmissão do *Trypanosoma cruzi* no Brasil. *Rev Soc Bras Med*, v. 44, n.2, p. 68-72.
- Dias JC, Prata A e Correia D. (2008). Problems and perspectives for Chagas disease control: in search of a realistic analysis. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 41, p. 193-196.
- Dias JC e Schofield C. (1999). The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 103-121.
- Dias JC, Silveira AC, Schofield CJ. (2002). The Impact of Chagas Disease Control in Latin America - A Review. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, vol. 97, n. 5, p. 603-612.
- Fernández AR, Enders JE, Rivarola HW, Paglini PA, Palma JA. (1996). Cardiac b receptors' density or affinity modified by different *Trypanosoma cruzi* amount. *Acta Physiol. Pharmacol Ther Latinoam*, v. 47, n. 2, p. 137-43.
- Ferreira RC, Ianni BM, Abel LC, Buck P, Mady C, Kalil J. (2003). Increase plasma levels of tumor necrosis factor-alpha in asymptomatic/"indeterminate" and Chagas disease cardiomyopathy patients. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 3, p. 407-411.
- Fraco DJ, Vago AR, Chiari E, Meira FC, Galvão LM e Machado CR. (2003). *Trypanosoma cruzi*: mixture of two populations can modify virulence and tissue tropism in rat. *Exp. Parasitol*, v. 104, n. 1-2, p. 54-61.
- Freitas JLP, Biancalana A, Amato-Neto V, Nussenzweig V, Sonntag R, Barreto JG. (1952). Moléstia de Chagas em Bancos de Sangue na capital de São Paulo. *O Hospital*, v. 41, n. 2, p. 99-106.
- Freitas JM, Lages-Silva E, Crema E, Pena SD e Macedo AM. (2005). Real time PCR strategy for the identification of major lineages of *Trypanosoma cruzi* directly in chronically infected human tissues. *Int .J. Parasitol*, v. 35, n. 4, p. 411-417.

- Gazzinelli RT, Denkers EY. (2006). Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. *Nat Rev Immunol*. v. 6, n.12, p. 895-906.
- Gomes JA, Bahia-Oliveira, LM, Rocha MO, Martins-Filho AO, Gazzinelli G, Correa-Oliveira R. (2003). Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. *Infect Immun*, v. 71, n. 3, p. 1185-1193.
- Gomez-Garcia L, Alejandre-Aguilar OR, Aranda-Frausto A, Lopez R e Montreonn M. (2005). Description of inflammation and cytokine profile at the inoculation site and in heart tissue of mice re-infected with *Trypanosoma cruzi* vector derived-metacyclic trypomastigotes. *Parasitol*, v. 130,n. 5, p. 511–522.
- Koberle F. (1956). Patogênese dos megas. *Rev. Goiana Med*, v. 2, p. 101-110.
- Koberle F. (1968). Chagas disease and Chagas syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. *Advances in Parasitology*, v. 6, p. 63-116.
- Kollien, AH, Schaub GA. (2000). The development of *Trypanosoma cruzi* in Triatominae. *Paras. Today*, v. 16, n. 9, p. 381-387.
- Kumar S, Tarleton RL. (2001). Antigen-specific Th1 but not Th2 cells provide protection from lethal *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Immunology*, v. 166,n. 7, p. 4596-4603.
- Lauria-Pires L e Teixeira AR. (1997). Superinfections with genetically characterized *Trypanosoma cruzi* clones did not aggravate morbidity and mortality in BALB/c mice. *J. Parasitol*, v. 83, n. 5, p. 819–824.
- Leavey JK e Tarleton RL. (2003). Cutting edge: dysfunctional CD8+ T cells reside in nonlymphoid tissues during chronic *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol*, v. 170, n. 5, p. 2264-2268.
- Lewis MD, Jonathan MA, Matthew YEO, Hernán J, Carrasco, Martin S, Llewellyn e Michael A, Miles. (2009). Genotyping of *Trypanosoma cruzi*: Systematic Selection of Assays Allowing Rapid and Accurate Discrimination of All Known Lineages. *Am J Trop Med Hyg*; v. 81, n. 6, p.1041–1049.
- Lieberman J. (2003). The ABCs of granule-mediated cytotoxicity: new weapons in the arsenal. *Nat. Rev. Immunol*, v. 3, n. 5, p. 361–370.
- Macedo V. (1976). Influência da exposição à reinfeção na evolução da doença de Chagas – Estudo longitudinal de cinco anos. *Rev. Patol. Trop*, v. 5, n. 1, p. 33-116.
- Macedo AM, Machado CR, Oliveira RP, Pena SDJ. (2004). *Trypanosoma cruzi*: genetic structure of populations and relevance of genetic variability to the

- pathogenesis of Chagas disease. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 99, n. 1, p. 1-12.
- Machado EMM, Fernandes AJ, Dias JCP. (2001). A study of experimental reinfection by *Trypanosoma cruzi* in dogs. *Am J. Med. Hyg*, v. 65, n. 6, p. 958-965.
- Macina RA, Arauzo S, Reyes MB, Sanchez DO, Bamzombrio MA, Montamat EE, Solari A, Frasch ACC. (1987). *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. *Mol. Biochem. Parasitol*, v. 25, n. 1, p. 45-53.
- Mady C, Ianni BM, Arteaga E. (1999). Relation between interstitial myocardial collagen and the degree of clinical impairment in Chagas' disease. *Amer. J. Cardiol*, v. 84, n. 3, p. 354-356.
- Mantilla JC, Zafra GA, Macedo AM, González CI. (2010) Mixed infection of *Trypanosoma cruzi* I and II in a Colombian cardiomyopathic patient. *Hum Pathol*, v. 41, n. 4, p. 610–613.
- Mantovani A, Allavena P, Sica A. (2004). Tumour-associated macrophages as a prototypic type II polarised phagocyte population: role in tumour progression. *Eur. J. Cancer*, v. 40, n. 11, p. 1660–1667.
- Martin D e Tarleton R. (2004) Generation, specificity, and function of CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunol Rev*, v. 201, p. 304-317.
- Miles MA, Souza A, Povoá M, Shaw JJ, Lainson R e Toye PJ. (1978) Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, v. 272, n. 5656, p. 819-821.
- Miles MA, Toye PJ, Oswald SC e Godfrey DG. (1977). The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Trans R. Soc. Trop. Med. Hyg*, v. 71, n. 3, p. 217-225.
- Minoprio P, Itohara S, Heusser C, Tonegawa, S, Coutinho A. (1989). Immunobiology of murine *T. cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunol Rev*. v. 112, p. 183-207.
- Movahedi K, Laoui D, Gysemans C, Baeten M, Stangé G, Van den Bossche J, Mack M, Pipeleers D, In't Veld P, De Baetselier P, Van Ginderachter JA. (2010). Different tumor microenvironments contain functionally distinct subsets of macrophages derived from Ly6C(high) monocytes. *Cancer Res*, v. 70, n. 14, p. 5728-5739.

- Moncayo, A. (2003). Chagas disease: Current epidemiological trends after the interruption of vectorial and transfusional transmission in the Southern Cone Countries. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 98, n. 5, p. 577-591.
- Moncayo, A., Ortiz Yanine MI. (2006). An update on Chagas disease (human American trypanosomiasis). *Ann Trop Med Parasitol*, v. 100, n. 8, p. 663-667.
- Montamat EE, De Luca D'oro GM, Gallerano RH, Sosa R e Blanco A. (1996). Characterization of *Trypanosoma cruzi* populations by zymodemes: correlation with clinical picture. *Am J Trop Med Hyg*, v. 55, n. 6, p. 625-628.
- Myler PJ. (1993). Molecular variation in trypanosomes. *Acta Trop*, v. 53, n. 3-4, p. 205-225.
- Padilla AM, Bustamante JM, Tarleton RL. (2009). CD8+ T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Cur Opin Immunol*, v. 21, n. 4, p. 385-390.
- Petry K e Eisen H. (1989). Chagas disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol Today*, v. 5, n. 4, p. 111-116.
- Prata A. (1959). Prognóstico e complicações da doença de Chagas. *Rev. Goiana de Med*, v. 5, p. 87-96.
- Prata A. (2001). Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. *Lancet Infect Dis*, v. 1, n. 2, p. 92-100.
- Reis DD, Jones EM, Tostes JRS, Lopes ER, Gazzinelli G, Colley DG, Mccurley TL. (1993). Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor- α + cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes. *Am J Trop Med Hyg*, v. 48, n. 5, p.637-644.
- Revelli S, Berra H, Valenti J, Moreno H, Bernasconi M, Poli H, Morini J. (1990). Efecto de la reinfección sobre la evolución de ratas infectadas con *Trypanosoma cruzi*. *Rev Inst Med Trop*, v. 32, n. 4, p. 260-268.
- Rodrigues CM, Valadares HMS, Francisco AF, Arantes JM, Campos CF, Teixeira-Carvalho A, Martins-Filho O, Araújo MSS, Arantes RME, Chiari E, Franco GR, Machado CR, Pena SDJ, Faria AMC, Macedo AM. (2010). Coinfection with different *Trypanosoma cruzi* strains interferes with the host immune response to infection. *PLoS Negl Trop Dis*, v. 4, n. 10, p. 1-15.
- Romanha AJ, Da Silva Pereira AA, Chiari E e Kilgour V. (1979). Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: changes after prolonged subculture. *Comp Biochem Physiol*, v. 62, n. 2, p. 139-142.

- Romanha AJ. (1982). Heterogeneidade Enzimática em *Trypanosoma cruzi*. Belo Horizonte. (Doctoral Thesis in Sciences) - Universidade Federal de Minas Gerais.
- Rosemberg S, Chaves CJ, Higuchi ML, Lopes MB, Castro LH, Machado LR. (1992). Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*, v. 42, n. 3, p. 640–642.
- Rossi MA. (1998). Fibrosis and inflammatory cells in human chronic chagasic myocarditis: scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. *Int. J. Cardiol*, v. 66, n. 2, p. 183-194.
- Russo M, Starobinas N, Minoprio P, Coutinho A, Hontebeyrie-Joskowicz M. (1988). Parasitic load increase and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi* infected mice after inactivation of helper T cells. *Ann Inst Pasteur/Immunol*, v. 139, n. 3, p. 225-236.
- Rottenberg, Cardoni MRL, Andersson R, Segura EL e Orn A. (1988). Role of T helper/inducer cells as well as natural killer cells in resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Scand. J. Immunol*, v. 28, n. 5, p. 573–582.
- Sathler-Avelar R, Lemos EM, Reis DD, Medrano-Mercado N, Araujo-Jorge TC, Antas PR, Correa-Oliveira R, Teixeira-Carvalho A, Eloi-Santos SM, Favato D, Martins-Filho AO. (2003). Phenotypic features of peripheral blood leucocytes during early stages of human infection with *Trypanosoma cruzi*. *Scand. J. Immunol*, v. 58, n. 6, p. 655–663.
- Schaub GA. (1989). *Trypanosoma cruzi*: quantitative studies of development of two strains in small intestine and rectum of the vector *Triatoma infestans*. *Exp. Parasitol*, v. 68, n. 3, p. 260-273.
- Schofield CJ e Dias JC. (1991). A cost-benefit analysis of Chagas disease control. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 86, n. p. 285-295.
- Schofield CJ e Dias JC. (1999). The Southern Cone Initiative against Chagas disease. *Adv.Parasitol*. v. 42, p. 1-27.
- Schofield CJ e Galvão C. (2009). Classification, evolution, and species groups within the Triatominae. *Acta Tropica*, v. 110, n. 2-3, p. 88-100.
- Silva N, O'Bryan L, Medeiros E, Holand H, Suleiman J, de Mendonca JS, Patronas N, Reed SG, Klein HG, Masur H, Badaro R. (1999). *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in HIV-infected patients. *J. Acquir Immune DeficSyndr Hum Retrovirol.*, v. 20, n. 4, p. 342–349.
- Silveira AC. (1992). E após a erradicação dos triatomíneos exclusivamente domiciliados? *Rev Soc Bras. Med Trop*, v. 25, n. 3, p. 30.

- Silverio JC, de-Oliveira-Pinto LM, da Silva AA, de Oliveira GM, Lannes-Vieira J. (2010). Perforin-expressing cytotoxic cells contribute to chronic cardiomyopathy in *Trypanosoma cruzi* infection. *Int J Exp Pathol*, v. 91, n. 1, p. 72-86.
- Silverio JC, Pereira IR, Cipitelli Mda C, Vinagre NF, Rodrigues MM, Gazzinelli RT. (2012). CD8+ T-cells expressing interferon gamma or perforin play antagonistic roles in heart injury in experimental *Trypanosoma cruzi*-elicited cardiomyopathy. *PLoS Pathog*, v. 8, n. 4, e1002645.
- Simpson L. (1987). The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication and evolution. *Ann. Rev. Microbiol*, v. 41, p. 363-382.
- Soares VA, Marsden PD. (1986). Penetração do *Trypanosoma cruzi* através do ponto da picada de triatomíneos. *Rev Soc Bras Med Trop*, v. 19, n. 3, p. 165-166.
- Souto RP, Fernandes O, Macedo AM, Campbell DA e Zingales B. (1996). DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*, v. 83, n. 2, p. 141-152.
- Sturm NR, Campbell D A. (2009). Alternative lifestyles: The population structure of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Trop*, v. 10, p. 1016.
- Sun J e Tarleton RL. (1993). Predominance of CD8⁺ T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Am J Trop Med Hyg*, v. 48, n. 2, p. 161-169.
- Tarleton RL. (2001). Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease. *Int J Parasitol*, v. 31, n. 5-6, p. 549-553.
- Tarleton RL, Grusby MJ, Postan M e Glimcher LH. (1996). *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*, v. 8, n. 1, p. 13-22.
- Tarleton RL, Sun J, Zhang L, Postan M. (1994) Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infect Immun*, v. 62, n. 5, p. 1820-1829.
- Talvani A, Rocha MO, Barcelos LS, Gomes YM, Ribeiro AL, Teixeira MM. (2004). Elevated concentrations of CCL2 and tumor necrosis factor-alfa in chagasic cardiomyopathy. *Clin Infect Dis*, v. 38, n. 7, p. 943-950.
- Tibayrenc M. (1995). Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms. *Adv. Parasitol.*, v. 36, p. 47-115.

- Tibayrenc M e Ayala FJ. (2002). The clonal theory of parasitic protozoa: 12 years on. *Trends Parasitol*, v. 18, n. 9, p. 405-410.
- Torres, CM, Tavares BM. (1958). Miocardite no macaco *Cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 56, p. 85-152.
- Vago AR, Andrade LO, Leite AA, D'avila RD, Macedo AM, Adad SJ, Tostes JR, Moreira MC, Filho GB, Pena SD. (2000). Genetic characterization of *Trypanosoma cruzi* directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. *The Am J Pathol*, v. 156, n. 5, p. 1805–1809.
- Verreck FAW, de Boer T, Langenberg DML, Hoeve MA, Kramer M, Vaisberg E, Kastelein R, Kolk A, de Waal-Malefyt R, Ottenhoff THM. (2004) Human IL-23-producing type 1 macrophages promote but IL-10-producing type 2 macrophages subvert immunity to (myco)bacteria. *Proc Natl Acad Sci*, v. 101, n. 13, p. 4560–4565.
- Vespa GN, Cunha FQ, Silva JS. (1994). Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect Immun*. v. 62, n. 11, p. 5177-5182.
- Virreira M, Serrano G, Maldonado L, Svoboda M. (2006). *Trypanosoma cruzi*: typing of genotype (sub)lineages in megacolon samples from bolivian patients. *Acta Trop*, v. 100, n. 3, p. 252-255.
- World Health Organization. (2007). Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases (TDR). Report of scientific group in Chagas disease.
- World Health Organization. (2010). First WHO Report on Neglected Tropical Diseases: working to overcome the global impact of neglected tropical diseases.
- Zhang L, Tarleton RL. (1999). Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. *J Infect Dis*, v. 180, n. 2, p. 480-486.
- Zingales B, Stolf BS, Souto RP, Fernandes O, Briones MR. (1999). Epidemiology, biochemistry and evolution of *Trypanosoma cruzi* lineages based on ribosomal RNA sequences. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, p. 159-164.
- Zingales B, Andrade SG, Briones MRS, Campbell DA, Chiari E, Fernandes O, Guhl F, Lages-Silva E, Macedo AM, Machado CR, Miles MA, Romanha AJ, Sturm NR, Tibayrenc M, Schijman AG. (2009). A new consensus for *Trypanosoma cruzi* intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 104, n. 7, p. 1051-1054.

