UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência do tratamento com benznidazol na resposta imune celular e na miocardite de cães infectados por *Trypanosoma cruzi*.

Autor: Alvaro Fernando da Silva do Nascimento

Orientador: Maria Terezinha Bahia
Coorientador: Ivo Santana Caldas

Ouro Preto, 2014

UNIVERSIDADE FEDERAL DE OURO PRETO
NÚCLEO DE PESQUISAS EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Influência do tratamento com benznidazol na resposta imune celular e na miocardite de cães infectados por *Trypanosoma cruzi*.

Autor: Alvaro Fernando da Silva do Nascimento

Orientador: Maria Terezinha Bahia
Coorientador: Ivo Santana Caldas

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

Ouro Preto

N17i Nascimento, Alvaro Fernando da Silva do.
Influência do tratamento com benznidazol na resposta celular e miocardite de cães infectados pelo Trypanosoma cruzi [manuscrito] / Alvaro Fernando da Silva do Nascimento. - 2014.
77f.: il.: color; grafs; tabs.

Orientador: Profª. Drª. Maria Terezinha Bahia.

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. Tripanosoma cruzi. 2. Inflamação. 3. Cardiopatia congenita. 4. Citocinas. I. Bahia, Maria Terezinha. II. Universidade Federal de Ouro Preto. III. Titulo.

CDU: 616.937

Catalogação: www.sisbin.ufop.br

UFOP

nupeb

Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas

Ata da Banca Examinadora de Defesa de Dissertação Intitulada:

"Influência do tratamento com Benznidazol na resposta celular e miocardite de cães infectados pelo *Trypanosoma cruzi*"

Aos sete dias do mês de abril de 2014, às 9:00, no Auditório do NUPEB da Universidade Federal de Ouro Preto, reuniu-se a Comissão Examinadora da Dissertação do aluno **Álvaro Fernando da Silva Nascimento**. A defesa da dissertação iniciou-se pela apresentação oral feita pelo candidato e, em seguida, arguição pelos membros da banca. Ao final, os membros da banca examinadora reuniram-se e decidiram por ...APROVAR..... o candidato. A concessão do título está condicionada ao cumprimento das demais exigências previstas no Regimento deste Programa.

Membros da Banca Examinadora:

Prof.ª Dr.ª Maria Terezinha Bahia
Presidente (UFOP)

Prof. Dr. Paulo Marcos da Matta Guedes
Examinador (UFRN)

Prof. Dr. Frank Silva Bezerra
Examinador (UFOP)

DATA DA DEFESA: **07/04/2014**

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
NUPEB – ICEB II – sala 49 | Universidade Federal de Ouro Preto
Campus Universitário Morro do Cruzeiro | CEP 35.400-000 – Ouro Preto – MG – Brasil
Tel: 55 (31) 3559 1680 | E-mail: cbiol@nupeb.ufop.br | www.nupeb.ufop.br/cbiol

“Sua tarefa é descobrir o seu trabalho e, então, com todo o coração, dedicar-se a ele.”

Buda

Aos meus pais, Fernando e Syria, pelas diferentes formas pelas quais sempre me incentivaram em tudo que desejei conquistar. Ao meu irmão por me considerar um exemplo e assim me ajudar a permanecer com todos os meus princípios. A Karol, minha companheira de vida, por despertar sentimentos que qualquer ser humano deseja. Agradeço a todos por me ajudarem na eterna luta contra a ignorância. Muito Obrigado.

Agradeço a minha orientadora Terezinha, pela dedicação e por ser a melhor orientadora que poderia esperar, além de me fazer sentir como um filho.

Ao professor André Talvani que ainda considero como orientador, apesar dos desencontros da vida acadêmica.

Agradeço aos meus pais, Fernando e Syria, pelo apoio, companheirismo e todos os melhores adjetivos que um dicionário pode ter. Nem todos esses adjetivos são suficientes para descrever a sorte de ser filho de vocês.

Ao meu irmão por sempre me lembrar de minha capacidade, mesmo quando não considerava tê-las.

A toda minha família por me proporcionarem tantos momentos de paz e descontração, tão necessários para conseguir vencer difícil jornada.

Agradeço a minha companheira, Karolina, por compartilhar tantas coisas comigo. Algumas mais fáceis que outras mas sempre superáveis desde que a seu lado. Você fará sempre parte da minha vida.

Aos meus sogros pelo acolhimento e confiança que sempre fizeram parte de nossa relação.

Agradeço ao professor e amigo, Ivo, por simplesmente me ensinar quase tudo que sei sobre pesquisa.

A Lívia e Lud pelos diversos auxílios em diversos momentos. Sua ajuda foi indispensável.

Agradeço a todos os amigos do Laboratório de Doença de Chagas em especial ao amigo sempre presente Dário e as amigas de mestrado Ana Lia e Bia pelo companheirismo.

A todos os moradores da gloriosa República K-Zona por anos de convivência e amizade que ajudaram em minha formação pessoal.

Agradeço também as agências de fomento e a UFOP que tornaram a realização deste trabalho possível.

Índice

1. Introdução
1.1- A doença de Chagas....1
1.2- A resposta imune das doença de Chagas....5
1.3- Tratamento das doença de Chagas....10
1.4- O cão como modelo experimental....12

2. Objetivos
2.1- Objetivo Geral....14
2.2- Objetivos específicos....14

3. Animais, Materiais e Métodos
3.1- Cepas do *Trypanosoma cruzi*....15
3.2- Animais....15
3.3- Fármaco e esquema de tratamento....15
3.4- Inoculação dos animais e confirmação da infecção....16
3.5- Dosagem de IgG total e subclasses IgG1 e IgG2....16
3.6- PCR....17
3.7- Necrópsia....19
3.8- Avaliação microscópica do tecido cardíaco....19
3.9- Expressão de mRNA de citocinas, quimiocinas, receptores e fatores de transcrição....20
4.0- Análises estatísticas....24

4. Resultados
4.1- Análise quantitativa do infiltrado inflamatório....25
4.2- Análise quantitativa do infiltrado inflamatório após o tratamento....27
4.3- Quantificação do mRNA de fatores de transcrição....29
4.4- Quantificação do mRNA de citocinas....32
4.5- Quantificação do mRNA de quimiocinas e receptores de quimiocinas....34

5. Discussão....40

6. Conclusões....50

7. Referências....51

Resumo

A cardiopatia chagásica crônica (CCC) afeta aproximadamente 30% dos 8 milhões de indivíduos infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Mesmo considerando que o infiltrado inflamatório, rico em células Th1, desempenha um papel crucial na CCC, pouco se sabe sobre os fatores que controlam a migração de células inflamatórias para o miocárdio na CCC. Neste estudo foi analisada a expressão do mRNA para citocinas, quimiocinas/receptores e fatores de transcrição relacionados às respostas tipo Th1 e Th2 presentes no tecido muscular cardíaco de cães infectados pelas cepas Berenice-78 (susceptível ao benznidazol) e VL-10 (resistente ao benznidazol) durante as fases aguda e crônica da infecção. Para analisar a influência do tratamento com benznidazol no padrão de resposta imune os animais foram divididos nos seguintes grupos experimentais: (i) animais infectados, (ii) animais tratados e curados, (iii) animais tratados e não curados, (iv) animais não infectados. Nossos resultados mostraram que durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* foi observada uma intensa inflamação do tecido muscular cardíaco associada a uma resposta tipo-Th1 predominante. A evolução para a fase crônica da doença conduziu a uma redução significativa da inflamação, pois nesta fase foi detectado um número significativamente menor de núcleos celulares em relação à fase aguda ($p<0,05$) tanto nos animais infectados pela cepa VL-10 (301,26±30,69 núcleos celulares na fase aguda e 243,78±20,56 na fase crônica), quanto naqueles infectados pela cepa Berenice-78 (277,45±55,44 núcleos celulares na fase aguda e 198,65±15,46 na fase crônica). A redução do processo inflamatório foi associado com a redução na detecção de mRNA para fatores de transcrição, quimiocinas/receptores relacionados às respostas Th1, Th2 e Th17. Adicionalmente foi demonstrado que o tratamento específico induz, no caso de cura parasitológica, uma redução da inflamação associada com a ausência de detecção de fatores relacionados à resposta tipo Th1, mostrando que estas avaliações podem ser importantes para o controle de cura da infecção pelo *T. cruzi*, demonstrando assim, o benefício do tratamento bem sucedido.

Palavras chaves: *Trypanosoma cruzi*, inflamação, cardiopatia, citocina, quimiocina, fator de transcrição.

Abstract

Chronic Chagas cardiomyopathy (CCC), a life-threatening dilated cardiomyopathy, affects 30% of the approximately 8 million patients infected by *Trypanosoma cruzi*. Even though the Th1 T cell-rich myocarditis play a pivotal role in CCC, little is known about the factors controlling inflammatory cell migration to CCC myocardium. Here we analyzed the mRNA expression of type 1 and type 2 cytokine, chemokine/ receptors and transcription factors in the cardiac tissue of dogs infected with Berenice-78 (benznidazole susceptible) and VL-10 (benznidazole resistant) *T. cruzi* strains during acute and chronic phases of the infection. To analyze the influence of the benznidazole treatment in the immune response profile and in the development of heart pathology the animals were divided into groups: (i) infected animals, (ii) treated and cured animals, (iii) treated and no-cured animals, (iv) no-infected animals. Our results showed the presence of intense myocarditis during the acute phase of the infection associated with a predominant Th1-type response. The progression to chronic phase was associated with a reduction of myocarditis, both in animals infected with the VI-10 (301.26 ± 30.69 cell nuclei in the acute and 243.78 ± 20.56 in chronic phase) as those infected with Berenice-78 (277.45 ± 55.44cell nuclei in the acute and 198.65 ± 15.46 in the chronic phase). The reduction in the myocarditis intensity was in line with the immune response profile, the mRNA expression of cytokine, chemokines/ receptors and the transcription factors detected in the heart tissue were related with Th1 , Th2 and Th17-type response. Additionally, the profile of immune response was associated with treatment efficacy. Among treated and cured animals the reduction of myocarditis, as well the lack of factors related with Th1-type response were observed. On the other hand, the myocarditis intensity and the immune response profile were similar among treated and no-treated animals

Key words: *Trypanosoma cruzi*, inflammation, cardiopathy, citokine, chemokine, transcription factor

Lista de Figuras

Figura 1: Miocardite observada nos cães inoculados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do Trypanosoma cruzi eutanasiados aos 90 (A) e 270 dias de infecção (B).....27

Figura 2: Miocardite observada nos cães inoculados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do Trypanosoma cruzi eutanasiados aos 90 (A) e 270 dias de infecção (B) após o tratamento com benznidazol 29

Figura 3: Níveis de expressão de fatores de transcrição no átrio direito de cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do Trypanosoma cruzi, necropsisados aos 90 dias de infecção 31

Figura 4: Níveis de expressão de fatores de transcrição no átrio direito de cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do Trypanosoma cruzi, necropsisados aos 270 dias de infecção 32

Figura 5: Níveis de expressão de fatores de citocinas no átrio direito de cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do Trypanosoma cruzi, necropsisados aos 90 (A, B e C) e 270 dias de infecção (D, E e F) 34

Figura 6: Níveis de expressão de quimiocinas e receptores no átrio direito de cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do Trypanosoma cruzi, necropsisados aos 90 dias de infecção 36

Figura 7: Níveis de expressão de quimiocinas e receptores no átrio direito de cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do Trypanosoma cruzi, necropsisados aos 270 dias de infecção 38

Lista de Tabelas

Tabela 1: Alvo e iniciadores utilizados. As sequências foram determinadas com base na sequência de nucleotídeos obtidas GenBank Database.....22

Lista de siglas

CCC	Cardiopatia Chagásica Crônica
CCL	Quimiocina da familia CC
CCR	Receptor da familia CC
CD	Cluster of differentiation
CXCR	Receptor da familia CXC
CXCL	Quimiocina da familia CXC
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTU	Discrete Typing Units
ELISA	Enzyme-Linked Immunosorbent Assay
FOXP3	Forkhead box P3
ROR-γT	RAR-related orphan receptor gamma
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL12	Interleucina 12
IgG	Imunoglobulina G
iNOS	Enzima óxido nítrico-sintase induzível
kDNA	DNA do cinetoplasto
LIT	Liver Infusion Triptose
mRNA	RNA mensageiro
PCR	Reação em cadeia da polimerase
T-bet	T-box transcription factor
TNF-α	Fator de Necrose Tumoral alfa
WHO	World Health Organization

1- Introdução

1.1- A doença de Chagas

A doença de Chagas é causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909), pertencente à ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae. Cerca de 7 a 8 milhões de pessoas no mundo estão infectadas pelo protozoário, sendo a América Latina a região mais afetada (WHO, 2013). Além disso, casos confirmados de infecção são cada vez mais comuns em outras regiões do mundo, como Estados Unidos, Canadá, Espanha e outros países, resultado da migração para essas áreas, demonstrando que a doença de Chagas é um problema de saúde pública de ampla abrangência (GASCON *et al.*, 2007; RASSI JR *et al*, 2010; PARKER *et al*, 2011).

A contaminação de mamíferos pode ocorrer através da penetração das formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto vetor, o qual pertencente à Família Reduviidae, subfamília Triatominae. Ao penetrarem no hospedeiro vertebrado, as formas tripomastigotas são capazes de invadir uma grande variedade de células, onde, no citoplasma, diferenciam-se em amastigotas. As formas amastigotas, após intensa multiplicação, se diferenciam em tripomastigotas e com a ruptura da célula ficam livres para infectar células adjacentes ou mesmo caírem na circulação ondem poderão alcançar sítios mais distantes de sua origem. Estas formas circulantes podem ser ingeridas pelo vetor de hábito hematófago, onde sofrerão nova diferenciação para epimastigotas e posteriormente tripomastigotas metacíclicas, fechando assim o ciclo evolutivo do parasito (BRENER, 1973; DE SOUZA, 1984; KIRCHHOFF, 1989; STUART *et al*, 2008).

O controle vetorial foi iniciado no Brasil em 1975, e teve como objetivo de eliminar o principal triatomíneo envolvido na transmissão do *T. cruzi* no Brasil, o *Triatoma infestans* (MONCAYO, 2003; COURA, 2013). Em 2006 o Brasil recebeu a Certificação Internacional de Eliminação da Transmissão da Doença de Chagas pelo *Triatoma infestans*, conferida pela Organização Pan-Americana da Saúde (FERREIRA E SILVA, 2006). Porém a completa eliminação da transmissão vetorial é algo utópico, uma vez que existem outras espécies do vetor associados ao ciclo do parasito no ambiente silvestre (COURA, 2013). Outros países da América do Sul como o Uruguai em 1997, e o Chile, em 1999, também receberam o certificado de interrupção da transmissão vetorial da doença de Chagas (FERREIRA E SILVA, 2006). Além da via vetorial, a doença de Chagas pode ser transmitida através da transfusão sanguínea, por via oral, congênita, por transplante de órgãos ou por acidentes de laboratório. Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde brasileiro, entre 2000 e 2013 foram confirmados 1570 casos de doença de Chagas aguda sendo a transmissão oral responsável por cerca de 69% dos casos, seguida das transmissões ignoradas (23,7% dos casos onde não foi possível determinar a forma de transmissão) e vetorial (6,4 %). Ainda, o boletim mostra a região norte com o maior registro de casos confirmados, contando com mais de 90% das notificações (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). O inquérito nacional de soroprevalência em doença de Chagas, realizado entre os anos de 2001 e 2008 revelou 32 crianças (0 a 5 anos) positivas para a doença e a transmissão congênita foi sugerida em 20 destes casos devido a positividade também das mãe (OSTERMAYER et al., 2011). Adicionalmente, como excepcionais, poderiam ser citadas as vias sexual e através de outros vetores. Após o controle da transmissão vetorial e por transfusão sanguínea, maior atenção tem sido dada a outras vias de infecção, como a via oral, devido aos surtos ocorridos no Brasil, especialmente região Amazônica (DIAS *et al*, 2011).

A doença de Chagas se inicia com uma fase aguda caracterizada pela presença de parasitos na corrente sanguínea e em diferentes tecidos do indivíduo infectado (PRATA, 2001). A fase aguda, na maioria dos casos, é assintomática ou oligosintomática; quando presentes os sintomas na maioria das vezes são inespecíficos, como febre, adenopatia generalizada e edema. Em alguns indivíduos podem ser observados sinais de porta de entrada, como chagomas de inoculação (pele) e sinal Romaña na região palpebral, porém estes sinais são encontrados em um número limitado de casos (PINTO et al., 2008). As lesões observadas na fase aguda da doença são caracterizadas pela presença de reações inflamatórias difusas com predomínio de células mononucleares em vários órgãos, desencadeada pela ruptura das células parasitadas. A morte na fase aguda é bastante rara (1 a cada 1000 casos), podendo ocorrer em casos específicos de imunossupressão e em crianças menores de 2 anos, em decorrência de meningoencefalites e miocardites (ZHANG E TARLETON, 1999 ; TEIXEIRA *et al*, 2006). A maioria dos indivíduos sobrevive à fase aguda e evolui para a fase crônica apresentando uma forma subclínica da doença, denominada forma indeterminada, na qual o parasitismo sanguíneo e tecidual é escasso. Esta forma da doença é silenciosa e pode perdurar por muitos anos ou por toda a vida do indivíduo. A forma indeterminada se caracteriza pela ausência de sintomatologia, eletrocardiografia normal, radiografia do coração, esôfago e cólon sem alterações (ANDRADE, 1958; PRATA, 2001). Em alguns casos, na forma indeterminada, podem ser observados focos inflamatórios e pequena denervação cardíaca e do plexo mioentérico, porém, com intensidade insuficiente para produzir manifestações clínicas (ANDRADE *et al*, 1997; DIAS E MACEDO, 2005). Cerca de 30% dos pacientes evoluem para as formas sintomáticas, cujas lesões afetam, irreversivelmente, órgãos internos como coração,

esôfago, cólo e sistema nervoso periférico, caracterizando as formas cardíaca, digestiva e cardiodigestiva da enfermidade (WHO, 2013).

A cardiopatia chagásica crônica é a manifestação mais grave e frequente da doença, a qual pode aparecer décadas após a infecção inicial e induzir intensa morbimortalidade. Nestes pacientes observa-se intenso infiltrado inflamatório e fibrose do miocárdio com consequente hipertrofia, destruição do sistema de condução e redução de neurônios cardíacos, dilatação das cavidades cardíacas e aneurisma de ponta que podem levar a quadros de arritmia, falha cardíaca e tromboembolismo, além de distúrbios de condução como o bloqueio atrioventricular e dos ramos do coração (COURA, 1966).

Na forma digestiva observa-se, frequentemente, grande redução de neurônios associados ao plexo mioentéricos, especialmente no esôfago e cólo, causando incoordenação motora (disperistalse), além de dilatação destes órgãos, os chamados megaesôfago, megacólon e outros “megas” na bexiga, vesícula biliar e outros tipos menos frequentes (KOBERLE, 1961). As anormalidades relacionadas à forma digestiva, em especial a esofágica, parecem surgir com menor tempo de infecção, quando comparada a forma cardíaca. Os pacientes portadores do megaesôfago apresentam dificuldade na deglutição, além de regurgitação de alimentos ingeridos (MACEDO, 1999). Já o cólo, quando afetado, gera a obstipação prolongada, com a presença de meteorismo, disquesia (evacuação dolorosa e difícil), dor abdominal e anorexia (TEIXEIRA *et al*, 2006). A associação de megaesôfago e megacólon pode gerar um quadro de desnutrição, pois há dificuldade do paciente se alimentar devido à perda da motilidade natural dos músculos da deglutição, dificultando a manutenção do movimento peristáltico normal.

A cardiopatia chagásica é a principal causa de doença e morte por problemas cardíacos em populações rurais carentes e/ou comunidades urbanas originadas de áreas rurais (RASSI *et al*., 2009; RASSI). A característica histopatológica mais marcante nas

lesões cardíacas é a presença de miocardite difusa, com intenso remodelamento do miocárdio, fibrose, hipertrofia dos cardiomiócitos (HIGUCHI *et al*, 1987). As fases aguda e crônica da doença de Chagas posssuem diferenças entre si, em relação a presença de miocardite e antígenos do parasito. Biópsias cardíacas de pacientes chagásicos, demonstraram, na fase aguda, presença de miocardite em todos os pacientes, além de presença de antígenos relacionados ao *T. cruzi* em 58% dos mesmo. Já na fase crônica, houve redução da presença de miocardite (45% dos pacietentes) e antígenos relacionados ao parasito não foram observados. (FUENMAYOR-MEZA, 2000). O infiltrado inflamatório é composto por cerca de 96 % de linfócitos sendo o CD8 mais abuntante (HIGUCHI et al., 1997; HIGUCHI et al., 1993). O maior número médio de linfócitos CD8 em relação aos CD4 pode ser observado principalmente na fase crônica da doença de Chagas, em pacientes com cardiopatia chagásica crônica a razão CD4/CD8 foi de 0,6 (Reis et al , 2000) e 0,8 (FUENMAYOR-MEZA, 2000). Ainda em relação a fase aguda, em pacientes, o número de linfócitos CD4 e CD8 foi semelhante (FUENMAYOR-MEZA, 2000) enquanto que em cães os CD8 foram predominantes (SOUZA et al, 2014).

1.2- Resposta Imune na Doença de Chagas

Atualmente é bem definida a importância tanto da resposta inata quanto da adquirida no controle da replicação parasitária e sobrevivência do hospedeiro durante a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (MACHADO *et al*, 2012). Esse controle é realizado através de resposta inflamatória induzida inicialmente pela presença do parasito e consequentemente por uma cascata de eventos que devem ser bem orquestrados pelo sistema imune do hospedeiro (DUTRA 2005).

Estudos realizados em pacientes e modelos animais mostram que citocinas inflamatórias têm um envolvimento central na fase aguda da infecção, sendo amplamente discutido que a intensa estimulação do sistema imune inicialmente e ao longo da infecção pelo *T. cruzi* são os maiores responsáveis pela miocardite generalizada e posterior dano tecidual cardíaco (SAMUDIO *et al*., 1998; MARINHO *et al*, 1999). Logo após o início da fase aguda da infecção a imunidade inata é desencadeada por componentes do parasito, incluindo DNA e glicoconjugados de membrana, via receptores do tipo Toll em macrófagos e células dendríticas (BAFICA *et al*, 2006). A família de receptores do tipo NOD também tem papel fundamental no reconhecimento do parasito e consequentemente, do posterior desencadeamento da resposta imunológica do hospedeiro frente ao *T. cruzi*. Em camundongos, os receptores NOD1 parecem ter grande importância no desenvolvimento da resposta imune contra o *T. cruzi*, (SILVA et al., 2010). Ainda, os membros da família de receptores tipo Nod incluindo NLRP1, NLRP3 e NLRC4 e o adaptador ASC são componentes críticos do inflamassoma, sendo este importante na sinalização celular e ativação de caspase-1 além de estar envolvido na produção de IL-1β and IL-18, citocinas importantes para a indução da resposta inflamatória (FRANCHI et al., 2009; SILVA et al., 2010)

Após a estimulação, várias células passam a produzir citocinas e quimiocinas pro-inflamatórias, regulando assim a expressão de receptores e coreceptores ligados à resposta Th1, além de aumentar a endocitose e morte dos parasitos pela liberação de reativos do oxigênio e óxido nítrico (CUNHA-NETO *et al*, 2009).

Dentre as inúmeras citocinas produzidas devido à interação parasita/hospedeiro, algumas do perfil Th1 como IFN-γ e IL12 são de extrema importância no controle do parasitismo sanguíneo e tecidual. Os macrófagos e células dendríticas, após endocitar o parasito, induzem uma forte resposta imune contra o parasito, com a produção de IL12 que

é capaz de estimular a produção de IFN-γ (GAZZINELLI *et al*, 1993). O IFN-γ estimula a produção de mais IL12 e de TNF-α além de ativar a produção de óxido nítrico em macrófagos e consequentemente a destruição do parasito (CAMARGO *et al*, 1997). Os macrófagos e células dendríticas que tiveram sucesso em endocitar o parasito estimulam a formação de respostas celular e humoral contra o *T. cruzi* (BILATE & CUNHA-NETO 2008). Em modelo experimental as citocinas, anticorpos e células T, então, migram para os sítios de infecção orientados por diversas quimiocinas como CCL2, CCL3, CCL4, CCL5 e CXCL10 para participarem da resposta inflamatória contra o parasito (TEIXEIRA *et al*, 2002). Assim como as quimiocinas, os receptores de quimiocinas também são parte fundamental desta enormidade de eventos relacionados ao combate ao *T. cruzi*, e algumas como a CCR5 são elementos chave para a migração de linfócitos para o miocárdio, sendo importante na regulação da intensidade da inflamação (GUEDES 2010;), uma vez que, bloqueados estes receptores, há redução considerável do infiltrado inflamatório cardíaco (MARINO *et al*, 2005)

A intensa resposta relacionada ao perfil Th1 é responsável pelo controle – mas não eliminação – do parasito e, portanto importante para a sobrevivência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*. Porém, o balanço entre a proteção conferida pela resposta inflamatória desencadeada por este perfil e a patologia causada pela mesma é bastante frágil. Desta maneira citocinas produzidas por células com perfil Th2 como IL10 (também pode ser produzida por células do perfil Th1), IL4 e células T regulatórias (Tregs) desempenham o papel de contrapeso na balança da imunidade, pois são capazes, respectivamente, de atenuar os efeitos nocivos causados pela resposta inflamatória exacerbada e regular a atividade de células apresentadoras de antígeno através da indução de (TGF) β (SATHLER-AVELAR *et al*, 2009; CARDILLO *et al*, 1996). Vários autores demonstraram que pacientes com cardiopatia chagásica crônica (CCC) apresentam menor

número de linfócitos $CD4^{+}CD25^{high}IL\text{-}10^{+}$ e $CD4^{+}CD25^{high}FoxP3^{+}$ em relação a paciente assintomáticos, evidenciando a importância da produção da resposta regulatória no controle da cardiopatia chagásica (GUEDES et al., 2012; VITELLI-AVELAR et al., 2005, 2006). Outros autores ainda demonstraram que em pacientes cardiopatas, além da produção elevada de IFN-γ e TNF-α e da baixa produção de citocinas como IL-4, IL-6, IL-7 e IL-15 (REIS *et al*, 1997; ABEL *et al*, 2001; REIS *et al*, 1993), há também elevada produção das quimiocinas e receptores do perfil Th1 CCL5+, CCXCL9+, CCR5+, CXCR3+(CUNHA-NETO *et al*, 2005; NOGUEIRA *et al*,2012). Tomados em conjunto os diferentes estudos realizados, tanto em modelos experimentais como em humanos, mostram que a presença de um polimorfismo de citocinas e quimiocinas pode controlar o dano inflamatório órgão-específico, e que o fino balanço associado especialmente à resposta Th1 teria um papel essencial na manutenção do processo inflamatório associado à cardiopatia chagásica crônica.

Apesar de intensivamente estudada, a patogênese da fase crônica da doença de Chagas continua não muito bem esclarecida e os mecanismos imunopatológicos que promovem as lesões nos tecidos não estão ainda bem elucidados. A dificuldade em detectar-se o parasito no miocárdio levou à postulação de teorias auto-imunes para explicar o desenvolvimento das lesões inflamatórias miocárdicas durante a fase crônica da doença. Estas lesões poderiam ser resultantes de uma reação de autoimunidade, causada por auto-anticorpos ou por linfócitos T auto-reativos derivados de mimetismo molecular de antígenos do parasito e do hospedeiro, ou por ativação bystander não envolvendo antígenos do *T. cruzi*, sendo induzida por antígenos provenientes de lesões teciduais (LEON et. al., 2001; KIERSZENBAUM, 1999; COSSIO et. al., 1974; ANSELMI *et al*, 1966). Outros autores demonstraram a reatividade contra auto-antígeno Cha (proteína presente em mamíferos) em humanos e camundongos infectados pelo *T. cruzi* (GIRONES *et al*, 2001).

Entretanto, vários estudos vêm apontando no sentido de que o parasito tenha participação ativa na patogênese da cardiopatia chagásica crônica (HIGUCHI, 1995; HIGUCHI *et al*, 1993; BARBOSA *et al*, 1986). Uma correlação positiva entre a inflamação e a presença de *T. cruzi* no tecido cardíaco, assim como sua ausência em locais sem inflamação, foi descrita por Belloti *et al*, 1996 e Higuchi *et al*, 1995 utilizando a técnica de imunoperoxidase. A presença de DNA nuclear do parasito também tem sido detectada em tecidos cardíacos de pacientes com lesões inflamatórias severas através da reação em cadeia da polimerase (PCR) e hibridização com sondas internas específicas. Porém, não sendo detectadas seqüências de DNA do *T. cruzi* em tecido cardíaco de pacientes assintomáticos ou soronegativos (JONES *et al*, 1993). Resultados concordantes foram obtidos por Lages-Silva *et al*, (2001) e Vago *et al*, (1996) utilizando amplificação de seqüências do DNA do cinetoplasto (kDNA) do *T. cruzi* em tecidos do esôfago de pacientes com megaesôfago, sendo observada uma correlação entre a inflamação tecidual e a presença do parasito. A presença do parasito parece ser importante para desencadear o processo de formação da miocardite chagásica crônica. Na maioria dos casos, não é possível fazer uma correlação entre a intensidade da lesão e a quantidade de antígeno e/ou DNA do parasito presente sugerindo que o parasito (envolvendo características genéticas inerentes à cepa do parasito presente) é responsável por disparar e manter o processo de patogênese no miocárdio, e que este seria amplificado por mecanismos auto-imunes que dependeriam da predisposição genética do hospedeiro (GIRONES & FRESNO, 2003; ÃNEZ *et al*, 1999; BELLOTI *et al*, 1996; HIGUCHI, 1995; ROWLAND *et al*, 1995; JONES *et al*, 1993).

Considerando os estudos que apontam a importância da presença do parasito na progressão da doença de Chagas crônica e os resultados controversos sobre o benefício do tratamento especifico com benznidazol na evolução da cardiopatia chagásica crônica é de

grande importância a realização de estudos experimentais para a avaliação do efeito do tratamento etiológico na resposta imune e na progressão das alterações cardíacas de animais inoculados com cepas do parasito resistentes a este fármaco.

1.3- Tratamento da doença de Chagas

Os fármacos utilizados atualmente no tratamento específico da doença de Chagas, o benznidazol (N-benzil-2-nitro-imidazol-1-acetamida) (LAFEPE) e o nifurtimox (Lampit®, Bayer) já eram utilizados desde o final da década de 60, sendo o do nifurtimox, descontinuado no Brasil nos anos 80 (COURA & DE CASTRO, 2002).

Passados quase cinquenta anos desde o início da utilização do benznidazol, vários estudos demonstraram a eficiência do medicamento no tratamento da doença de Chagas, atuando na via que envolve modificação covalente de macromoléculas (DNA, RNA, proteínas) por intermediários de nitro-redução (DOCAMPO, 1990; revisado por GUEDES *et al*, 2006). Os resultados do tratamento etiológico de pacientes chagásicos provenientes de diferentes países, e mesmo de diferentes áreas geográficas de um mesmo país, são frequentemente contraditórios. Vários fatores parecem influenciar nos resultados do tratamento da doença de Chagas, sendo os mais importantes: a fase da doença em que ocorre o tratamento e a variabilidade genética do parasita, além da idade do hospedeiro, dentre outros. Os índices de cura variam enormemente quando comparados os resultados dos ensaios clínicos realizados na fase aguda ou crônica da doença. Quando o tratamento é realizado durante a fase aguda da infecção pode-se detectar 40% a 76% de sucesso terapêutico (SHUKANAI-YASUDA *et al*, 1990, ANDRADE *et al*, 1992, BAHIA-OLIVEIRA, 2000, CANÇADO, 2002). De forma diferente, no tratamento realizado durante a fase crônica da infecção são detectados baixos índices de cura em torno de 5%

(FERREIRA, 1990, VIOTTI *et al*, 1994, LAURIA-PIRES *et al*, 2000, SUASNÁBAR *et al*, 2000, BRAGA *et al*, 2000, CANÇADO 2002). Entretanto, considerando o risco de falha cardíaca e morte durante a fase crônica, o tratamento com drogas tripanocidas pode ser importante na prevenção da progressão de alterações eletrocardiográficas severas. De acordo com Viotti *et al*, (1994), Suasnábar *et al*, (2000) e Lana *et al* (2009) o tratamento de indivíduos chagásicos com benznidazol durante a fase crônica induz a uma diminuição da progressão de alterações eletrocardiográficas e para cardiopatia, em relação aos não tratados.

Considerando os diversos fatores que podem influenciar no sucesso terapêutico quando utilizado o benznidazol e a importância da presença do *T. cruzi* (BEN YOUNES-CHENNOUFI *et al*, 1988; VAGO *et al*, 2000; SCHIJMAN *et al*, 2004; BENVENUTI *et al*, 2008) e de seus antígenos (TARLETON *et al*, 1997; ZHANG AND TARLETON, 1999; PEREZ-FUENTES *et al*, 2003; SCHIJMAN *et al*, 2004; BENVENUTI *et al*, 2008) na intensidade da inflamação e na severidade da doença de Chagas, torna-se importante entender a influência do tratamento nos mecanismo desencadeados pelo parasito, como a resposta imune do hospedeiro. Guedes *et al* (2010) e Souza *et al*, (2014) demonstraram que elementos importante na migração celular para os sítios inflamatórios, as quimiocinas, apresentam padrões de expressão alterados em cães infectados pelo *T. cruzi*. Adicionalmente, Guedes *et al.*, (2009) observaram aumento no nível das citocinas IFN-γ e TNF-α em cães infectados pelo *T. cruzi*.

Desta maneira a elucidação da influência do tratamento no perfil de expressão de elementos da resposta imune e principalmente de como este perfil está associado à severidade das lesões durante o curso da doença de Chagas, possibilita a identificação de elementos específicos, citocinas ou quimiocinas, por exemplo, que funcionem como

marcadores para o prognóstico da doença, além de demonstrar qual a importância do tratamento em pacientes não curados.

1.4- O cão como modelo experimental

Elegemos o cão como modelo experimental por reproduzir a infecção pelo *T.cruzi* em sua fase aguda e, especificamente, em sua fase crônica, o mais próximo do padrão observado na doença de Chagas humana. O modelo cão apresenta características importantes como o desenvolvimento de ambas as fases, aguda e crônica da doença de Chagas (ANDRADE *et al*. 1997), além de apresentar semelhança nas alterações clínicas da infecção (ANDRADE E ANDRADE, 1980; ANDRADE, 1984; LANA *et al*, 1992; BAHIA *et al*, 2002) e resposta ao tratamento com benznidazol ser semelhante com a observada em humanos (GUEDES *et al*, 2002; SANTOS *et al*., 2012).

Na fase aguda os cães chagásicos desenvolvem alterações eletrocardiográficas e distúrbios de condução, além de focos inflamatórios na região cardíaca, principalmente no átrio direito (ANDRADE *et al*, 1997; CALDAS *et al*, 2013). Durante esta fase também é observado um padrão de resposta imune semelhante ao observado em humanos, com associação de citocinas específicas, como IFN-γ, TNF-α à severidade das lesões cardíacas (CALDAS *et al*., 2013; GUEDES *et al*., 2009). Também é observado aumento na expressão de quimiocinas relacionadas ao recrutamento de células pró-inflamátorias, como CCL5 e CCL4, sendo este aumento na expressão fator importante para explicar à severidade das lesões cardíacas anteriormente citadas (GUEDES *et al*., 2010). Em relação ao tratamento específico da doença de Chagas, o cão mimetiza os resultados observados em casos humanos, tanto em índices de cura em ambas as fases da doença, quanto na

diferenciação destes índices de acordo com a susceptibilidade ao benznidazol, da cepa utilizada para a infecção (CALDAS *et al*., 2013; GUEDES *et al*., 2002).

Além de todos os motivos pelos quais o cão é eleito por muitos como um ótimo modelo experimental para o estudo da Doença de Chagas, ele ainda se destaca como importante sentinela natural em áreas onde o controle da doença está sendo implementado e a vigilância epidemiológica é de grande importância (CASTAÑERA *et al*. 1998; (ESTRADA-FRANCO *et al*., 2006). Também é considerado como importante reservatório do ciclo doméstico da doença principalmente na América do Sul e Central (GURTLER et al., 2007 ; MOTT *et al*., 1978), porém ganha cada vez mais importância como reservatório em países como os Estados Unidos (KJOS *et al*., 2007).

2- Objetivos

2.1- Objetivo geral

Avaliar a influência do tratamento com benznidazol na resposta celular e miocardite de cães infectados pelo *Trypanosoma cruzi.*

2.2- Objetivos específicos

(i) Avaliar as alterações no perfil da expressão de RNAm para as citocinas IFN-γ, IL-10 e TNF-α induzidas pelo tratamento específico com benznidazol no tecido cardíaco de cães, através da PCR em tempo real quantitativa;

(ii) Avaliar as alterações no perfil da expressão de RNAm para as quimiocinas CCL5, CXCL9, CCL17, CCL24, CXCR3, CCR5, CCR3, CCR6 e CCR4 induzidas pelo tratamento específico com benznidazol no tecido cardíaco de cães, através da PCR em tempo real quantitativa;

(iii) Avaliar as alterações no perfil da expressão de RNAm dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, ROR-γT e FOXP3 induzidas pelo tratamento específico com benznidazol no tecido cardíaco de cães, através da PCR em tempo real quantitativa;

(iv) Quantificar o infiltrado inflamatório de cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do *T.cruzi*, submetidos ao tratamento específico com Bz comparativamente aos animais infectados pelas mesmas cepas e não tratados.

3- Animais, materiais e métodos

3.1- Cepas de *Trypanosoma cruzi*

Cepa Berenice-78 - A cepa Berenice-78, foi isolada por Salgado em 1978 de xenodiagnóstico humano no Brasil, esta cepa foi posteriormente estudada por Lana e Chiari em 1986, é considerada sensível à quimioterapia com Bz (CALDAS *et al.*, 2008) e pertence ao discrete typing units II (DTU II) (MORENO *et al*., 2010).

Cepa VL10 – Foi isolada de paciente na forma indeterminada da doença de Chagas no estado de Minas Gerais (SCHLEMPER, JUNIOR, 1982). Esta cepa é considerada resistente ao tratamento com Bz (FILARDI & BRENER, 1987, CALDAS *et al.*, 2008) e segundo novo consenso de nomenclatura (ZINGALES *et al*, 2009) classificada como pertencente ao DTU II (MORENO *et al*., 2010).

3.2- Animais

Foram utilizados cães sem raça definida, obtidos e mantidos no Canil da Universidade Federal de Ouro Preto. Os animais foram alimentados com ração comercial para cães e água *ad libitum.* Antes de inclusão no estudo os animais foram tratados com anti-helmínticos e imunizados contra doenças infecciosas (Cinomose, Adenovírus Tipo 2, Coronavírus, Parainfluenza, Parvovirose e Leptospirose canina) usando a vacina Vanguard HTLP. Todos os procedimentos com estes animais foram aprovados e seguiram as normas estabelecidas pelo Comitê de Ética no uso de animais da UFOP. (Protocolo n^0 2009/15)

3.3- Fármaco e esquema de tratamento

Neste projeto foi utilizado como quimioterápico o benznidazol (Bz), um derivado 2-nitroimidazol (N–benzil–2–nitro-1- imidazolacetamida). Os cães foram tratados oralmente com 7mg/kg de Bz/dia, durante 60 dias, divididos em duas doses diárias. O tratamento foi iniciado a

partir do primeiro dia em que o animal apresentou parasitemia patente, detectada pelo exame de sangue a fresco.

3.4- Inoculação dos animais e confirmação da infecção

Foram inoculados com cada uma das cepas do *T.cruzi*, 20 cães. O inoculo foi realizado em animais com 120 dias de idade, utilizando 2.000 tripomastigotas sangüíneas/kg, via intraperitoneal. Os animais infectados foram divididos, aleatoriamente, em 2 grupos experimentais, sendo os animais do grupo 1 (n=10) tratados com Bz e os animais do grupo 2 (n=10) mantidos sem tratamento. A partir do 10º dia de inoculação foi coletado, diariamente, sangue da veia marginal da orelha dos cães para a confirmação da infecção. Para a avaliação das lesões cardíacas a metade dos animais de cada grupo foi eutanasiada durante a fase aguda (imediatamente após o tratamento; 80 dias de infecção) e a outra metade durante a fase crônica (6 meses após o término do tratamento; 270 dias após a inoculação).

A infectividade de cada cepa foi verificada pela observação, através do exame de sangue a fresco, de parasitos no sangue periférico dos cães inoculados. Os cães apresentando exames de sangue a fresco persistentemente negativos foram submetidos à hemocultura para a confirmação da infecção. De acordo com critério de cura estabelecido por Caldas (2011) os animais tratados etiologicamente, foram considerados curados ou não curados.

3.5 - Dosagem de anticorpos anti-*T. cruzi* da classe IgG

Foram coletados, aproximadamente 5mL de sangue dos cães, através da veia femoral. As amostras de sangue foram centrifugadas e o sobrenadante (soro) foi coletado e armazenado em tubos eppendorf a -20ºC. Foram utilizados antígenos da forma epimastigota da cepa Y do *T. cruzi*, obtidos de cultivo acelular em meio LIT. Como conjugado foram utilizadas anti-imunoglobulinas de cão da classe IgG marcadas com peroxidase (Bethyl Laboratories, Montgomery, USA). O ELISA (Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay) foi realizado segundo a metodologia descrita por Voller *et al.*, (1976), modificada de acordo com o protocolo descrito a seguir. O teste foi

executado em placas de poliestireno com 96 poços de fundo chato. Cada poço da placa foi tratado com extrato antigênico de epimastigotas, na concentração definida previamente por titulação em bloco, diluído em solução tampão carbonato. As placas foram incubadas a 4ºC por 18h e após este intervalo de tempo foram bloqueadas com PBS + SFB e incubadas a 37ºC. A próxima etapa consistiu na adição de soro de cada animal, e incubação a 37ºC. Posteriormente foi adicionado o conjugado, diluído em PBS-Tween, conforme titulação prévia, e as placas foram novamente incubadas a 37ºC. Finalmente, foi adicionada a solução de substrato (O-fenilenodiamino-OPD, solução de ácido cítrico e H_20_2) e posteriormente a reação foi interrompida com a adição de ácido sulfúrico. A leitura foi realizada em leitor de microplaca (BIO RAD, Modelo 3550) com filtro de 490nm. Em cada placa foram adicionados 10 soros controles negativos e quatro controles positivos. A absorbância discriminante, em cada placa, foi calculada tomando-se a média da absorbância dos 10 soros negativos somados a dois desvios padrões. Posteriormente foi calculado o índice de reatividade, dividindo o valor da absorbância de cada amostra encontrada pela absorbância discriminante, sendo os valores encontrados entre 0.9 e 1.1 considerados duvidosos, valores abaixo de 0.9, negativos e acima de 1.1, considerados positivos.

3.6- Reação em Cadeia da Polimerase

Para a realização da reação em cadeia da polimerase (PCR), foi coletado sangue dos cães no primeiro e no sexto mês após o término do tratamento (animais necropsiados durante a fase crônica). Foi utilizada a técnica de PCR descrita por Britto *et al.,* (1993) e otimizada por Gomes *et al.,* (1998). Foram coletados 10 mL de sangue de cada cão, e colocados em tubos com igual volume de Guanidina-HCl 6M/EDTA 0,2M (Sigma Chemical Company, USA) (ÁVILA *et al.,* 1991). Essa mistura, sangue/guanidina/EDTA, foi mantida à temperatura ambiente e após 15 dias fervida em banho-maria (BRITTO *et al.,* 1993). O lisado foi estocado à temperatura ambiente. A seguir, encontra-se a descrição sucinta de cada etapa desta reação:

a) *Extração do DNA* - Foi utilizada a técnica proposta por Sambrook *et al.,* (1989) com algumas modificações realizadas por Gomes *et al.,*(1998). Alíquotas do lisado de sangue foram

transferidas para tubos de microcentrífuga, sendo em seguida desproteinizado com igual volume de fenol-clorofórmio. A mistura foi homogeneizada lentamente e centrifugada. O sobrenadante foi retirado e ao sedimento foram adicionados H_2O milli-Q estéril e novamente centrifugado. Em seguida, a fase aquosa foi purificada com clorofórmio e o DNA presente nessa fase foi precipitado com dois volumes de etanol absoluto gelado e 10mM de acetato de sódio em banho de gelo. Após centrifugação, o sobrenadante foi descartado e após a volatilização do etanol, o DNA obtido foi ressuspendido em água milli-Q estéril e estocado a 4^oC.

b) *Amplificação específica do T. cruzi* - *A*s reações de amplificação contem Tris-HCl, Triton X-100, $MgCl_2$, KCl, os diversos dNTP's (Pharmacia Biotech), a *Taq* DNA polimerase (*Invitrogen*), e cada iniciador [S35(5'AAATAATGTACGGG (T/G) GAGATGCATGA3') e 36 (5'GGGTTCGATTGGGGTTGGTGT3') (OPERON Technologies, INC)] descritos por Ávila *et al.*, (1990). Foram realizados 35 ciclos de amplificação em termociclador automático (MinCycler ^{TM}). As condições da reação foram: desnaturação do DNA a 95ºC, anelamento dos iniciadores a 65º C e extensão a 72º C. As etapas de extração do DNA e a mistura da reação da PCR foram monitoradas com controles negativos (amostras de sangue de cães não infectados) e positivos (cães infectados na fase aguda da infecção). Além disso, para evitar contaminações, cada etapa da reação foi realizada em ambientes separados, utilizando reagentes e equipamentos destinados exclusivamente para cada uma das mesmas.

c) Detecção dos produtos da PCR - Os produtos amplificados pela PCR foram visualizados por eletroforese em gel de poliacrilamida e revelados pela prata (SANTOS *et al.*, 1993). O tamanho das bandas amplificadas foi monitorado pela utilização de marcador de peso molecular. Após a eletroforese, o gel foi fixado em solução de etanol e ácido acético, sob agitação. Em seguida esta solução foi desprezada e o gel foi corado com uma solução de nitrato de prata sob agitação. Posteriormente, o gel foi lavado e revelado em solução de NaOH e formaldeído, com agitação até o

aparecimento das bandas. Novamente o gel foi transferido para a solução fixadora e fotografado para documentação.

3.7- Necrópsia

Os cães de cada grupo experimental foram necropsiados imediatamente e seis meses após o término do tratamento. Os animais foram eutanasiados e posteriormente necropsiados para avaliação macroscópica da área cardíaca, verificando a presença de cardiomegalia. Em seguida, um fragmento da parede atrial direita de todos os cães foram coletados. O átrio direito é uma das regiões onde a miocardite chagásica apresenta-se com maior intensidade (TAFURI *et al.*, 1987), assim foram utilizados para a avaliaç. Estes fragmentos foram conservados em gelo e fixados em formalina.

3.8- Avaliação microcoscópica do tecido cardíaco

Para análise e quantificação do infiltrado inflamatório foram utilizados cortes seriados de 5µ de espessura da parede atrial direita de cada cão infectado, estes, foram desparafinizados em banhos de xilol, hidratados em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes, e lavados em água corrente e em tampão fosfato (PBS). Em seguida, os cortes foram corados pela hematoxilina, lavados em água corrente e diferenciados rapidamente em álcool acidulado, e corados pela eosina. Após o último processo de lavagem em água corrente, foram levados até a estufa para secagem. Posteriormente colocados em banho de xilol, e então, montadas as lâminas com auxílio de entellan.

Os núcleos celulares foram quantificados em 20 imagens (campos) aleatórias (área total percorrida igual a $1{,}49 \times 10^6$ μm^2). As imagens visualizadas pela objetiva de 40× foram digitalizadas através de microcâmera Leica DM 5000 B (Leica Application Suite, versão 2.4.0R1) e processadas por meio do programa analisador de imagens Leica Qwin V3. A miocardite foi determinada por meio do número de núcleos celulares presentes nas imagens dos animais controles

não infectados mais dois desvios padrões, assim, os cães infectados com o *T. cruzi* com valores da quantificação de núcleos celulares acima desta média eram considerados como portadores de miocardite (IVO SANTANA CALDAS, 2011).

3.8- Expressão de mRNA de citocinas, quimiocinas, receptores de quimiocinas e fatores de transcrição através da PCR em tempo real quantitativa

i) Extração do RNA

A extração do RNA foi realizada de acordo com as instruções do kit **RNA- SV Total RNA Isolation System – Promega.** Um fragmento de aproximadamente 60 mg do tecido cardíaco de cada cão foi macerado e completamente homogeneizado em 1 ml de *RNA Lysis Buffer*. Posteriormente, foram transferidos 175µl desse lisado para um novo tubo e adicionados 350µl de *RNA Diluition Buffer*. Essa mistura foi homogeneizada, incubada a 70ºC por 3 minutos e então centrifugada a 13000xg durante 10 minutos, para precipitação seletiva de proteínas celulares. A solução sobrenadante, a qual contém o RNA, foi cuidadosamente pipetada e transferida para um novo tubo. 200µl de etanol 95% foram adicionados com a finalidade de precipitar o RNA. Essa solução será transferida para a *Spin Column Assembly* e centrifugada a 12000xg por 1 minuto. Nessa etapa, o RNA estará ligado à superfície sílica encontrada na *Spin Basket.* O líquido residual foi descartado no tubo coletor e o RNA lavado com 600 µl de *RNA Wash Solution*. Após centrifugação, foram adicionados à coluna contendo o RNA 50 µl do mix DNase (40 µl de Yellow Core Buffer, 5 µl de 0,09M MnCl2 e 5µl de DNAse I enzyme), para digerir DNA genômico contaminante. Após incubação por 15 minutos a 20-25ºC, a reação foi interrompida com 200µl de *DNA Stop Solution* e o tubo centrifugado a 12000xg por 1 minuto. Foram processadas então sucessivas lavagens utilizando a *RNA Wash Solution* a fim de purificar o RNA, eliminando sais contaminantes, proteínas e impurezas celulares. Finalmente, o RNA total será eluído da membrana pela adição de *Nuclease Free Water*.

ii) Quantificação do RNA – Determinação de rendimento e pureza

A quantificação do RNA foi realizada através de leitura no aparelho NanoVue Plus™ (GE Healthcare). O RNA puro deverá exibir razão de absorbância 260/280 de 1.7 a 2.1 e 260/230 de 1.8 a 2.2. Após comprovação da pureza, foi determinada a integridade das moléculas através de eletroforese desnaturante em gel de agarose.

iii) Transcrição reversa

A transcrição reversa foi processada de acordo com as instruções do kit GeneAmp RNA PCR – Applied Biosystems. Foi preparado o Mastermix contendo 5mM de MgCl2, 2 µl de 10XPCR Buffer, 1mM de cada deoxinucleotídeo (dATP, dGTP, dCTP e dTTP), 1 U de RNase Inhibitor, 2,5 µl de *MuLV Reverse Transcriptase*, 2,5 µl de oligo d(T)16, 1 µl de amostra (na concentração de 1 ug/µl) e água DEPC em quantidade suficiente para um volume final de 20 µl. Os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 10 minutos para permitir a extensão do Oligo d(T) pela transcriptase. Posteriormente, os tubos foram submetidos a um ciclo de termociclagem com as seguintes temperaturas: 15 minutos a 42ºC, 5 minutos a 99ºC e 5 minutos a 5ºC. Após esse processo, o cDNA está disponível para realização da PCR.

iv) Amplificação

A quantificação relativa da expressão gênica por PCR em tempo real foi processada no aparelho ABI 7300 (Applied Biosystems), utilizando o SYBR® Green Master Mix para detecção dos amplicons. Será analisada a expressão de mRNA das citocinas IFN-γ, IL-10, TNF-α, além dos fatores de transcrição GATA-3, ROR-γT e FOXP3 e quimiocinas e receptores de quimiocinas CCL5,CXCL9,CCL17,CCL24, CXCR3, CCR5, CCR3,CCR6 e CCR4 através da PCR em tempo real quantitativa, de acordo com a ***tabela 1***. Para cada reação, será usado um mix contendo

12,5µl de SYBR® Green Master Mix, 5µM de cada primer – sense e anti-sense, 2µl de cDNA e água ultra pura em quantidade suficiente para um volume de 25 µl. As condições de termociclagem foram as seguintes: 50ºC por 2 minutos, 95°C por 10 minutos; 40 ciclos de 94°C por 30 segundos, 58°C por 30 segundos e 72°C por 1 min. Os valores médios de Ct obtidos a partir de duplicatas foram utilizados para calcular a expressão do gene alvo, normalizado por um controle interno (gene da β-actina), usando a fórmula $2^{-\Delta Ct}$.

Tabela 1 Alvo e iniciadores utilizados. As sequências foram determinadas com base na sequência de nucleotídeos obtidas GenBank Database.

Alvo	Sequência do primer Sense e Antisense
IFN-γ	TTCAAAGGAGCATGGATACCA e TTAAGAACTTGCCAAGCATGTC
IL10	AAT GAA GGACAAGCTGGACAA e TTAAAGTCCTCCAGAAGGGA
TNF-α	TGTTGTAGCAAACCCCGAAG e ATCAGCTGGTTGTCTGTCAGCT
iNOS	GAGATCGTCGCTGTACTCC e TGATGGTCACATTTTGCTTCTG
GATA3	TGTCAAACCACCACTACTACCC e TATGCAGCTTGTAGTACAGCCC
ROR-γT	AAAGCAGGAGCAATGGAAGT e ATTGTAAGCCCGGCACAT
FOXP3	AGAAGCAGCGGACACTCAAT e TCCTGAAGAAGGCAAACATG
CXCL9	CAGATGGTCCTTAAGCCACTTT e CCTTTCCCTGTGAACCTCAA
CCL17	CCATCGTGTTTGTAACTGTCCA e AATATCTGACCGCCTTCTTCAC
CCL24	CCTGCTGCATGTTCTTCATTTC e TTCTGGTTCTTCTTGGTGGTGA
CXCR3	TTCTTTGCCATCCCAGATTTC e ATGCATGGCATTTAGGCG
CCR5	TGTGTCTGCTTCAAAAGCCC e TCACTTGTCACCACCCCAAA
CCR3	CTAGCAGCCTCCCCTGAATTTA e TGTTCAGACTCCTTTTGGGACT
CCR6	AGCTGTTTGTGCCAATTGCTTA e AAAATATTGCCCAGGAGGCC

CCL5	AAGGGCTGACTGATAAATGTGA e AGCGAGAATTTTAATGGAAAGC
CCR4	TTTGGACTAGGTCTCTGCAAGA e AAAAGCCCACCAGGTACATC
β-actina	CCACTTTCCTGTCTTACCCAA e AATTAACCACCCACGGTGTT

v) Validação da técnica de quantificação de mRNA

Para avaliação da expressão das citocinas foi utilizada a PCR em tempo real usando a estratégia de quantificação relativa, onde a expressão gênica de cada citocina foi determinada em relação a expressão observada por cão não infectado pelo *T. cruzi* e normalizada pelo gene constitutivo β- actina. Assim, os resultados foram mostrados em quantas vezes mais, determinado animal possui mRNA para a citocina do que os cães controles não infectados.

Inicialmente foi necessário um experimento de validação, mostrando que as eficiências das amplificações do alvo e do gene de referência (β-actina) eram aproximadamente iguais. A eficiência de amplificação é a taxa na qual uma molécula de DNA é gerada, se a quantidade de cópias aumentar 10 vezes a cada 3,32 ciclos de amplificação durante a fase geométrica, então a reação está ocorrendo com 100% de eficiência. Essa eficiência é calculada baseando-se no slope de uma curva padrão, onde o slope de -3,32 indica uma reação com 100% de eficiência. Para o cálculo da eficiência foi utilizada a seguinte fórmula:

$$\text{Eficiência} = (10\text{-}1/\text{slope} – 1) \times 100$$

Foi observado, ainda, se os ciclos de amplificação (CT) para cada cDNA das citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição se comportavam de forma semelhante após diluição seriada de uma mesma amostra, verificando eventuais inibições que pudessem comprometer o experimento. É importante ressaltar que foram analisados os logs de quantidade de entrada de cDNA (cada diluição) versus variação do CT das citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição e do gene constitutivo para comprovação matemática que permaneciam constantes após a diluição da amostra, se mostrando na forma de uma reta, com equação do tipo y = ax + b, onde o “a”

corresponde a inclinação da reta, que não deveria sair do intervalo de -0,1 e 0,1. Ainda para maior confiabilidade da técnica foi importante observar as curvas de dissociação (ou curva melt) para os cDNA correspondentes aos mRNA das citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição estudadas, para verificação de formação de dímeros de primers durante a reação.

Os resultados da padronização mostrados indicaram que a estratégia de quantificação relativa poderia ser utilizada com segurança para a realização dos experimentos de avaliação da expressão dos mRNA de todas as citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição analisados.

3.9- Análise estatística

Os dados da análise morfométrica e parâmetros imunológicos foram analisados no software GraphPad Prism, sua normalidade foi testada pelo teste de Kolmogorov-Smirnovpelo e teste não paramétrico de Tukey. As diferenças foram consideradas significativas se o *p* foi igual ou menor que 0,05.

4- Resultados

1- Análise quantitativa do infiltrado inflamatório presente no tecido muscular cardíaco de cães infectados por diferentes cepas do *T.cruzi* durante as fases aguda e crônica.

A presença de inflamação no átrio direito dos cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do *T. cruzi*, necropsiados na fase aguda (90 dias de infecção) e crônica (270 dias de infecção), foi determinada pela quantificação de núcleos celulares em cortes histológicos do átrio direito dos cães corados por hematoxilina e eosina. Através desta avaliação foi demonstrada a presença de miocardite em todos os cães infectados, independente da cepa do *T. cruzi* utilizada (Figura 1A e B).

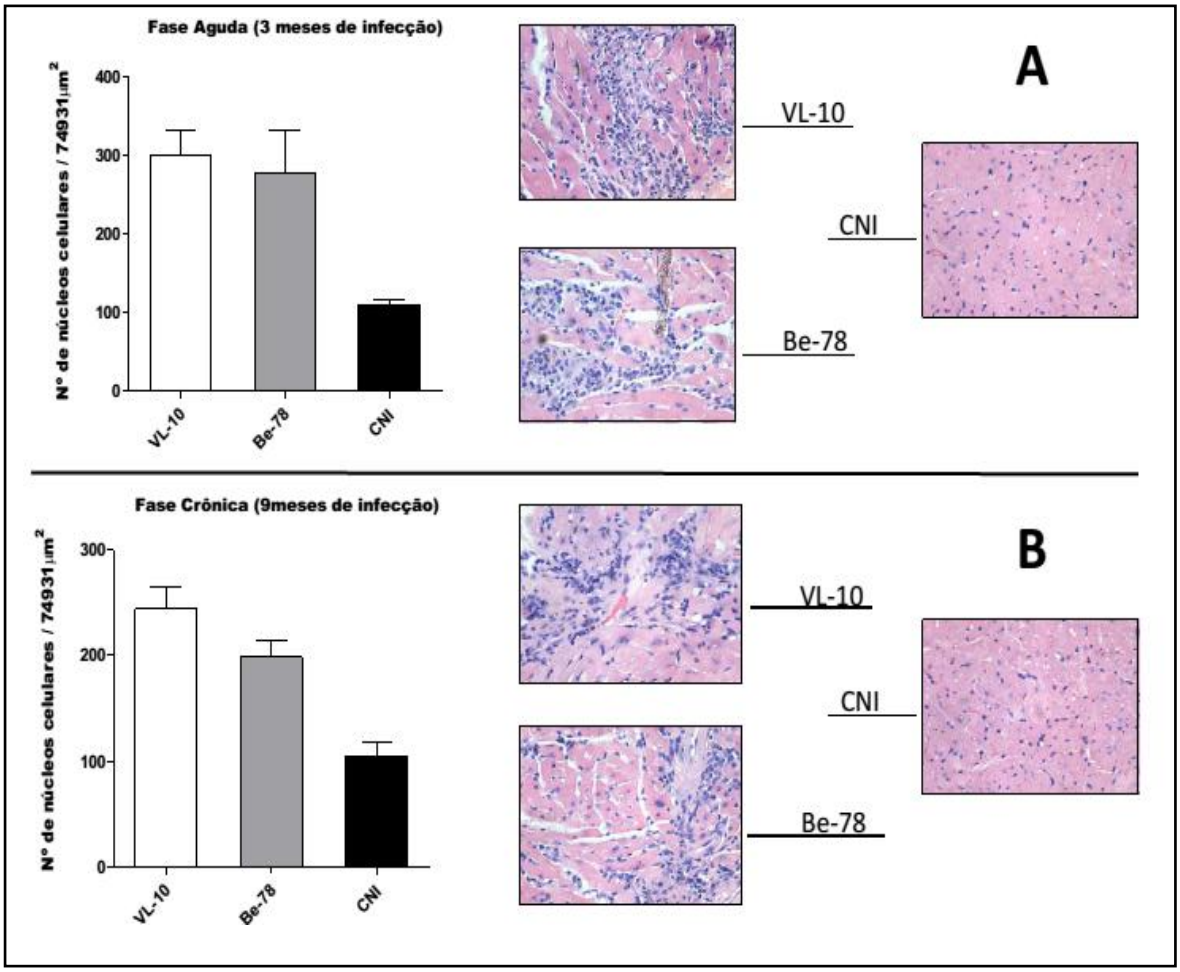

Figura 1 -Miocardite presente após 3 meses de infecção (A) e 9 meses de infecção (B) nos cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 (2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal). Fotomicrografias obtidas de lâminas com cortes de átrio direito coradas pela hematoxilina e eosina. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. (*) P<0,05 (diferença significativa em relação ao grupo controle não infectado-CNI).

No entanto, apesar da miocardite ter sido detectada em ambas as fases da infecção, esta foi mais intensa durante a fase aguda. Nesta fase foram quantificados 301±26 núcleos celulares no tecido muscular cardíaco dos cães infectados pela cepa VL-10, 277,46±50,61 núcleos celulares nos infectados pela cepa Berenice-78 e 109,75±6.22 núcleos celulares nos animais saudáveis, significando um aumento de 2,7 vezes nos animais infectados pela cepa VL-10 e de 2,54 naqueles inoculados pela cepa Berenice-78 em relação aos animais do grupo controle não infectado (Figura 1A). Na fase crônica foi observado um padrão de inflamação semelhante, mas com menor intensidade, ou seja, o número de núcleos

celulares quantificados nos animais infectados com a cepa VL-10 (243,58±18.76 núcelos celulares) foi 2,3 vezes maior do que o observado nos animais saudáveis (105,29±12,05 núcleos celulares), e 1,89 vezes naqueles infectados pela Berenice-78 (198,65±14,11) (Figura 1B).

2- Influência do tratamento com benznidazol na intensidade da miocardite em cães infectados pelas cepas Berenice-78 e VL-10 do *Trypanosoma cruzi.*

Para esta avaliação os animais foram tratados com benznidazol durante a fase aguda da infecção e a análise histopatológica realizada 30 e 180 dias após o tratamento específico. A cura parasitológica foi determinada pelos testes parasitológicos (Hemocultura e PCR) e sorológicos (ELISA), realizados 30 e 180 dias após o término do tratamento. Foram considerados curados os animais que apresentaram resultados negativos em todos os testes realizados. Desta forma, foi detectada falha terapêutica em todos os animais inoculados com a cepa VL-10, pois foram identificados resultados positivos em 90% das hemoculturas e em 100% das PCRs realizadas. Estes resultados foram concordantes com os testes sorológicos, que apresentaram resultados persistentemente positivos. De forma diferente, foram detectados resultados negativos em todos os testes realizados nos animais inoculados com a cepa Berenice-78 após o tratamento específico com benznidazol, sendo desta foram considerados curados.

Os resultados obtidos dos animais tratados na análise morfométrica realizada em cortes histológicos do tecido muscular cardíaco e corados pela Hematoxilia&Eosina, podem ser relacionados com a eficácia do tratamento. Assim, no tecido muscular cardíaco dos animais infectados pela cepa Berenice-78 foram detectados números similares de núcleos celulares aos detectados nos tecidos dos animais do grupo controle não infectado, nas

avaliações realizadas em ambas as fases da infecção. Estes resultados indicam que, neste caso, o tratamento foi capaz de controlar a miocardite (Figura 2A e B).

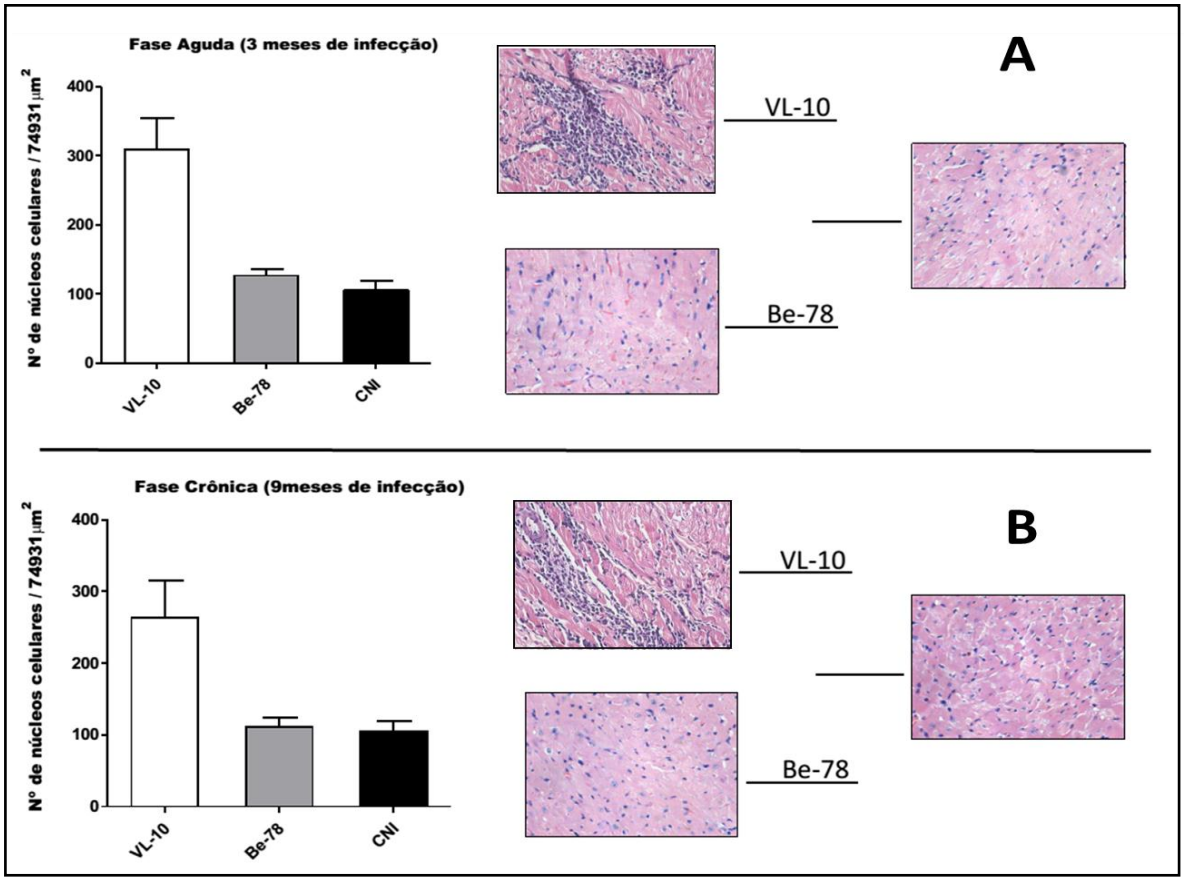

Figura 2 - Miocardite presente após 3 meses de infecção (A) e 9 meses de infecção (B) nos cães infectados pelas cepas VL-10 e Berenice 78 (2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal) e submetidos ao tratamento com benznidazol. Fotomicrografias obtidas de lâminas com cortes de átrio direito coradas pela hematoxilina e eosina. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. (*) P<0,05 (diferença significativa em relação ao grupo controle não infectado-CNI).

De forma diferente, em ambas as fases, os animais inoculados com a cepa VL-10 e submetidos ao tratamento com benznidazol apresentaram miocardite em intensidade semelhante aos animais infectados e não tratados. A média de núcleos celulares dos animais inoculados com a cepa VL-10 e tratados com Bz foi de 308,98± 45,3 núcleos celulares na fase aguda enquanto os animais infectados com a cepa Berenice-78 e animais do grupo controle tiveram médias de 126,65 e 105,291 núcleos celulares respectivamente,

sendo este aumento no infiltrado inflamatório no átrio direito dos cães infectados pela VL-10 encontrado também na fase crônica da infecção (Figura 2A e B).

3- Análise quantitativa da expressão de mRNA dos fatores de transcriçãoT-bet, GATA-3, ROR-γT e FOXP3 no tecido cardíacode cães, durante as fases aguda e crônica da infecção pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi.*

Para esta análise os animais foram divididos em 3 grupos experimentais: (i) infectados (foram agrupados os animais infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do *T. cruzi*, considerando que as duas cepas induziram inflamação no tecido cardíaco dos animais em ambas as fases da infecção), (ii) tratados e curados e (iii) tratados e não curados. Para avaliação da expressão de mRNA dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, ROR-γT e FOXP3 no tecido cardíaco dos cães, foi utilizada a PCR em tempo real usando a estratégia de quantificação relativa, onde a expressão gênica de cada citocina foi determinada em relação a expressão observada em cada cão não infectado pelo *T.cruzi* e normalizada pelo gene constitutivo β-actina. Assim os resultados foram mostrados em quantas vezes mais determinado animal possui mRNA para o fator de transcrição que os cães controles não infectados.

Durante a fase aguda da infecção foi possível observar aumento médio de 5,57 vezes na expressão de mRNA para o fator de transcrição T-bet, relacionado a resposta do tipo Th1, no miocárdio dos animais infectados pelas cepas VL-10 e Berenice-78. Por outro lado, nesta fase da infecção não foi detectada a expressão dos outros fatores de transcrição analisados, GATA-3, ROR-γT e FOXP3.

Entre os animais tratados e não curados foi detectada a expressão do mRNA apenas pata o fator T-bet, em níveis 3,6 vezes maiores do que o detectado nos animais não infectados e estes níveis não foram significativamente diferentes ($p>0,05$) daqueles detectados no grupo de animais infectados e não tratados (Figura 3).

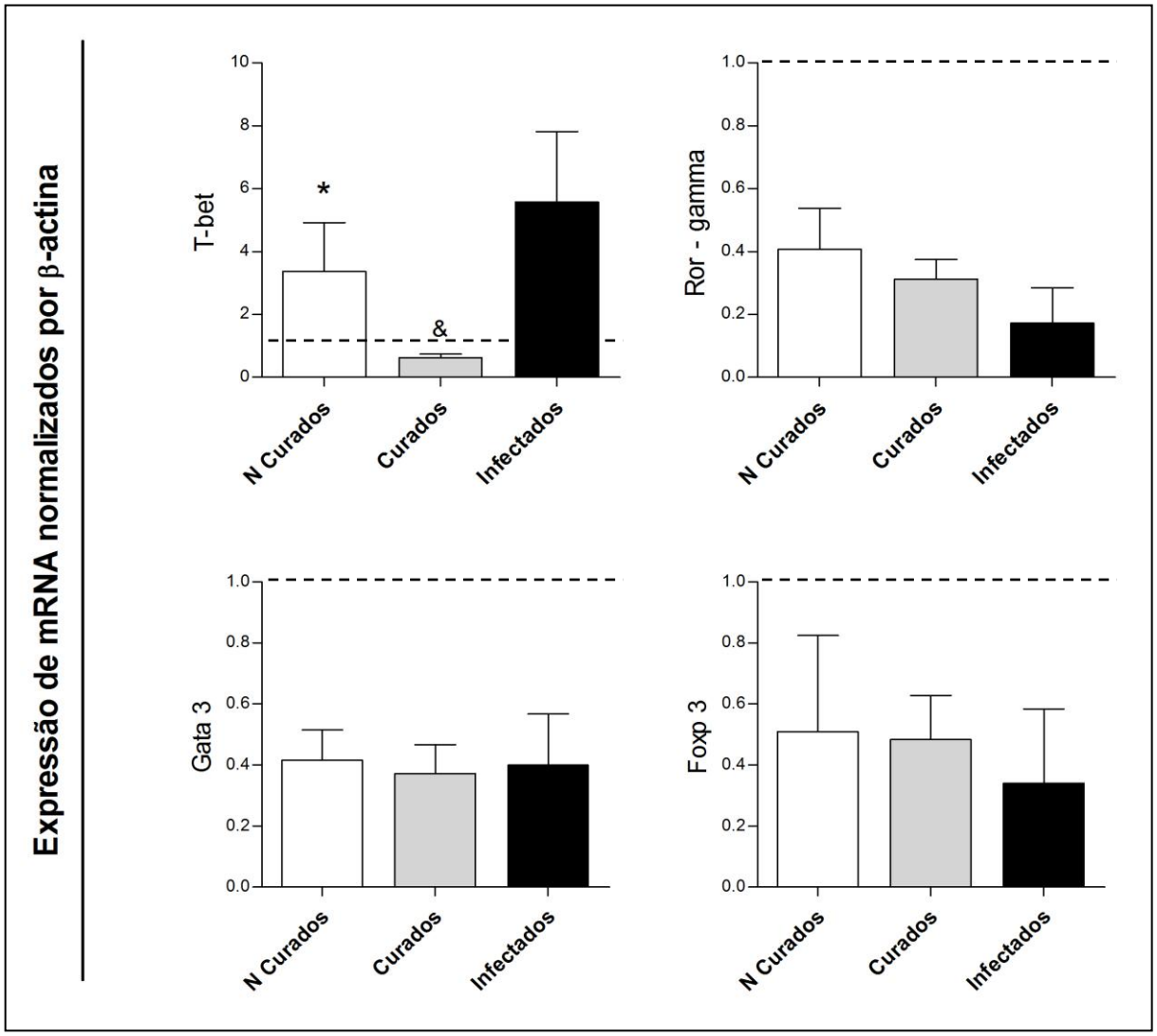

Figura 3 - Expressão de mRNA em fragmentos de tecido cardíaco do átrio direito de cães, inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal das cepas VL-10 e Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*após **3 meses** de infecção, através de Real time RT-PCR. Os resultados de cada cão foram normalizados através dos respectivos índices de β-actina e o índice 1 representa a expressão do grupo controle. O Grupo "Infectados" é composto por animais infectados por ambas as cepas Be-78 e VL-10. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. (*) P<0,05 (diferença significativa em relação ao grupo infectado) (&)P<0,05 (não apresenta diferença significativa em relação ao grupo normal ou apresenta índices abaixo da linha de normalidade)

Um panorama diferente na expressão dos fatores de transcrição foi observado na fase crônica da doença. Nesta fase da infecção foi observada a expressão de todos os fatores

de transcrição avaliados, sendo a expressão nos animais não curados, em relação aos animais não infectados, 1,35 vezes maior de T-bet, 1,27 vezes de GATA3, 1,19 de ROR-γT e 1,06 de FOXP3 (Figura 4).

Nos animais tratados e curados não foi detectada a expressão dos fatores de transcrição T-bet e GATA-3, enquanto naqueles não curados foi detectado um aumento de 1,84 vezes para T-bet e 1,86 vezes de GATA3, sendo este valor significativamente maior em relação ao detectado nos animais curados ($p<0.05$). De forma diferente, o tratamento específico não alterou o nível de expressão de ROR-γT, regulador da expressão de IL-17, que apresenta um papel central na diferenciação de células T regulatórias, detectadas em níveis baixos em todos os grupos experimentais (Figura 4).

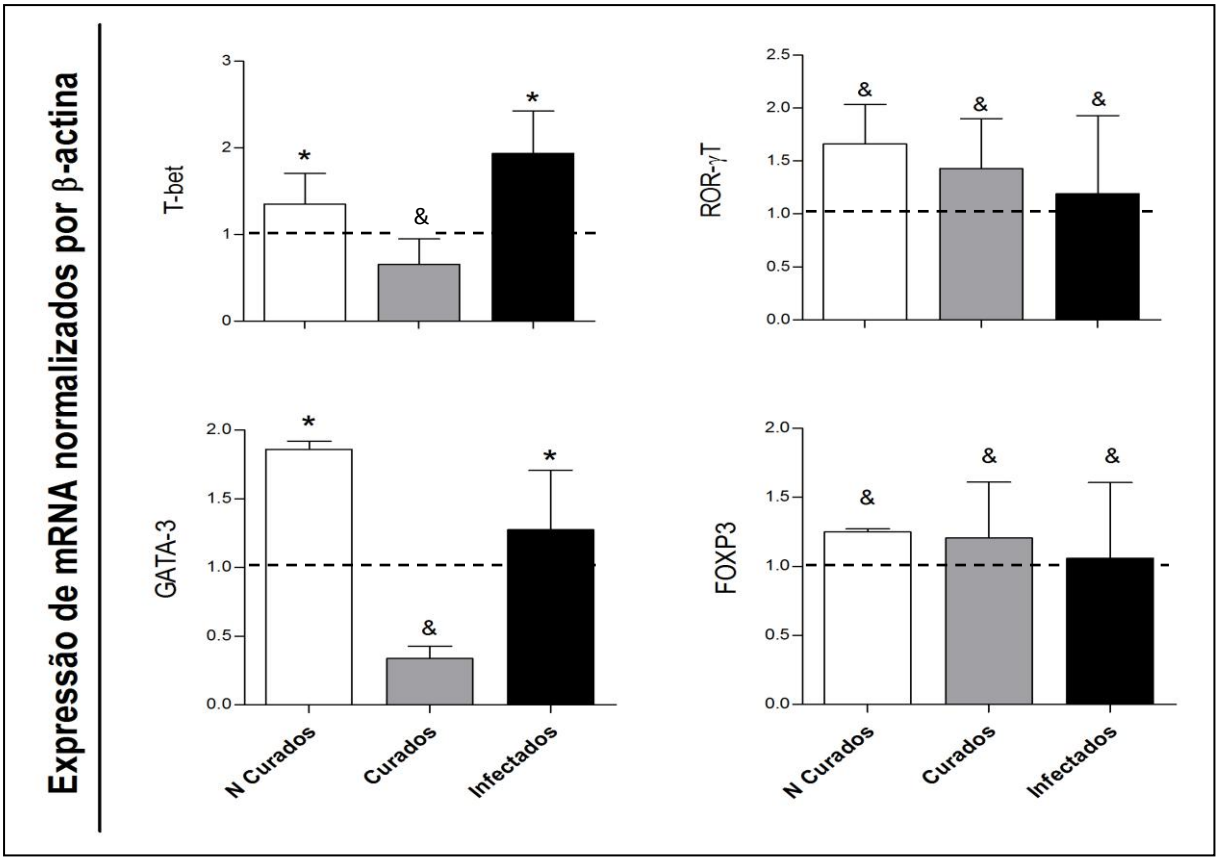

Figura 4 - Expressão de mRNA dos fatores de transcrição T-bet, GATA-3, ROR-γT e FOXP3, em fragmentos de tecido cardíaco do átrio direito de cães, inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal das cepas VL-10 e Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* após **9 meses** de infecção, através de Real time RT-PCR. Os resultados de cada cão foram normalizados através dos respectivos índices de β-actina e o índice 1 representa a expressão do grupo controle. O Grupo "Infectados" é composto por animais infectados por ambas as cepas Be-78 e VL-10. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. (*) P<0,05 (diferença significativa em relação ao infectado) (&)P<0,05 (não apresenta diferença significativa em relação ao grupo normal ou apresenta índices abaixo da linha de normalidade)

4- Quantificação *in situ* da expressão de mRNA das citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-10 no tecido cardíaco de cães, durante as fases aguda e crônica da infecção com as cepas VL-10 e Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi*.

A figura 5 representa a expressão de mRNA para as citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-10 no átrio direito dos animais distribuídos nos mesmos grupos experimentais citados anteriormente.

Durante a fase aguda da infecção foi detectada a expressão de todas as citocinas avaliadas no tecido muscular cardíaco dos animais infectados pelo *T. cruzi*, sendo o aumento da expressão de mRNA em relação aos animais normais, de 4,99 vezes para TNF-α, 2.14vezes para IFN-γ e 1,82 vezes para IL-10 (Fig. 5 A, B e C). O tratamento específico foi eficaz em prevenir a expressão de todas as citocinas quantificadas, quando ocorreu a cura parasitológica. Por outro lado, nos animais tratados e não curados foi detectada a expressão de mRNA para TNF-α 2,94 vezes e para IFN-γ 1,85 vezes maior do que nos animais não infectados. Apesar dos níveis de expressão para estas citocinas nos animais tratados terem sido menores em relação ao grupo controle infectado, esta diferença não foi significativa (p>0,05). Por outro lado, nos grupos de animais tratados, curados ou não, não foi detectada a expressão de IL-10 nesta fase da infecção.

Na fase crônica da infecção foi identificado o mesmo padrão de citocinas nos animais infectados e não tratados. Também, de forma semelhante ao observado durante a fase aguda da infecção não foi detectada a expressão de mRNA para nenhuma das citocinas avaliadas no tecido muscular cardíaco dos animais tratados com benznidazol e curados. De forma diferente o padrão de expressão das citocinas TNF-α, IFN-γ e IL-10 foi marcadamente alterado nos animais submetidos ao tratamento específico e não curados, tendo sido detectado um aumento, em relação aos animais do grupo controle não infectado, de: (i) 2,94 vezes na fase aguda e 7,71 na fase crônica para TNF-α; (ii) 1,85 vezes na fase aguda e 5,92 na fase crônica para IFN-γ; (iii) ausência e expressão na fase aguda e um aumento de 2,35 vezes para IL-10 (Fig 5D, E e F).

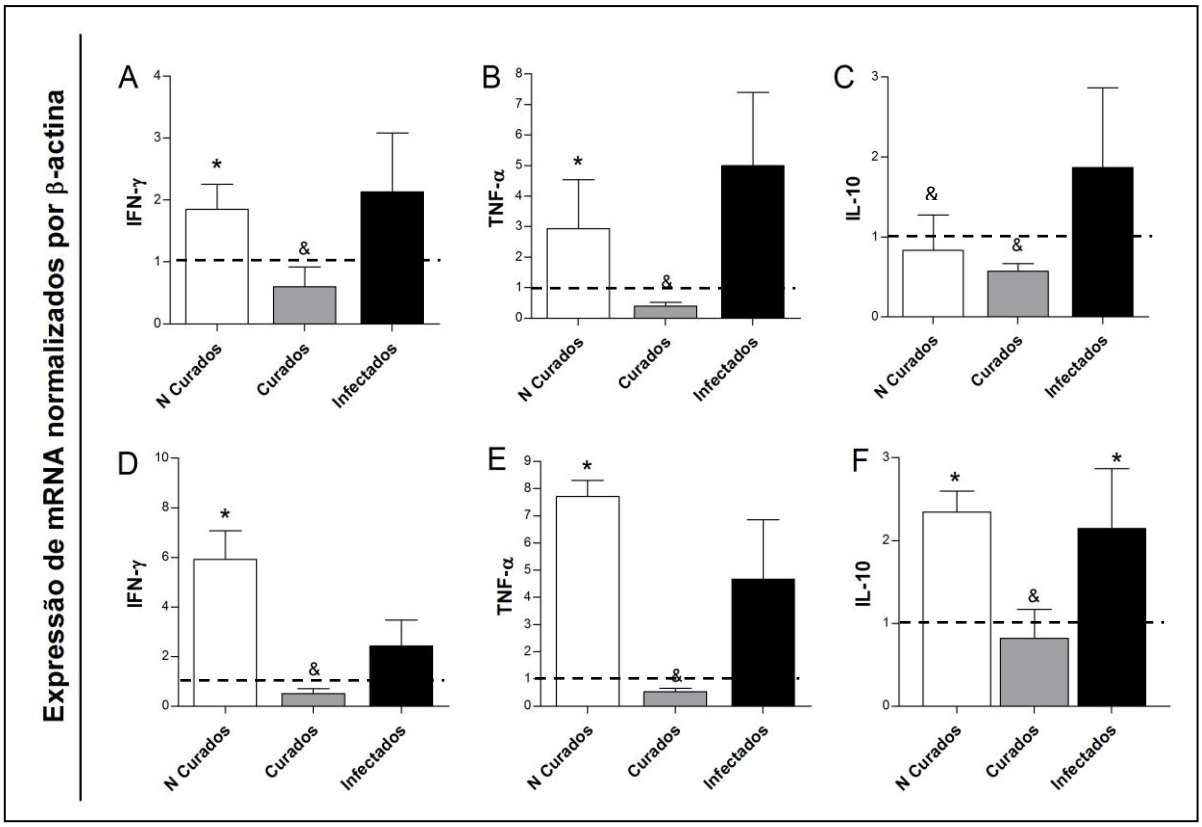

Figura 5 - Expressão de mRNA das citocinas, TNF, IFN-γ e IL-10em fragmentos de tecido cardíaco do átrio direito de cães, inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal das cepas VL-10 e Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* nas fases **aguda (A,B e C) e crônica (D,E e F)** da infecção, através de Real time RT-PCR. Os resultados de cada cão foram normalizados através dos respectivos índices de β-actina e o índice 1 representa a expressão do grupo controle. O Grupo "Infectados" é composto por animais infectados por ambas as cepas Be-78 e VL-10. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. (*) P<0,05 (diferença significativa em relação ao grupo controle infectado) (&)P<0,05 (não apresenta diferença significativa em relação ao grupo normal ou apresenta índices abaixo da linha de normalidade)

5- Quantificação *in situ* da expressão de mRNA para quimiocinas e receptores no tecido cardíaco de cães, durante as fases aguda e crônica da infecção de cães pelas cepas VL-10 e Berenice-78 do *T. cruzi*.

Os resultados da quantificação da expressão de mRNA para as quimiocinas CCL5,CXCL9,CCL17 e CCL24 e receptores de quimiocinas CXCR3, CCR5, CCR3,CCR6 e CCR4 estão representados nas figuras 6 e 7. Após três meses de infecção (fase aguda) o perfil de expressão das quimiocinas observado é composto por CCL5 e CCL24, relacionados

a respostas Th1 e Th2 respectivamente. Neste momento também foram detectadas as expressões de mRNA para os receptores CCR5 e CXCR3 também relacionados a resposta Th1 além de CCR4 relacionado a resposta Th2 e Treg. Quimiocinas e receptores não detectados não estão representados nas figuras 5 e 6. A maior detecção de mRNA para quimiocinas e fatores de transcrição relacionadas a resposta Th1 estão de acordo com os resultados apresentados anteriormente, onde foi demonstrado que durante a fase aguda da infecção apenas a expressão do fator de trasncrição T-bet foi detectado nestes animais.

Nos animais tratados e curados não foi detectada a expressão de nenhuma quimiocina ou receptor relacionados a resposta Th1, mostrando que a cura parasitológica alterou o padrão de resposta imune concomitantemente com a eliminação do parasito e com a redução da resposta inflamatória. De forma interessante, nestes animais foi detectada a expressão de mRNA para CCL24, quimiocina relacionada com a resposta Th2, em níveis similares ao detectado no grupo controle infectado e não tratado e em níveis significativamente maiores do que o observado nos cães tratados e não curados ($p>0,05$).

Nos animais tratados e não curados os níveis de expressão de mRNA para as quimiocinas e receptores relacionados a resposta Th1 foram similares ao observado nos animais infectados e não tratados ($p>0,05$). Nestes animais foi detectado um aumento de cerca de seis vezes na expressão de mRNA para CCL5 em relação aos animais não infectados e de 2,84 e 1,6 CCR5 e CXCR3, respectivamente. Interessantemente, nestes animais os níveis de expressão de mRNA para CCL24 foram significativamente maiores do que o detectado nos outros grupos experimentais ($p<0.05$)(Figura 6).

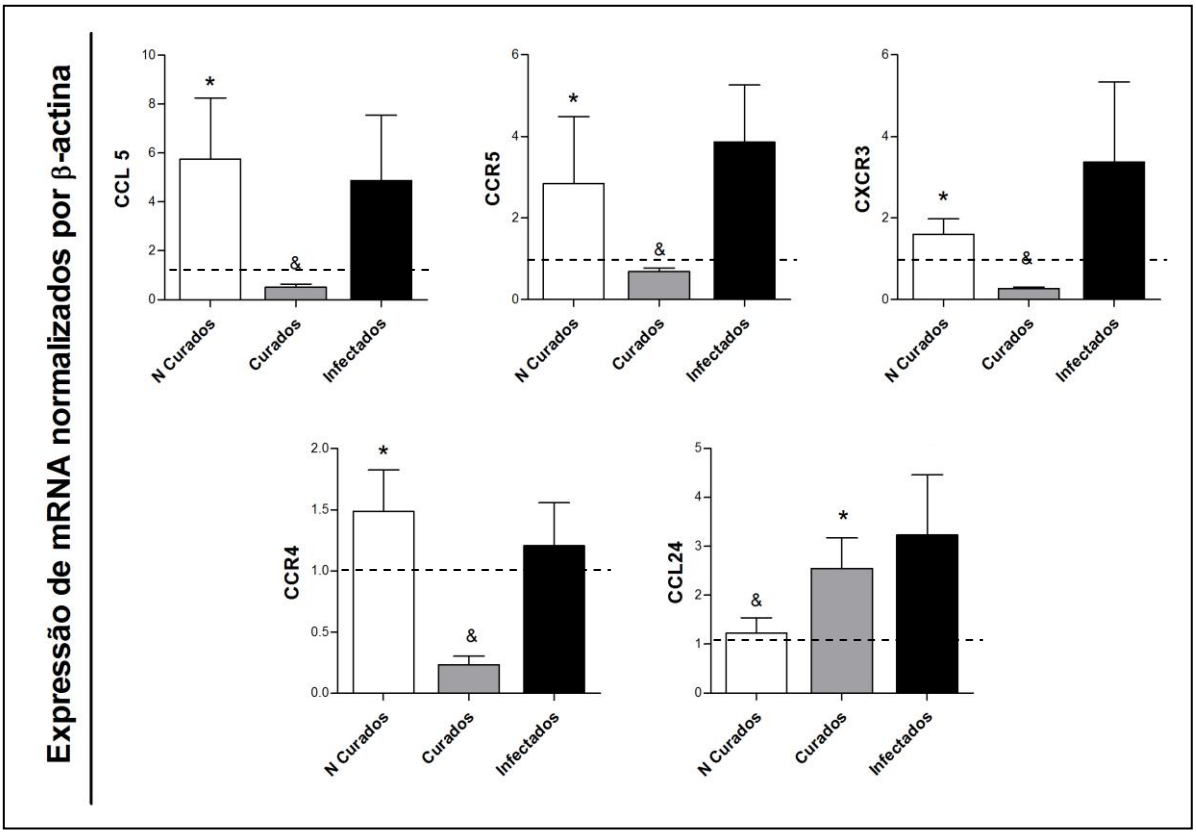

Figura 6 - Expressão de mRNA das quimiocinas CCL5 e CCL24 e dos receptores de quimiocinas CCR5, CXCR3 e CCR4 em fragmentos de tecido cardíaco do átrio direito de cães, inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal das cepas VL-10 e Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* após **3 meses** de infecção, através de Real time RT-PCR. Os resultados de cada cão foram normalizados através dos respectivos índices de β-actina e o índice 1 representa a expressão do grupo controle. O Grupo "Infectados" é composto por animais infectados por ambas as cepas Be-78 e VL-10. As quimiocinas e receptores não representados não apresentaram níveis detectáveis de expressão. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. (*) P<0,05 (diferença significativa em relação ao grupo controle infectado) (&)P<0,05 (não apresenta diferença significativa em relação ao grupo normal ou apresenta índices abaixo da linha de normalidade)

Na fase crônica da infeção foi observado um aumento na detecção da expressão de mRNA para quimiocinas e receptores, em relação à fase aguda da doença. Estes resultados estão de acordo com os resultados apresentados anteriormente, pois nesta fase também foi detectada a expressão de mRNA para os fatores de transcrição, GATA-3, ROR-γT e FOXP3, além de T-bet, também detectado durante a fase aguda da infecção. Nesta fase,

entre todos os parâmetros analisados, apenas não foi detectada a expressão de CXCL9 e CCL24.

Nos animais infectados foi identificada a expressão de quimiocinas e receptores relationados com a resposta Th1 (CCL5, CCR5 e CXCR3), com a resposta Th2 e Treg (CCR4 e CCR3) e com a resposta Th17 (CCL17 e CCR6). Padrão semelhante foi encontrado no tecido cardíaco dos animais tratados e não curados, com exceção da expressão de CCR6, cujo mRNA foi detectado no tecido cardíaco dos animais infectados mas não daqueles tratados e não curados. De forma interessante, nos animais curados não foi detectada a expressão de mRNA para nenhuma citocina ou receptor relacionado a resposta Th1. Nestes animais foi detectada apenas a expressão de CCR4 (similar aos outros grupos experimentais) e de CCL17 (em níveis significativamente menores do que o detectado nos animais dos outros grupos experimentais ($p<0,05$) (Figura 7).

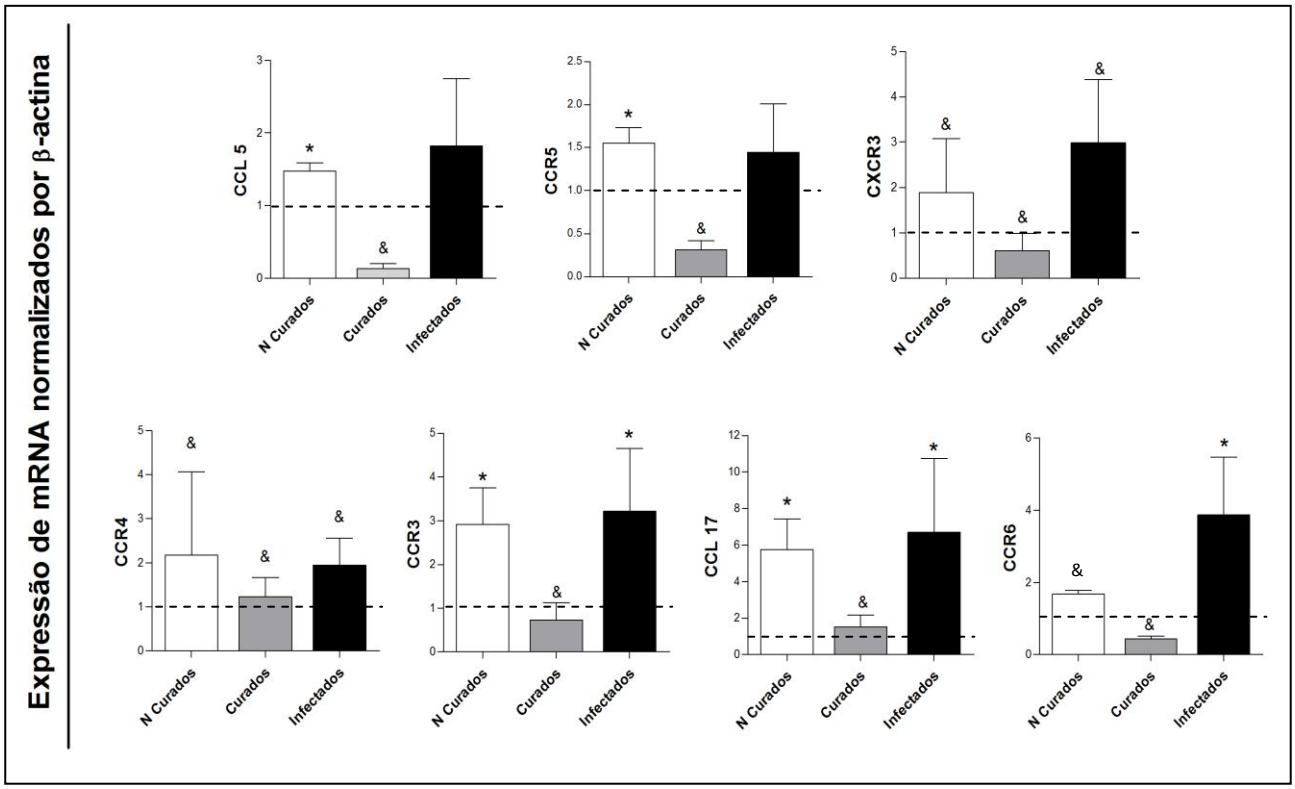

Figura 7 - Expressão de mRNA das quimiocinas CCL5 e CCL17 e dos receptores de quimiocinas CCR5, CXCR3, CCR4, CCR3 e CCR6 em fragmentos de tecido cardíaco do átrio direito de cães, inoculados com 2000 formas tripomastigotas sanguíneas/kg de peso corporal das cepas VL-10 e Berenice-78 do *Trypanosoma cruzi* após **9 meses** de infecção, através de Real time RT-PCR. Os resultados de cada cão foram normalizados através dos respectivos índices de β-actina e o índice 1 representa a expressão do grupo controle. O Grupo "Infectados" é composto por animais infectados por ambas as cepas Be-78 e VL-10. As quimiocinas e receptores não representados não apresentaram níveis detectáveis de expressão. Os resultados foram apresentados pela média dos valores e analisados pelo teste não paramétrico de Tukey. (*) P<0,05 (diferença significativa em relação ao grupo controle infectado) (&) P<0,05 (não apresenta diferença significativa em relação ao grupo normal ou apresentou índices abaixo da linha de normalidade)

De forma geral nossos resultados mostraram que durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* foi observada uma intensa inflamação do tecido muscular cardíaco associada a uma resposta Th1 predominante. A evolução para a fase crônica da doença conduziu a uma redução significativa da inflamação, pois nesta fase foi detectado um número significativamente menor de núcleos celulares em relação à fase aguda (p<0,05) tanto nos

animais infectados pela cepa VL-10 (301,26±30,69 na fase aguda e 243,78±20,56 na fase crônica), quanto naqueles infectados pela cepa Berenice-78 (277,45±55,44 na fase aguda e 198,65±15,46 na fase crônica). A redução do processo inflamatório foi associado com a detecção de mRNA para fatores de transcrição, quimiocinas e seus receptores relacionados às respostas Th1, Th2 e Th17. Adicionalmente foi demonstrado que o tratamento específico induz, no caso de cura parasitológica, redução da inflamação associada com a ausência de detecção de fatores relacionados à resposta Th1, mostrando que estas avaliações podem ser importantes para o controle de cura da infecção pelo *T. cruzi*.

5- Discussão

A cardiopatia chagásica pode resultar em arritmias cardíacas, aneurisma apical, insuficiência cardíaca congestiva, tromboembolismo e morte súbita, sendo a forma mais comum de cardiomiopatia nas Américas Central e do Sul, e a principal causa de morte por doença cardiovascular em áreas endêmicas (WHO, 2013). Especificamente na doença de Chagas, a gravidade relacionada à forma cardíaca da doença está ligada inicialmente ao desequilíbrio imunológico entre as respostas Th1 e Th2 causado pelo *Trypanosoma cruzi* (ABEL et al., 2001; BAHIA-OLIVEIRA et al., 1998; BASSO et al., 2004; CORRÊA-OLIVEIRA et al., 1999; GOMES et al., 2003, 2005, GUEDES et al., 2009, 2012; REIS et al., 1997; RIBEIRAO et al., 2000). A alta carga parasitária e a intensa multiplicação do parasito durante a fase aguda da doença explicam o desencadeamento dos eventos inflamatórios e a miocardite observada. Esta alta carga parasitária resulta na indução de uma forte resposta imune inata e adaptativa levando ao controle, porém não à completa eliminação do parasito, estabelecendo uma infecção crônica onde a carga parasitária é bastante reduzida. Porém, apesar de escasso, o parasito ou o seu DNA (indicativo da presença do parasito) pode ser detectado no tecido muscular cardíaco, tanto de indivíduos assintomáticos quanto naqueles portadores de cardiopatia (FONSECA *et al*, 2005. Além disso, células T reativas, tanto a antígenos específicos do *T. cruzi* como a antígenos cardíacos (miosina cardiaca), têm sido detectadas no coração de indivíduos sintomáticos e assintomáticos (FONSECA *et al*, 2005), indicando que outros fatores distintos dos antígenos presentes podem controlar as diferenças na intensidade da inflamação e na progressão da doença entre os indivíduos infectados pelo *T. cruzi*. Neste contexto, o entendimento dos mecanismos e produtos da resposta imune do hospedeiro que estão relacionados a estes eventos inflamatórios e a sua manutenção é de grande importância para compreender os fatores relacionados ao desencadeamento dos eventos inflamatórios

cardíacos, contribuindo para elaboração de estratégias de tratamento ou para a prevenção de alterações decorrentes da manifestação da doença.

Apesar de o modelo murino ser o mais utilizado para estudos experimentais da infecção pelo T.*cruzi*, outros modelos experimentais, como o cão, tem sido utilizados em diferentes estudos, em decorrência da similaridade com a infecção humana, especialmente considerando a cardiopatia chagásica. Um modelo que representa com maior proximidade as manifestações da doença de Chagas é importante para a melhor compreensão da evolução da doença e principalmente sobre os mecanismos associados a esta progressão. Vários pesquisadores já demonstraram semelhanças entre ambas as infecções (canina/humana) nas fases agudas e crônica da doença (ANDRADE, *et al*. 1984; LANA *et al*,1988; BARR *et al*, 1991; LANA *et al*, 1992; BAHIA *et al*, 2002). Utilizando o cão como modelo experimental da infecção chagásica Caldas e colaboradores (2013), mostraram que este animal apresenta alterações eletrocardiográficas relacionadas à condução do impulso elétrico, ritmos eletrocardiográficos alterados e sobrecarga das câmaras cardíacas compatíveis com a doença humana. Adicionalmente, alterações na função cardíaca sistólica e diastólica (redução da fração de ejeção e da fração de encurtamento, aumento do volume dos átrios e dos ventrículos) compatíveis com aquelas observadas no homem, foram detectadas em cães infectados pelo *T. cruzi* (Santos *et al*, 2012). Outra contribuição importante do modelo canino é na avaliação de novas drogas e/ou estratégias terapêuticas para a doença de chagas. Diferentes estudos têm demonstrado que a resposta terapêutica ao tratamento específico observado em cães é semelhante ao observado na doença humana, tanto quando utilizado o fármaco de referência para o tratamento da doença de Chagas, o benznidazol (GUEDES *et al*, 2002), como outros compostos, como o derivado triazólico ravuconazol (DINIZ *et al*, 2010).

Apesar do avanço no entendimento coletivo sobre os mecanismos que envolvem a patogênese da doença de Chagas e o papel da resposta imune neste contexto, vários aspectos ainda não foram esclarecidos. Desta forma este trabalho pretende contribuir para o entendimento dos mecanismos imunes, principalmente em relação à expressão de algumas citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição e sua relação com a miocardite. Adicionalmente, foi avaliada se a interferência do tratamento específico com benznidazol, em caso de cura ou falha terapêutica, poderia modular a expressão destas citocinas, quimiocinas e fatores de transcrição.

A fase aguda da doença de Chagas é caracterizada por intensa destruição de cardiomiócitos resultante da multiplicação parasitária. A lise dos cardiomiócitos diretamente pela multiplicação dos parasitos pode também gerar mecanicamente a destruição de grande número de fibras cardíacas. Adicionalmente, debris celulares e outros "fatores" altamente imunogênicos são liberados, induzindo intenso processo inflamatório, o que contribui para o aumento da destruição de células viáveis (ANDRADE *et al*, 1994; TAFURI 1979). Desta maneira, durante a fase aguda da infecção, a intensidade da miocardite estaria diretamente relacionada com a intensa multiplicação parasitária.

Neste estudo foi observado que os cães infectados pelas cepas Berenice-78 e VL-10 do *T. cruzi* apresentaram miocardite em ambas as fases da infecção, aguda e crônica, sendo o número de células inflamatórias detectadas no tecido cardíaco dos animais infectados significativamente maior do que o detectado naqueles não infectados. Porém a intensidade da miocardite observada nos animais infectados pelas duas cepas do *T. cruzi* foi menor na fase crônica da doença quando comparada à fase aguda (Figura 1). A intensa carga parasitária, observada durante a fase aguda, seguida pela redução do parasitismo em decorrência do estabelecimento da resposta imune adaptativa durante a fase crônica podem

explicar, pelo menos parcialmente, esta redução do processo inflamatório em uma fase mais tardia da infecção.

Neste estudo também foi avaliada a interferência do tratamento específico com benznidazol na intensidade da inflamação no tecido muscular cardíaco nas fases aguda e crônica da infecção. Os resultados desta avaliação mostraram que, de maneira geral, o tratamento específico foi eficaz em alterar os níveis de miocardite no caso de sucesso terapêutico. Estes resultados corroboram com a hipótese de que a carga parasitaria está ligada à intensidade da miocardite em indivíduos infectados pelo *T. cruzi.* Assim, o sucesso ou o fracasso terapêutico do tratamento com benznidazol, determinou a intensidade da miocardite dos cães infectados por ambas as cepas do *T. cruzi*. De acordo com a caracterização da cepa VL-10 como resistente ao tratamento com benznidazol (FILARDI & BRENER, 1987, CALDAS *et al*, 2008), não foi detectada cura parasitológica em nenhum dos animais infectados por esta cepa. Desta maneira, o tratamento não foi eficaz em prevenir ou reduzir a miocardite nestes cães, sendo o número de núcleos celulares detectados no tecido cardíaco dos animais tratados semelhante ao dos animais infectados pela mesma cepa e não submetidos ao tratamento. Por sua vez, todos os animais infectados pela cepa Berenice-78, sensível ao benznidazol (CALDAS *et al*, 2008), foram curados. A eficiência da terapia, neste caso, determinou a prevenção da miocardite, pois em todos os animais tratados o número de núcleos inflamatórios presentes no tecido cardíaco foi similar ao observado nos animais não infectados.

O tratamento com benznidazol também influenciou, de maneira dependente à eficácia terapêutica, a expressão do fator de transcrição T-bet na fase aguda da doença (Figura 3). O fator de transcrição T-bet está expresso somente em células do perfil Th1 sendo este fator crucial para a diferenciação de células para este perfil (SZABO *et al*, 2000;

SZABO *et al*, 2002). Já na fase inicial da infecção, células fagocitárias entram em contato com o parasito e produzem citocinas como TNF-α e IL-12 (ALIBERTI *et al*, 1996), sendo estas citocinas capazes de estimular a produção de IFN-γ por células NK. Desta maneira como o tratamento com o benznidazol não foi capaz de curar parasitologicamente os animais infectados pela cepa VL-10, o contato entre o *T. cruzi* e células apresentadoras de antígenos do hospedeiro continuaram acontecendo e consequentemente a produção de IFN-γ. O IFN-γ, citocina característica do perfil Th1, além de estimular macrófagos a produzir óxido nítrico (REED *et al*, 1999), um dos principais responsáveis por danos no tecido muscular cardíaco de indivíduos chagásicos, também é capaz de induzir a expressão de T-bet (AFKARIAN *et al*, 2002; LIGHVANI *et al*, 2001) e consequentemente a polarização do perfil Th1. Neste caso, a presença de miocardite apenas nos animais não curados corrobora a elevada expressão de T-bet nestes animais.

De forma interessante, durante a fase crônica da infecção dos animais inoculados com a cepa VL-10 (tratados e não curados) foi observada redução significativa da miocardite em relação à fase aguda, sendo também observada uma redução de cerca de 3 vezes na expressão de T-bet. E ao contrário da menor expressão de T-bet na fase crônica em relação a fase aguda, os animais não curados apresentaram aumento da produção de GATA-3 na fase crônica da doença. Este aumento pode estar relacionado à diminuição de T-bet, uma vez que Zhu *et al*, (2012) demonstraram que a diminuição de T-bet resulta na diferenciação de células para o perfil Th2. Já os animais infectados pela cepa Berenice-78 não apresentaram aumento na expressão de T-bet e GATA-3 na fase crônica, assim como na fase aguda, e desta maneira não foi observada miocardite nestes cães, os quais apresentaram número de núcleos celulares semelhante ao observado para os animais não infectados. Os fatores de transcrição ROR-γT e FOXP3 associados aos perfis celulares Th17 e Treg respectivamente, apesar de estarem expressos apenas na fase crônica, parecem

não sofrer influência do tratamento específico. Curiosamente, a expressão de mRNA para ROR-γT e FOXP3 foi similar entre os animais infectados e aqueles tratados, independente do resultado do tratamento.

Cada fator de transcrição está associado a um perfil celular de linfócitos T e cada linfócito que apresenta um destes perfis produz diferentes citocinas e quimiocinas (ZHU *et al*, 2008; ZHU *et al*, 2012). A avaliação da expressão de mRNA para as citocinas IFN-γ, TNF-α e IL-10 no nosso trabalho, demonstrou que estas citocinas estão relacionadas a intensidade da miocardite. Outros trabalhos demonstraram que cães infectados por diferentes cepas do *T. cruzi* apresentam aumento da expressão de mRNA para IFN-γ e IL-10 além de identificado aumento de TNF-α no soro destes animais (GUEDES *et al*, 2009; SOUZA *et al*, 2014). Em nosso trabalho as citocinas IFN-γ e TNF-α estavam aumentadas em relação aos animais não infectados, nos grupo infectado e infectado e não curado, em ambas as fases da doença. Este fato sugere que o tratamento com benznidazol modula a produção das citocinas IFN-γ e TNF-α nos animais considerados curados, sendo a inibição na produção de citocinas já demonstrada em experimento *in vitro* (REVELLI *et al*, 1999). A expressão de IL-10 permaneceu baixa em ambas as fases da doença nos animais infectados pela cepa Berenice-78 (curados), porém nos animais infectados pela cepa VL-10 (não curados), exclusivamente na fase crônica, houve aumento na expressão desta citocina em relação à expressão de mRNA observada no grupo não infectado. Este fato corrobora com os resultados de expressão de mRNA dos fatores de transcrição T-bet e GATA-3. Vários autores demonstraram que ao contrário do que era imaginado anteriormente (MOSMANN *et al*, 1986), a citocina IL-10 não é produzida exclusivamente por células do perfil Th2 (ANDERSON *et al*, 2007; MCGEACHY *et al*, 2007), porém, este perfil continua sendo altamente associado à produção de IL-10. Assim o aumento de expressão de mRNA para GATA-3 nos animais não curados, durante a fase crônica da doença, pode

estar relacionado com o aumento de IL-10 no mesmo período, uma vez que este fator de transcrição é importante na polarização do perfil Th2. O fator de transcrição T-bet apresentou altos índices de expressão de mRNA nos animais não curados e em ambas as fases da doença. De maneira semelhante, a expressão de mRNA para IFN-γ em ambas as fases da infecção, assim como T-bet, teve índices de expressão maiores que os observados no grupo controle, sugerindo uma relação positiva entre a expressão de T-bet e IFN-γ.

Tão importante quanto a polarização da resposta celular para os diferentes perfis e a produção de citocinas como TNF, IFN-γ e IL-10, a migração de células leucocitárias para sítios inflamatórios e sítios da resposta imune tem papel fundamental no estabelecimento da resposta imune. As quimiocinas e seus respectivos receptores associados são os responsáveis por esta migração para sítios específicos (EBERT *et al*, 2005; GERARD *et al*, 2001; MOSER *et al*, 2001; DEVAUX *et al*, 1997). As quimiocinas pertencem uma família de pequenas glicoproteínas (8 a 15 kd) subdivididas em 4 subfamilias (CXC, CC, C e CX3C), sendo classificadas de acordo com a posição de seu resíduo de cisteína em relação a sua sequência aminoterminal (ROLLINS, 1997). As quimiocinas controlam o tráfego leucocitário através de interação com seus respectivos receptores nas células alvo. Estes receptores são compostos por sete domínios transmembrana, acoplados a proteína G e frequentemente um mesmo receptor é capaz de interagir com quimiocinas diferentes (MURPHY *et al*, 2000). A interação quimiocinas/receptor é capaz de desencadear o aumento de cálcio intracelular e consequentemente a migração das células alvos para sítios específicos.

Vários autores já demonstraram que diversos tipos de doenças inflamatórias estão relacionados à presença de quimiocinas e receptores cognatos relacionados ao perfil Th1. Quimiocinas da subfamília CC como CCL5 foram associadas à gravidade da doença em

pacientes com falha cardíaca, sendo os níveis de quimiocinas maiores nos pacientes com quadros mais graves segundo a classe funcional New York Heart Association e de maneira independente da causa deste quadro (AUKRUST *et al*, 1998). Outro estudo realizado em humanos demonstrou que a expressão de mRNA para a citocina CCL5 e dos receptores CCR5 e CXCR3 estavam aumentados nos pacientes com cardiopatia chagásica crônica e este aumento estava relacionado a presença de miocardite nestes pacientes (NOGUEIRA *et al*, 2012). Estudos utilizando o modelo canino também corroboram a participação de quimiocinas e receptores na manifestação da forma cardíaca da doença. Guedes *et al*, (2010) demonstraram que em cães infectados por diferentes cepas do *T. cruzi*, a expressão de mRNA da quimiocina CCL5 e o receptor CXCR3 estavam aumentados nos animais diagnosticados com a forma cardíaca da doença de Chagas. Souza e colaboradores (2014) também observaram exacerbação na expressão de mRNA para CCL5 e CCR5 em cães infectados pela cepa Berenice-78.

Neste trabalho foi possível observar que na fase aguda da doença, especificamente nos cães não curados, a expressão de mRNA para a quimiocina CCL5 e dos receptores CCR5 e CXCR3, todos relacionados a células do perfil Th1, foi semelhante a observada no grupo infectado não tratado. Este perfil de expressão de mRNA para quimiocinas condiz com a expressão de mRNA para citocinas inflamatórias observadas neste mesmo grupo, pois estudos demonstraram relação positiva entre produção de citocinas de perfil Th1 e quimocinas e receptores deste mesmo perfil (TALVANI *et al*, 2000). Além disso, o perfil Th1 está relacionado à intensidade da cardiopatia humana e experimental (ABEL *et al* 2001; GOMES *et al* 2003; GUEDES *et al* 2009), corroborando os resultados que demonstraram intensa miocardite no grupo de cães não curados, ou seja, aqueles que apresentavam expressão de várias citocinas e quimiocinas características do perfil Th1. Além da expressão de mRNA para as quimiocinas do perfil Th1, os cães infectados pela

cepa VL-10 (não curados) também apresentaram expressão de CCR4, receptor encontrado em células dos perfis Th2, Th17 e Treg (BROMLEY *et al*, 2008). Apesar do receptor CCR4 ter sido expresso em índices elevados e estar associado a células responsáveis pela regulação da resposta inflamatória, nenhuma quimiocina cognata a este receptor (dentre as quimiocinas avaliadas neste trabalho) apresentou expressão de mRNA, o que pode explicar a ineficiência em prevenir a miocardite nestes animais. Além disso, somente a expressão deste receptor pode ter sido insuficiente para manter o balanço entre as respostas Th1 e Th2. Os animais infectados pela cepa Berenice-78 e posteriormente curados, não apresentaram índices elevados de nenhuma das quimiocinas e receptores avaliados, com exceção de CCL24. Apesar de não observarmos expressão de mRNA para nenhum receptor cognato a CCL24 é sabido que várias quimiocinas são capazes de se ligar a diferentes tipos de ligantes (KOELINK *et al*, 2012). Desta maneira juntamente com o fato de os animais curados expressarem baixos níveis de mRNA para moléculas do perfil Th1 a expressão de CCL24 parece ter conferido aos animais curados um efeito protetor em relação à miocardite.

Na fase crônica da infecção foi detectada a expressão de um maior número de quimiocinas e receptores em relação à fase aguda. Os animais não curados, assim como na fase aguda, apresentaram expressão de mRNA para CCL5 e CCR5 semelhantes ao grupo controle. Porém a expressão de CXCR3 foi semelhante entre todos os grupos experimentais. Outro receptor de quimiocinas associado a resposta Th1 e Th2, CCR3, apresentou alto índice de expressão na fase crônica dos animais não curados, o que sugere sua importância nesta fase da doença de Chagas. Apesar da expressão de CCL5 e CCR5 permanece na fase crônica da doença houve uma redução na expressão de mRNA para estas citocinas durante este período, podendo desta maneira ter influenciado na diminuição da miocardite observada na fase crônica em relação a fase aguda da doença. Além disso, a

expressão da quimiocina CCL17 e seu receptor cognato CCR4 (Th2, Th17 e Treg), além do receptor CCR6 (Treg, Th17), também parecem ter contribuído para a diminuição na intensidade da miocardite nos cães infectados pela cepa VL-10 (não curados), durante a fase crônica. O aumento na expressão de mRNA para CCR4 e CCL17 e a expressão de CCR6, durante a fase crônica, justamente o período quando a miocardite diminuiu, corrobora com trabalhos que relacionam o aumento deste receptores e quimiocina na forma indeterminada, em relação à forma cardíaca da doença de Chagas experimental (Guedes *et al*, 2010).

Em relação aos animais infectados pela cepa Berenice-78, tratados com benznidazol e curados, a expressão de mRNA relativo às quimiocinas e receptores descritos anteriormente foi menor ou semelhante ao índice de normalidade. Comparando estes resultados com a expressão das mesmas citocinas nos animais infectados pela mesma cepa (Berenice-78), porém não tratados, é possível observar que houve redução na expressão de todas estas moléculas. Estes dados sugerem que o tratamento com benznidazol é capaz de modular a expressão de quimiocinas e receptores, assim como a expressão de mRNA de fatores de transcrição e citocinas quando o tratamento conduz à cura parasitológica dos animais.

6- Conclusões

De forma geral, os nossos resultados permitem concluir:

- A intensa inflamação no tecido muscular cardíaco observada durante a fase aguda de cães infectados pelas cepas Berenice-78 e VL-10 do é associada a resposta tipo Th1 predominante.

- A evolução para a fase crônica da infecção de cães infectados pelas cepas Berenice-78 e VL-10 do *T. cruzi* foi associada a uma redução significativa da inflamação, que pode ser relacionado com a alteração no perfil de resposta imune, sendo detectados mRNA para fatores de transcrição, quimiocinas e seus receptores relacionados às respostas Th1, Th2 e Th17.

- O tratamento específico induz, no caso de cura parasitológica, redução da inflamação associada com a ausência de detecção de fatores relacionados à resposta Th1, mostrando que estas avaliações podem ser importantes para o controle de cura da infecção pelo *T. cruzi*.

-O tratamento específico, no caso de falha terapêutica, não alterou a intensidade da miocardite, e tampouco o perfil da resposta imune nos animais infectados pela cepa VL-10 do *T. cruzi*.

7- Referências

ABEL, L. C. . et al. Chronic Chagas' Disease Cardiomyopathy Patients Display an Increased IFN-γ Response to Trypanosoma cruzi Infection. **Journal of Autoimmunity**, v. 17, n. 1, p. 99–107, ago. 2001.

AFKARIAN, M. et al. T-bet is a STAT1-induced regulator of IL-12R expression in naïve CD4+ T cells. **Nature Immunology**, v. 3, n. 6, p. 549–557, 1 jun. 2002.

ALIBERTI, J. C. et al. Interleukin-12 mediates resistance to Trypanosoma cruzi in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infection and immunity**, v. 64, n. 6, p. 1961–7, jun. 1996.

ANDERSON, C. F. et al. CD4(+)CD25(-)Foxp3(-) Th1 cells are the source of IL-10-mediated immune suppression in chronic cutaneous leishmaniasis. **The Journal of experimental medicine**, v. 204, n. 2, p. 285–97, 19 fev. 2007.

ANDRADE, Z. A. Anatomia patológica da doença de Chagas. **Rev Goiana Med**, v. 4, n. 2, p. 103-19, 1958.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. A patologia das doença de Chagas experimental no cão. **Mem Inst Oswaldo Cruz Rio de Janeiro**, v. 75, n. 3–4, p. 77–95, 1980.

ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, Z. A. The canine model of Chagas' disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 79, p. 77–83, 1984.

ANDRADE, Z. A. et al. The indeterminate phase of Chagas' disease: ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 57, n. 3, p. 328–36, set. 1997.

AÑEZ, N. et al. Myocardial parasite persistence in chronic chagasic patients. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 60, n. 5, p. 726–732, maio 1999.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease**. The Lancet**, 2010.

ANSELMI, A. et al. Myocardiopathy in Chagas' disease. I. Comparative study of pathologic findings in chronic human and experimental Chagas' myocarditis. **American heart journal**, v. 72, n. 4, p. 469–81, out. 1966.

ARAUJO, F. F. et al. Potential role of CD4+CD25HIGH regulatory T cells in morbidity in Chagas disease. **Front Biosci**, v. 12, p. 2797–2806, 1 maio 2007.

AUKRUST, P. et al. Elevated Circulating Levels of C-C Chemokines in Patients With Congestive Heart Failure. **Circulation**, v. 97, n. 12, p. 1136–1143, 1998.

AVILA, H. A. et al. Polymerase chain reaction amplification of Trypanosoma cruzi kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: diagnosis of chronic Chagas' disease. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 48, n. 2, p. 211–221, out. 1991.

BAFICA, A. et al. Cutting edge: TLR9 and TLR2 signaling together account for MyD88-dependent control of parasitemia in Trypanosoma cruzi infection. **Journal of immunology**, v. 177, n. 6, p. 3515–9, 15 set. 2006.

BAHIA, M. T. et al. Comparison of Trypanosoma cruzi infection in dogs inoculated with blood or metacyclic trypomastigotes of Berenice-62 and Berenice-78 strains via intraperitoneal and conjunctival routes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 4, p. 339–345, ago. 2002.

BAHIA-OLIVEIRA, L. M. et al. Immunological and clinical evaluation of chagasic patients subjected to chemotherapy during the acute phase of Trypanosoma cruzi infection 14-30 years ago. **The Journal of infectious diseases**, v. 182, n. 2, p. 634–8, ago. 2000.

BARBOSA, A. J. et al. Estudo comparativo entre o método convencional e o método da peroxidase anti-peroxidase na pesquisa do parasitismo tissular na cardiopatia chagásica crônica. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 28, n. 2, p. 91–96, 1986.

BARR, S. C. et al. Pathologic features of dogs inoculated with North American Trypanosoma cruzi isolates. **American Journal of Veterinary Research**, v. 52, n. 12, p. 2033–2039, dez. 1991.

BASSO, B. et al. Acute Trypanosoma cruzi infection: IL-12, IL-18, TNF, sTNFR and NO in T. rangeli-vaccinated mice. **Vaccine**, v. 22, n. 15–16, p. 1868–1872, 2004.

BEN YOUNÈS-CHENNOUFI, A. et al. Persistence of Trypanosoma cruzi antigens in the inflammatory lesions of chronically infected mice. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 82, n. 1, p. 77–83, 1988.

BENVENUTI, L. et al. Chronic American trypanosomiasis: parasite persistence in endomyocardial biopsies is associated with high-grade myocarditis. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 102, n. 6, p. 481–487, 18 set. 2008.

BILATE, A. M. B.; CUNHA-NETO, E. Chagas disease cardiomyopathy: Current concepts of an old disease**. Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, 2008.

BRAGA, M. S. et al. Persistent infections in chronic chagas' disease patients treated with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 3, p. 157–161, 2000.

BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. **Annual review of microbiology**, v. 27, n. 1, p. 347–382, out. 1973.

BRITTO, C. et al. A simple protocol for the physical cleavage of Trypanosoma cruzi kinetoplast DNA present in blood samples and its use in polymerase chain reaction (PCR)-based diagnosis of chronic Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 88, n. 1, p. 171–2, 1993.

BROMLEY, S. K.; MEMPEL, T. R.; LUSTER, A. D. Orchestrating the orchestrators: chemokines in control of T cell traffic. **Nature immunology**, v. 9, n. 9, p. 970–80, set. 2008.

CALDAS, I. S. et al. Benznidazole therapy during acute phase of Chagas disease reduces parasite load but does not prevent chronic cardiac lesions. **Parasitology Research**, v. 103, n. 2, p. 413–421, 4 jul. 2008.

CALDAS IS. **Impacto do tratamento com Benznidazol na evolução da doença de Chagas experimental - análise imunopatológica e funcional**. 2011. 137 f. Tese (Doutorado em Imunobiologia dos protozoários) - Núcleo de Pesquisa em Ciências Biológicas, Ouro Preto. 2011

CALDAS, I. S. et al. Myocardial scars correlate with eletrocardiographic changes in chronic Trypanosoma cruzi infection for dogs treated with Benznidazole. **Tropical Medicine and International Health**, v. 18, n. 1, p. 75–84, jan. 2013.

CAMARGO, M. M. et al. Glycoconjugates isolated from Trypanosoma cruzi but not from Leishmania species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-

gamma-primed macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 159, n. 12, p. 6131–9, 15 dez. 1997.

CASTAÑERA, M. B. et al. Evaluation of dogs as sentinels of the transmission of Trypanosoma cruzi in a rural area of north-western Argentina. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 92, n. 6, p. 671–83, set. 1998.

CANÇADO, J. R. Long term evaluation of etiological treatment of Chagas disease with benznidazole. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 44, n. 1, p. 29–37, 2002.

CARDILLO, M. R.; YAP, E. P. TGF-beta 1 in colonic neoplasia. A genetic molecular and immunohistochemical study. **Archives d'anatomie et de cytologie pathologiques**, v. 44, n. 5–6, p. 241–9, set. 1996.

CHAGAS, C. Nova tripanozomiaze humana: estudos sobre a morfolojia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen., n. sp., ajente etiolojico de nova entidade morbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, n. 2, p. 159–218, ago. 1909.

CORRÊA-OLIVEIRA, R. et al. The role of the immune response on the development of severe clinical forms of human Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94 Suppl 1, n. 94, p. 253–5, 1999.

COSSIO, P. M. et al. Chagasic cardiopathy. Demonstration of a serum gamma globulin factor which reacts with endocardium and vascular structures. **Circulation**, v. 49, n. 1, p. 13–21, jan. 1974.

COURA, J. R. Contribution to the study of Chagas' disease in the state of Guanabara. **Revista brasileira de malariologia e doencas tropicais. Publicacoes avulsas**, v. 18, n. 1, p. 9–98, 1966.

COURA JR, DE CASTRO SL. A critical review on Chagas disease chemotherapy. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v 97, p. 3-24,2002.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 5–13, jul. 2010.

COURA, J. R. Chagas disease: Control, elimination and eradication. Is it possible? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. 8, p. 962–967, dez. 2013.

CUNHA-NETO, E. et al. Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas' disease cardiomyopathy. **The American journal of pathology**, v. 167, n. 2, p. 305–313, ago. 2005.

CUNHA-NETO, E. et al. Immunological and non-immunological effects of cytokines and chemokines in the pathogenesis of chronic Chagas disease cardiomyopathy. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 252–258, jul. 2009.

DE LANA, M. et al. Clinical and laboratory status of patients with chronic chagas disease living in a vector-controlled area in Minas Gerais, Brazil, before and nine years after aetiological treatment. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 8, p. 1139–1147, 2009.

DE SOUZA, W. Cell Biology of Trypanosoma cruzi. **International Review of Cytology**, v. 86, p. 197–283, 1984.

DEVAUX, B. et al. Upregulation of cell adhesion molecules and the presence of low grade inflammation in human chronic heart failure. **European heart journal**, v. 18, n. 3, p. 470–9, mar. 1997.

DIAS JCP, MACEDO. V. Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias. In: **Dinâmica das Doenças Infecciosas e Parasitárias**. Rio de Janeiro. p. 557–593.

DIAS, J. C. P.; AMATO NETO, V.; LUNA, E. J. DE A. Mecanismos alternativos de transmissão do Trypanosoma cruzi no Brasil e sugestões para sua prevenção. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical 44(3):375-379,** v. 44, n. 3, p. 375–379, jun. 2011.

DINIZ, L. DE F. et al. Effects of ravuconazole treatment on parasite load and immune response in dogs experimentally infected with Trypanosoma cruzi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 54, n. 7, p. 2979–2986, jul. 2010.

DOCAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. **Chemico-Biological Interactions**, v. 73, n. 1, p. 1–27, 1990.

DUTRA, W. O.; ROCHA, M. O. C.; TEIXEIRA, M. M. The clinical immunology of human Chagas disease. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 12, p. 581–587, 2005.

EBERT, L. M.; SCHAERLI, P.; MOSER, B. Chemokine-mediated control of T cell traffic in lymphoid and peripheral tissues. **Molecular Immunology**, v. 42, n. 7, p. 799–809, maio 2005.

ESTRADA-FRANCO, J. G. et al. Human Trypanosoma cruzi infection and seropositivity in dogs, Mexico. **Emerging Infectious Diseases**, v. 12, n. 4, p. 624–630, abr. 2006.

FERREIRA HDE, O. Treatment of the undetermined form of Chagas disease with nifortimox and benzonidazole. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 23, n. 4, p. 209–211, 1990.

FERREIRA, I.; SILVA, T. transmissão da doença de Chagas pelo Triatoma infestans no Brasil: um fato histórico; Transmission elimination of Chagas' disease by Triatoma infestans. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 39, n. 5, p. 507–509, out. 2006.

FILARDI, L. S.; BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of Trypanosoma cruzi strains to drugs used clinically in Chagas disease. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 81, n. 5, p. 755–759, 1987.

FONSECA, S. G. et al. Locally produced survival cytokines IL-15 and IL-7 may be associated to the predominance of CD8+ T cells at heart lesions of human chronic chagas disease cardiomyopathy. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 66, n. 2–3, p. 362–371, ago. 2007.

FRANCHI, L. et al. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. **Nature immunology**, v. 10, n. 3, p. 241–7, 2009.

FUENMAYOR-MEZA, C. E. **Quantitative analysis of histopathologica alterations in endomyocardial biopsies from patients in different clinical forms of Chagas' disease or with dilated cardiomyopathy, regarding myocardial structure, T cruzi antigens and subsets of T lymphocytes**. Tese, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2000.

GASCON, J.; BERN, C.; PINAZO, M. J. Chagas disease in Spain, the United States and other non-endemic countries. **Acta Tropica**, v. 115, n. 1–2, p. 22–27, 2010.

GAZZINELLI, R. T. et al. Interleukin 12 is required for the T-lymphocyte-independent induction of interferon y by an intracellular parasite and induces resistance in T-cell-deficient hosts (Toxoplasma gondii/natural killer cells). **Immunology**, v. 90, n. July, p. 6115–6119, 1 jul. 1993.

GERARD, C.; ROLLINS, B. J. Chemokines and disease. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 108–115, 1 fev. 2001.

GIRONÈS, N. et al. Antibodies to an epitope from the Cha human autoantigen are markers of Chagas' disease. **Clinical and diagnostic laboratory immunology**, v. 8, n. 6, p. 1039–1043, nov. 2001.

GIRONÈS, N. ÚRIA; FRESNO, M. Etiology of Chagas disease myocarditis: Autoimmunity, parasite persistence, or both? **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 1, p. 19–22, 2003.

GOMES, M. L. et al. Trypanosoma cruzi : Optimization of Polymerase Chain Reaction for Detection in Human Blood. **Experimental Parasitology**, v. 33, n. 88, p. 28–33, jan. 1998.

GOMES, J. A. S. et al. Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas' disease is due to a Th1-specific immune response. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 3, p. 1185–1193, mar. 2003.

GOMES, J. A. S. et al. Type 1 chemokine receptor expression in Chagas' disease correlates with morbidity in cardiac patients. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 12, p. 7960–7966, dez. 2005.

GUEDES, P. M. M. et al. Deficient regulatory T cell activity and low frequency of IL-17-producing T cells correlate with the extent of cardiomyopathy in human Chagas' disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 4, 2012.

GUEDES, P. et al. Advances in Chagas Disease Chemotherapy. **Anti-Infective Agents in Medicinal Chemistry**, v. 5, n. 2, p. 175–186, 1 abr. 2006.

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

GUEDES, P. M. M. et al. Increased type 1 chemokine expression in experimental Chagas disease correlates with cardiac pathology in beagle dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v. 138, n. 1–2, p. 106–113, 2010.

GURTLER, R. et al. Domestic dogs and cats as sources of Trypanosoma cruzi infection in rural northwestern Argentina. **Parasitology**, v. 134, n. Pt 1, p. 69–82, 2007.

HIGUCHI, M. DE L. et al. Correlation between Trypanosoma cruzi parasitism and myocardial inflammatory infiltrate in human chronic chagasic myocarditis: Light microscopy and immunohistochemical findings. **Cardiovascular Pathology**, v. 2, n. 2, p. 101–106, abr. 1993.

HIGUCHI, M. L. [Chagas disease. Importance of the parasite in the pathogenesis of the cardiac chronic disease]. **Arq Bras Cardiol**, v. 64, n. 3, p. 251–254, mar. 1995.

HIGUCHI, M. D. L. et al. Association of an increase in CD8+ T cells with the presence of Trypanosoma cruzi antigens in chronic, human, chagasic myocarditis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 56, n. 5, p. 485–489, maio 1997.

JONES, E. M. et al. Amplification of a Trypanosoma cruzi DNA sequence from inflammatory lesions in human chagasic cardiomyopathy. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 3, p. 348–357, mar. 1993.

KIERSZENBAUM, F. Chagas' disease and the autoimmunity hypothesis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n. 2, p. 210–223, abr. 1999.

KIRCHHOFF, L. V. Is Trypanosoma cruzi a new threat to our blood supply? **Ann. Intern. Med.**, v. 111, n. 10, p. 773–775, 15 nov. 1989.

KJOS, S. A.; SNOWDEN, K. F.; OLSON, J. K. Biogeography and Trypanosoma cruzi Infection Prevalence of Chagas Disease Vectors in Texas, USA. **Vector borne and zoonotic diseases (Larchmont, N.Y.)**, v. 9, n. 1, p. 41–50, fev. 2009.

KOEBERLE, G., PENHA, D., KOEBERLE, F. **Aperistalse chagásica do esôfago**. An. Congr. Intern. Doença de Chagas (1959), n. 2, p. 717-722, 1961.

KOELINK, P. J. et al. Targeting chemokine receptors in chronic inflammatory diseases: An extensive review. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 133, n. 1, p. 1–18, 2012.

LAGES-SILVA, E. et al. Relationship between Trypanosoma cruzi and human chagasic megaesophagus: Blood and tissue parasitism. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 435–441, nov. 2001.

LANA, M.; CHIARI, C. A. Caracterização biológica comparativa das cepas Berenice e Berenice-78 de Trypanosoma cruzi isoladas da mesma paciente em diferentes períodos. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 81, n. 3, p. 247–253, set. 1986.

LANA, M. DE et al. Fase crônica cardíaca fibrosante da Tripanossomíase cruzi experimental no cão. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 21, n. 3, p. 113–121, set. 1988.

LANA, M. DE; CHIARI, E.; TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 87, n. 1, p. 59–71, mar. 1992.

LAURIA-PIRES, L. et al. Progressive chronic chagas heart disease ten years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, n. 3–4, p. 111–118, 2000.

LEON, J. S. et al. Cardiac myosin autoimmunity in acute Chagas' heart disease. **Infection and Immunity**, v. 69, n. 9, p. 5643–5649, set. 2001.

LIGHVANI, A. A. et al. T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 98, n. 26, p. 15137–15142, 2001.

MACÊDO, V. Indeterminate Form of Chagas Disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 94, n. SUPPL. 1, p. 311–316, 1999.

MACHADO, F. S. et al. Current understanding of immunity to Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease. **Seminars in Immunopathology**, v. 34, n. 6, p. 753–770, 2012.

MARINHO, C. R. F. et al. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. **Infection and Immunity**, v. 67, n. 1, p. 308–318, jan. 1999.

MARINO, A. P. M. P. et al. CC-chemokine receptors: A potential therapeutic target for Trypanosoma cruzi-elicited myocarditis. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 93–96, mar. 2005.

MCGEACHY, M. J. et al. TGF-beta and IL-6 drive the production of IL-17 and IL-10 by T cells and restrain T(H)-17 cell-mediated pathology. **Nature immunology**, v. 8, n. 12, p. 1390–1397, 11 dez. 2007.

MINISTÉRIO DE SAÚDE. Boletim Epidemiológico. **Secretaria de Vigilância em saúde**, v. 46, n. 21, p. 1–9, 2015.

MONCAYO, A. Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 98, n. 5, p. 577–591, jul. 2003.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. e1867, 2012.

MORENO, M. et al. Trypanosoma cruzi benznidazole susceptibility in vitro does not predict the therapeutic outcome of human Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 105, n. 7, p. 918–924, nov. 2010.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–57, 1 abr. 1986.

MOSER, B.; LOETSCHER, P. Lymphocyte traffic control by chemokines. **Nature immunology**, v. 2, n. 2, p. 123–128, 1 fev. 2001.

MOTT, K. E. et al. Trypanosoma cruzi infection in dogs and cats and household seroreactivity to T. cruzi in a rural community in northeast Brazil. **Am J Trop Med Hyg**, v. 27, n. 6, p. 1123–1127, nov. 1978.

MURPHY, P. M. et al. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. **Pharmacological reviews**, v. 52, n. 1, p. 145–176, mar. 2000.

NOGUEIRA, L. G. et al. Myocardial Chemokine Expression and Intensity of Myocarditis in Chagas Cardiomyopathy Are Controlled by Polymorphisms in CXCL9 and CXCL10. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 10, p. e1867, 2012.

PARKER, E. R.; SETHI, A. Chagas disease: Coming to a place near you. **Dermatologic Clinics**, v. 29, n. 1, p. 53–62, jan. 2011.

PÉREZ-FUENTES, R. et al. Severity of chronic Chagas disease is associated with cytokine/antioxidant imbalance in chronically infected individuals. **International Journal for Parasitology**, v. 33, n. 3, p. 293–299, 2003.

PINTO, A. Y. D. N. et al. Fase aguda da doença de Chagas na Amazônia brasileira. Estudo de 233 casos do Pará, Amapá e Maranhão observados entre 1988 e 2005. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 41, n. 6, p. 602–614, 2008.

PRATA, A. Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease. **The Lancet. Infectious diseases**, v. 1, n. 2, p. 92–100, 2001.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **The Lancet**, v. 375, n. 9723, p. 1388–1402, 17 abr. 2010.

REED, J. C. Caspases and cytokines: roles in inflammation and autoimmunity. **Advances in immunology**, v. 73, p. 265–99, 1999.

REIS, M. M. et al. An in situ quantitative immunohistochemical study of cytokines and IL-2R+ in chronic human chagasic myocarditis: correlation with the presence of myocardial Trypanosoma cruzi antigens. **Clin Immunol Immunopathol**, v. 83, n. 2, p. 165–172, maio 1997.

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

REVELLI, S. et al. Benznidazole, a drug employed in the treatment of Chagas' disease, down- regulates the synthesis of nitrite and cytokines by murine stimulated macrophages. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 118, n. 2, p. 271–277, nov. 1999.

ROLLINS, B. J. Chemokines. **Blood**, n. 90, p. 909–928, 1997.

ROWLAND, E.; LUO, H.; MCCORMICK, T. Infection characteristics of an Ecuadorian Trypanosoma cruzi strain with reduced virulence. **The Journal of parasitology**, v. 81, n. 1, p. 123–6, fev. 1995.

SAMBROOK, J.; GETHING, M. J. Protein structure. Chaperones, paperones. **Nature**, v. 342, n. 6247, p. 224–225, 16 nov. 1989.

SAMUDIO, M. et al. Cytokine responses in Trypanosoma cruzi-infected children in Paraguay. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 58, n. 1, p. 119–121, jan. 1998.

SANTOS, F. M. et al. Cardiomyopathy prognosis after benznidazole treatment in chronic canine Chagas' disease. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 8, p. 1987–1995, 1 ago. 2012.

SANTOS, F. R.; PENA, S. D. J.; EPPLEN, J. T. Genetic and population study of a Y-linked tetranucleotide repeat DNA polymorphism with a simple non-isotopic technique. **Hum Genet**, v. 90, n. 6, p. 655–656, fev. 1993.

SATHLER-AVELAR, R. et al. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: What must be understood? **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. SUPPL. 1, p. 246–251, jul. 2009.

SCHIJMAN, A. G. et al. Trypanosoma cruzi DNA in cardiac lesions of Argentinean patients with end-stage chronic Chagas heart disease. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 70, n. 2, p. 210–220, fev. 2004.

SHIKANAI-YASUDA, M. A. et al. [Acute Chagas' disease: transmission routes, clinical aspects and response to specific therapy in diagnosed cases in an urban center]. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 32, n. 1, p. 16–27, 1990.

SCHLEMPER, JUNIOR, B. R. **Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de chagas / Characterization of strains of Trypanosoma cruzi isolated from patients with different clinical forms of Chagas disease.**, 1982.

SILVA, G. K. et al. Cutting Edge: Nucleotide-Binding Oligomerization Domain 1-Dependent Responses Account for Murine Resistance against Trypanosoma cruzi Infection. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 3, p. 1148–1152, 2010.

SOUZA, S.; VIEIRA, P.; ROATT, B. Dogs infected with the blood trypomastigote form of Trypanosomacruzi display an increase expression of cytokines and chemokines plusan intense cardiac parasitism. v. 58, p. 92–97, 2014.

SUASNÁBAR, D. F. et al. Evolutive behavior towards cardiomyopathy of treated (nifurtimox or benznidazole) and untreated chronic chagasic patients. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo**, v. 42, n. 2, p. 99–109, abr. 2000.

STUART, K. et al. Kinetoplastids: Related protozoan pathogens, different diseases. **Journal of Clinical Investigation**, v. 118, n. 4, p. 1301–1310, abr. 2008.

SZABO, S. J. et al. A novel transcription factor, T-bet, directs Th1 lineage commitment. **Cell**, v. 100, n. 6, p. 655–669, 17 mar. 2000.

SZABO, S, J. et al. Distinct effects of T-bet in Th1 lineage commitment and IFN- production in CD4 and CD8 T cells. **Science**, v. 295, n. 5553, p. 338–342, 2002.

TAFURI, W.L. **Pathogenesis of Trypanosoma cruzi infections**. In: Lumsden WHR, Evans DA, eds. Biology of Kinetoplastidae. London, Academic Press, p. 547-610, 1979.

TAFURI, W. L. Patogenia da doença de chagas. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 29, n. 4, p. 194–199, ago. 1987.

TALVANI, A. et al. Kinetics of cytokine gene expression in experimental chagasic cardiomyopathy: Tissue parasitism and endogenous IFN-ᵞ as important determinants of chemokine mRNA expression during infection with Trypanosoma cruzi. **Microbes and Infection**, v. 2, n. 8, p. 851–866, jul. 2000.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L.; DOWNS, M. O. "Autoimmune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 94, n. 8, p. 3932–3937, 1997.

TARLETON, R. L.; ZHANG, L. Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence? **Parasitology Today**, v. 15, n. 3, p. 94–99, 1999.

TEIXEIRA, A. R. et al. Trypanosoma cruzi-sensitized T-lymphocyte mediated 51CR release from human heart cells in Chagas' disease. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 27, n. 6, p. 1097–1107, nov. 1978.

TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T.; SILVA, J. S. Chemokines, inflammation and Trypanosoma cruzi infection**, Trends in Parasitology**, 2002.

TEIXEIRA, A. R. L.; NASCIMENTO, R. J.; STURM, N. R. Evolution and pathology in Chagas disease - A Review. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 101, n. 5, p. 463–491, ago. 2006.

VAGO, A. R. et al. PCR detection of Trypanosoma cruzi DNA in esophageal tissues of patients with chronic digestive Chagas' disease. **Lancet**, v. 348, n. 9031, p. 891–892, 1996.

VAGO, A. R. et al. Genetic characterization of Trypanosoma cruzi directly from tissues of patients with chronic Chagas disease: differential distribution of genetic types into diverse organs. **The American journal of pathology**, v. 156, n. 5, p. 1805–9, maio 2000.

VIOTTI, R. et al. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: Clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. **American Heart Journal**, v. 127, n. 1, p. 151–162, jan. 1994.

VOLLER, A.; BIDWELL, D. E.; BARTLETT, A. Enzyme immunoassays in diagnostic medicine. Theory and practice. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 53, n. 1, p. 55–65, 1976.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Chagas disease(American trypanosomiasis)**. Fact sheet, n. 340, fev. 2013.

ZHANG, L.; TARLETON, R. L. Parasite persistence correlates with disease severity and localization in chronic Chagas' disease. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 2, p. 480–486, ago. 1999.

ZHU, J.; PAUL, W. E. CD4 T cells: fates, functions, and faults. **Blood**, v. 112, n. 5, p. 1557–69, 1 set. 2008.

ZHU, J. et al. The transcription factor T-bet is induced by multiple pathways and prevents an endogenous Th2 cell program during Th1 cell responses. **Immunity**, v. 37, n. 4, p. 660–73, 19 out. 2012.

ZINGALES, B. et al. A new consensus for Trypanosoma cruzi intraspecific nomenclature: second revision meeting recommends TcI to TcVI. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. 7, p. 1051–4, nov. 2009.