

Doença de chagas: manual para experimentação animal

Tania C. Araújo-Jorge
Solange L. de Castro
(Orgs.)

SciELO Books / SciELO Livros / SciELO Libros

JORGE, TCA., and CASTRO, SL., orgs. *Doença de chagas: manual para experimentação animal* [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2000. 368 p. Antropologia e Saúde collection. ISBN 85-85676-75-2. Available from SciELO Books <<http://books.scielo.org>>.



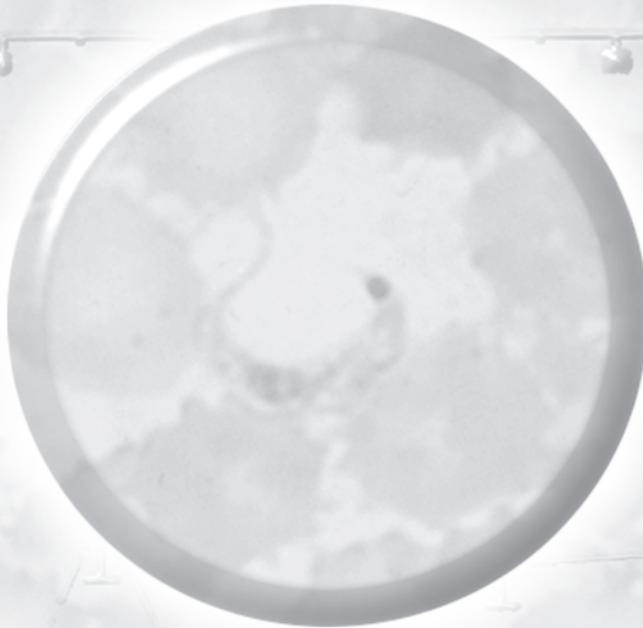
All the contents of this work, except where otherwise noted, is licensed under a Creative Commons Attribution-Non Commercial-ShareAlike 3.0 Unported.

Todo o conteúdo deste trabalho, exceto quando houver ressalva, é publicado sob a licença Creative Commons Atribuição - Uso Não Comercial - Partilha nos Mesmos Termos 3.0 Não adaptada.

Todo el contenido de esta obra, excepto donde se indique lo contrario, está bajo licencia de la licencia Creative Commons Reconocimiento-NoComercial-CompartirIgual 3.0 Unported.

Doença de Chagas

Manual para experimentação animal



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Presidente

Eloi de Souza Garcia

Vice-Presidente de Ambiente, Comunicação e Informação

Maria Cecília de Souza Minayo

EDITORA FIOCRUZ

Coordenadora

Maria Cecília de Souza Minayo

Conselho Editorial

Carlos E. A. Coimbra Jr.

Carolina M. Bori

Charles Pessanha

Hooman Momen

Jaime L. Benchimol

José da Rocha Carneiro

Luiz Fernando Ferreira

Luiz David Castiel

Miriam Struchiner

Paulo Amarante

Paulo Gadelha

Paulo Marchiori Buss

Vanizete Macêdo

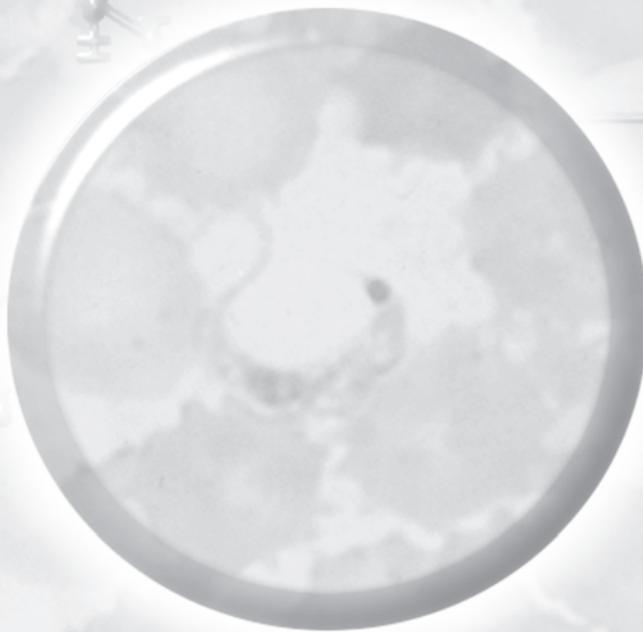
Zigman Brener

Coordenador Executivo

João Carlos Canossa P. Mendes

Doença de Chagas

Manual para experimentação animal



*Edição comemorativa aos 90 anos da descoberta
da doença de Chagas (1909-1999)*

Tania C. Araújo-Jorge & Solange L. de Castro

organizadoras



Copyright © 2000 dos autores
Todos os direitos desta edição reservados à
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ / EDITORA

ISBN: 85-85676-75-2

Capa, projeto gráfico e tratamento de imagens
Angélica Mello

Editoração eletrônica
Beatriz de Moraes Vieira

Preparação de originais e copidesque
Solange L. de Castro

Revisão
Marly Willcox

Revisão final
Marcionílio Cavalcanti de Paiva

Catálogo-na-fonte
Centro de Informação Científica e Tecnológica
Biblioteca Lincoln de Freitas Filho

J82d Jorge, Tania C. de Araújo (org.)

Doença de Chagas: manual para experimentação animal. / Organizado por Tania C. de Araújo-Jorge e Solange Lisboa de Castro. – Rio de Janeiro : Editora Fiocruz / Instituto Oswaldo Cruz, 2000.

368p., il., tab.

1. Doença de Chagas-induzido quimicamente 2. Animais de Laboratório 3. Manuais de Laboratório [tipo de publicação] I. Castro, Solange Lisboa de (org.)

CDD - 20.ed. – 616.9363

2000
EDITORA FIOCRUZ
Rua Leopoldo Bulhões, 1480, térreo – Manguinhos
21041-210 – Rio de Janeiro – RJ
Tels.: (21) 598-2701 e 598-2702
Telfax: (21) 598-2509

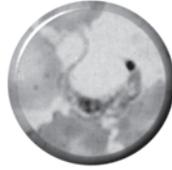
Para

Carlos Chagas, o pai, o desbravador de um caminho
que hoje muitos pesquisadores brasileiros estão seguindo,
mirando-se no seu exemplo único e admirável
de cientista, médico e formador
de investigadores para lidar com
problemas que atingem a gente brasileira.

Carlos Chagas, o filho, que nos conduziu pelos caminhos da ciência,
da filosofia e da ética, através de suas aulas, conselhos
e apoio para atividades de divulgação e popularização científicas,
além das muitas “caronas” na volta para casa após o dia-a-dia
da rotina com que nos formamos cientistas no
Instituto de Biofísica que leva seu nome.
O prazer do convívio com este grande mestre só
não suplanta o privilégio de termos podido estar e aprender com ele.

Maria P. Deane, a cientista brilhante, a mulher de fibra,
ousada na vida e na ciência,
a voz dos pesquisadores em tantas lutas,
questionadora de paradigmas,
e sobretudo a grande mestra na experimentação animal,
que nos ensinou a ter um profundo respeito pelos animais de laboratório.
Sentimos sua ausência.

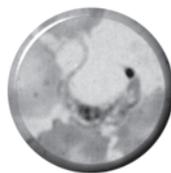
Agradecimentos



Este trabalho foi realizado com o estímulo de muitos colegas, a quem agradecemos. Gostaríamos de apresentar agradecimentos especiais

- aos nossos alunos, que nos vêm desafiando para uma postura mais ativa e criativa no ensino da parasitologia, biologia celular e imunologia, e que testaram, na prática, cada um dos protocolos apresentados neste manual, por vezes assinando a co-autoria de alguns capítulos;
- aos nossos primeiros orientadores, professores Wanderley de Souza, Maria de Nazareth Meirelles e Mécia M. Oliveira, que além de nos apresentarem ao *Trypanosoma cruzi* e aos camundongos infectados, nos brindam com sua amizade firme e constante;
- ao professor José Rodrigues Coura, incansável mestre e batalhador, que está sempre pronto a nos ajudar, seja com aulas, textos, conselhos, sugestões e, sobretudo, pelo empenho para a edição final desta publicação;
- ao professor Zigman Brener, que vem acompanhando e influenciando, continuamente, nosso trabalho desde os tempos de estudantes, até nossa atuação profissional, sempre com sugestões oportunas e com inestimável ajuda cada vez que solicitamos. Não é sem razão que ele vem participando, sistematicamente, das diversas bancas de teses que doutoraram os pesquisadores do nosso departamento;
- aos colegas do Departamento de Ultra-estrutura e Biologia Celular do IOC que nos deram “cobertura logística”, dividindo muitas das atribuições que deixamos acumular por conta do tempo necessário para a conclusão deste trabalho;
- aos nossos colaboradores para a redação dos diferentes capítulos, não só pela qualidade das contribuições, como pela paciência até a publicação final;
- aos nossos filhos Julia, Pedro, Luiza e Bruno, e aos nossos companheiros, Luiz e Alexandre, além da Lúcia, que pacientemente nos aguardaram chegar tarde, dias seguidos, para que concluíssemos o preparo destes originais.

Autores



- Ana Maria Jansen** - Dept^o de Protozoologia, IOC/Fiocruz - jansen@gene.dbbm.fiocruz.br
- Ana Paula S. Pinho** - Dept^o de Protozoologia, IOC/Fiocruz - pinhoap@gene.dbbm.fiocruz.br
- Andrea Henriques Pons** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - andreah@gene.dbbm.fiocruz.br
- Andreia Pereira de Souza** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - souzaap@gene.dbbm.fiocruz.br
- Angela C. V. Junqueira** - Dept^o de Medicina Tropical, IOC/Fiocruz - junqueir@gene.dbbm.fiocruz.br
- Bianca Perdigão Olivieri** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - olivieri@gene.dbbm.fiocruz.br
- Celia V. P. Cardoso** - Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz - cardoso@cecal.fiocruz.br
- Claude Pirmez** - Dept^o de Bioquímica e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - /Fiocruz - pirmez@gene.dbbm.fiocruz.br
- Claudia M. L. M. Coutinho** - Instituto de Ciências Biológicas/UFF - claudia@gene.dbbm.fiocruz.br
- Cristiane V. Lisboa** - Dept^o de Protozoologia, IOC/Fiocruz - gltp@gene.dbbm.fiocruz.br
- David A. Campbell** - School of Medicine/Universidade da Califórnia/LA/EUA - dcp@pop.ucla.edu
- Edmundo Chapadeiro** - Disciplina de Parasitologia/Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
- Elen Mello de Souza** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - elen@gene.dbbm.fiocruz.br
-
- Eliane Lages-Silva** - Disciplina de Parasitologia/Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
- Elisa Cupolillo** - Dept^o de Imunologia, IOC/Fiocruz - ecupoli@ioc.fiocruz.br
- George A. dos Reis** - Lab. de Biologia Imunitária, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ - gdosreis@ibccf.ufrj.br
- Gislaine A. Martins** - Dept^o de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - gmartins@fmrp.usp.br
- Helene Santos Barbosa** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - helene@ioc.fiocruz.br
- Jacenir S. Mallet** - Dept^o de Entomologia, IOC/Fiocruz - jacenir@gene.dbbm.fiocruz.br
- João Santana Silva** - Dept^o de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - jsdsilva@fmrp.usp.br
- José Rodrigues Coura** - Dept^o de Medicina Tropical, IOC/Fiocruz - jcoura@ioc.fiocruz.br
- Julio C. S. Aliberti** - Dept^o de Parasitologia, Microbiologia e Imunologia, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP - jaliberti@atlas.niaid.nih.gov
- Katia S. Calabrese** - Dept^o de Protozoologia, IOC/Fiocruz - calabres@gene.dbbm.fiocruz.br
- Luis Eduardo Ramírez** - Disciplina de Parasitologia/Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro - parasito.fmtm@mednet.com.br
- Marcelo Einicker-Lamas** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - einicker@ibccf.biof.ufrj.br
- Marcos Antonio P. Marques** - Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz - marques@cecal.fiocruz.br
- Maria da Glória Boneceni-Almeida** - Dept^o de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, CPHEC/Fiocruz - galmeida@gene.dbbm.fiocruz.br
- Maria de Nazareth Meirelles** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - meirelle@gene.dbbm.fiocruz.br
- Maria Nazaré Soeiro** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - nazare@gene.dbbm.fiocruz.br
- Maria Teresa Rivera** - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - jean.vanderpas@skynet.be

Mecia M. Oliveira - Lab. de Biomembranas, Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho/UFRJ - mecia@chagas.biofis.ufrj.br
Mirian C. Pereira - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - mirian@gene.dbbm.fiocruz.br
Octavio Fernandes - Dept^o de Medicina Tropical, IOC/Fiocruz - octaviof@gene.dbbm.fiocruz.br
Paulo Renato Antas - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - pzuquim@gene.dbbm.fiocruz.br
Pedro H. Cabello - Dept^o de Genética, IOC/Fiocruz - cabello@gene.dbbm.fiocruz.br
Regina Helena Mangia - Dept^o de Medicina Tropical, IOC/Fiocruz
Renato Marchewsky - Lab. de Neurovirulência, Biomanguinhos/Fiocruz
Ricardo de Mattos Santa-Rita - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - santarit@gene.dbbm.fiocruz.br
Sebastião Enes R. Couto - Centro de Criação de Animais de Laboratório/Fiocruz - scouto@cecal.fiocruz.br
Silvana Marques Araújo - Dept^o Análises Clínicas/Universidade Estadual de Maringá - marqueslima@wnet.com.br
Solange Lisboa de Castro - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - solange@ioc.fiocruz.br
Sonia G. Andrade - Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz/Fiocruz - sgandrade@cpggm.fiocruz.br
Suzana Corte-Real Faria - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - scrf@ioc.fiocruz.br
Sylvio Celso G. Costa - Dept^o de Protozoologia, IOC/Fiocruz - sycosta@gene.dbbm.fiocruz.br
Tania C. Araújo-Jorge - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - taniaaj@ioc.fiocruz.br
Tania Zaverucha do Vale - Dept^o de Protozoologia, IOC/Fiocruz - taniazo@gene.dbbm.fiocruz.br
Valdo D. Silva - Disciplina de Fisiologia/Faculdade de Medicina do Triângulo Mineiro
Vinicius Cotta-de-Almeida - Dept^o de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC/Fiocruz - vinicius@gene.dbbm.fiocruz.br
Wilson Savino - Dept^o de Imunologia, IOC/Fiocruz - savino@gene.dbbm.fiocruz.br



Sumário

Apresentação	13	
Parte I – Conceitos atuais em doença de Chagas humana e experimental		
1. Desafios da pesquisa científica após 90 anos da descoberta da doença de Chagas		
1.1 Questões da doença humana para trabalho em modelos animais <i>Tania C. Araújo-Jorge & Solange L. de Castro</i>	17	
1.2 A doença de Chagas humana e seus modelos de estudo <i>José Rodrigues Coura</i>	19	
2. Vetores da doença de Chagas e sua relação com o hospedeiro vertebrado e o parasita <i>Jacenir R. dos Santos Mallet</i>		25
3. A ecologia e a complexidade dos ciclos de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i> na natureza <i>Ana Maria Jansen, Cristiane V. Lisboa, Ana Paula S. Pinho, Renato Sergio Marchewsky,</i> <i>Regina H. R. Mangia, Elisa Cúpolillo & Octavio Fernandes</i>		33
4. Resposta do hospedeiro à infecção		
4.1 Respostas imune inata, inflamatória e de fase aguda na doença de Chagas <i>Tania C. Araújo-Jorge</i>	39	
4.2 A resposta imune celular na infecção experimental por <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>George A. Dos Reis</i>	48	
4.3 A resposta imune humoral e as funções do linfócitos B na infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Maria Teresa Rivera</i>	51	
4.4 Participação de citocinas no determinismo de resistência ou susceptibilidade à infecção experimental por <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Gislaine A. Martins, Julio C. S. Aliberti & João S. Silva</i>	55	
4.5 O timo como órgão-alvo na infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Vinicius Cotta-de-Almeida & Wilson Savino</i>	60	
4.6 Imunomodulação da resposta T-dependente na doença de Chagas experimental <i>Sylvio Celso G. da Costa, Katia S. Calabrese & Tania Zaverucha do Vale</i>	65	
5. Hormônios na doença de Chagas		
5.1 Sistema adrenérgico <i>Mecia M. Oliveira</i>	87	
5.2 Hormônios sexuais <i>Solange L. de Castro & Elen Mello de Souza</i>	90	
5.3 Prolactina <i>Maria Teresa Rivera</i>	93	
6. Relação materno-fetal na infecção chagásica experimental <i>Maria Teresa Rivera & Silvana Marques de Araújo</i>		103
7. Quimioterapia experimental <i>Solange L. de Castro, Ricardo de Mattos Santa-Rita & Marcelo Einicker-Lamas</i>		111
Parte II – Protocolos e métodos de trabalho em doença de Chagas experimental		
8. Normas de segurança para o trabalho com <i>Trypanosoma cruzi</i> <i>Tania C. Araújo-Jorge & Claude Pirmez</i>		125

9. Modelos animais para o estudo <i>in vivo</i> da doença de Chagas	
9.1 Camundongo	
<i>Tania C. Araújo-Jorge</i>	134
9.2 Rato	
<i>Luis Eduardo Ramírez, Valdo D. Silva, Eliane Lages-Silva & Edmundo Chapadeiro</i>	140
9.3 <i>Calomys callosus</i>	
<i>Sonia G. Andrade</i>	143
9.4 Hamster	
<i>Luis Eduardo Ramírez, Eliane Lages-Silva & Edmundo Chapadeiro</i>	145
9.5 Coelho	
<i>Luis Eduardo Ramírez, Eliane Lages-Silva & Edmundo Chapadeiro</i>	149
9.6 Cão	
<i>Sonia G. Andrade</i>	157
9.7 Macaco	
<i>Maria da Glória Boneceni-Almeida</i>	160
10. Planejamento de experimentos e escolha dos modelos: hospedeiro e parasita	
10.1 Critério de escolha para o modelo de hospedeiro animal e da cepa do parasita	
<i>Solange L. de Castro & Tania C. Araújo-Jorge</i>	175
10.2 <i>Trypanosoma cruzi</i> : cepas de eleição	
<i>Octavio Fernandes & David A. Campbell</i>	178
10.3 Planejamento de um experimento com infecção <i>in vivo</i> pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	
<i>Tania C. Araújo-Jorge</i>	182
10.4 Manutenção e obtenção dos diferentes estágios evolutivos em laboratório	
<i>Helene Santos Barbosa</i>	184
11. Cuidados especiais com animais no biotério de experimentação	
<i>Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera, Celia V. P. Cardoso & Sebastião E. R. Couto</i>	197
12. Controle da qualidade dos animais antes da infecção experimental	
<i>Celia V. P. Cardoso, Marcos Antonio P. Marques, Tania C. Araújo-Jorge, Solange L. de Castro & Maria Teresa Rivera</i>	203
13. Sangria de animais e preparo de inóculos para infecção experimental	
<i>Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera, Solange L. de Castro & Marcos Antonio P. Marques</i>	215
14. Avaliação de parâmetros parasitológicos e de mortalidade	
<i>Solange L. de Castro, Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera & Angela C. V. Junqueira</i>	219
15. Quantificação de marcadores humorais de inflamação, de resposta imune e de lesão tissular nos animais infectados	
<i>Tania C. Araújo-Jorge, Paulo R. Z. Antas & Solange Lisboa de Castro</i>	237
16. Preparo de células para avaliação de parâmetros inflamatórios e imunológicos	
<i>Tania C. Araújo-Jorge, Vinicius Cotta-de-Almeida, Bianca P. Olivieri & Andrea Henriques-Pons</i>	251
17. Coleta e processamento de órgãos e tecidos para avaliação da infecção	
<i>Andréa Pereira de Souza, Suzana Côrte-Real Faria, Claudia M. L. M. Coutinho, Maria Nazaré C. Soeiro & Claude Pirmez</i>	265
18. Obtenção de células de camundongo para estudos <i>in vitro</i> em cultivo primário	
18.1 Interação do <i>Trypanosoma cruzi</i> com as células hospedeiras: estudos <i>in vitro</i>	
<i>Maria de Nazareth L. Meirelles & Tania C. Araújo-Jorge</i>	289
18.2 Protocolos de cultura primária	
<i>Helene S. Barbosa, Mirian C. S. Pereira & Maria de Nazareth S. L. Meirelles</i>	297
19. Sistematização e análise de resultados: confecção de planilhas, tabelas, gráficos e análises estatísticas	
<i>Solange L. de Castro, Tania C. Araújo-Jorge & Pedro H. Cabello</i>	315
20. Anexos	331



Apresentação

A doença de Chagas não é apenas uma das maiores endemias da América Latina. É a doença que marcou, profundamente, a história da “Escola de Mangueiras”, como era conhecido o Instituto Oswaldo Cruz (IOC) no início do século. Marcou, pelo orgulho do IOC em ter sediado o trabalho científico e intelectual de Carlos Chagas, caso único na história da medicina em que o mesmo cientista descreve uma doença até então desconhecida, identifica seu agente etiológico e seu mecanismo de transmissão. Esse grande cientista não só atraiu outros colegas como também formou novos pesquisadores, compondo uma equipe atuante nos mais diversos campos como patologia, diagnóstico e terapia. Marcou, também, pela forte influência que exerceu na condução das pesquisas no IOC ao longo deste século prestes a terminar. Desde a clássica tese de doutorado de Emmanuel Dias, aluno de Carlos Chagas, o Instituto conta, às centenas, as teses que têm sido orientadas por seus pesquisadores nas temáticas básicas e clínicas da doença de Chagas, sobre os mais variados aspectos do comportamento biológico do seu causador, o *Trypanosoma cruzi*, em humanos e em diferentes modelos animais, ou nos triatomíneos, seus vetores naturais.

Desde sua descoberta, em 1909, por Carlos Chagas, a doença de Chagas tem sido estudada ininterruptamente no Instituto e em um número crescente de instituições brasileiras, latino-americanas e de outros países. Tem sido ensinada em cursos de graduação (medicina, farmácia, enfermagem, biomedicina etc.), em diversas disciplinas (doenças infecciosas, patologia, cardiologia, gastroenterologia, epidemiologia etc.). Em cursos de pós-graduação, a doença de Chagas aparece em disciplinas semelhantes, em níveis mais aprofundados. Porém, onde mais se aprende e se atualiza sobre esta doença é nas reuniões anuais sobre pesquisa básica e sobre pesquisa aplicada em doença de Chagas e leishmaniose, as já famosas reuniões de Caxambu e de Uberaba, respectivamente. Nelas se forjou uma comunidade científica integrada, nacional e internacionalmente, que contribuiu para um forte impacto da participação brasileira no cenário da ciência mundial, especialmente em parasitologia. Nessas e em outras reuniões promovidas por sociedades científicas como as de medicina tropical, epidemiologia, parasitologia, protozoologia, imunologia, entre outras, têm se formado gerações de pesquisadores brasileiros ativos na investigação sobre doença de Chagas no Brasil.

Em 1999, após noventa anos da descoberta da doença, temos a grata satisfação de observar que este manual, editado para suprir uma lacuna na área de experimentação animal em doença de Chagas, foi em grande parte escrito por profissionais e alunos tanto do IOC como de outras unidades da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz), como o Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz e o Centro de Criação de Animais de Laboratório. Das 49 pessoas envolvidas na redação deste manual, 38 são da Fiocruz, uma demonstração de que a instituição ingressará no próximo milênio com um trabalho cada vez mais integrado entre suas diversas equipes de pesquisa e produção.

Quando organizamos a disciplina *Doença de Chagas Experimental*, verificamos que não conhecíamos nenhuma disciplina acadêmica, em qualquer curso de graduação ou pós-graduação no Brasil, que focalizasse especificamente essa temática. O desafio de orientar estudantes de mestrado e doutorado em trabalhos de pesquisa sobre modelos animais da doença de Chagas, e articulá-los com aspectos da doença humana, nos levou a tentar sistematizar, em uma disciplina, o ensino dos aspectos básicos da doença e dos procedimentos para o trabalho com animais. O curso, essencialmente prático, se propunha a apresentar um experimento completo para estudo de um determinado aspecto do desenvolvimento da infecção experimental em camundongos. Na primeira versão, em 1994, para cinco alunos, reunimos uma bibliografia geral, com capítulos de livros e revisões em

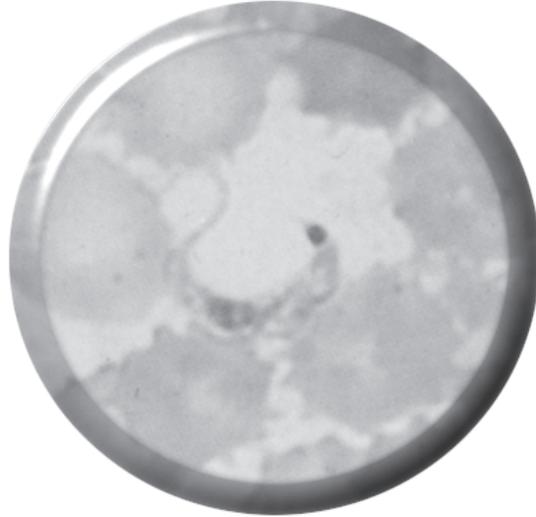
periódicos, que nos serviram para introduzir, conceitualmente, os problemas e preparamos as primeiras apostilas de protocolos de trabalho experimental. Na segunda versão da disciplina, para vinte alunos, em 1996, o CNPq financiou a vinda da Prof. Maria Teresa Rivera para um período de quarenta dias no Brasil. Introduzimos, então, além das atividades práticas, uma série de conferências de pesquisadores do IOC e de outros centros. Essas aulas teóricas sobre diversos aspectos da doença de Chagas tiveram um grande sucesso, levando a dois desdobramentos. O primeiro foi a organização deste livro, que sistematiza e consolida as contribuições dos pesquisadores que participaram e prontamente redigiram os capítulos que o compõem. A eles nossos profundos agradecimentos. O segundo desdobramento foi a extensão da disciplina para uma outra: *Atualização em Doença de Chagas*. Atualmente ambas são oferecidas a cada dois anos na pós-graduação do IOC, com ampla participação de pesquisadores do Instituto e de convidados.

É com orgulho, e com muito prazer, que apresentamos à comunidade este livro, inspirado no pioneiro, editado em 1983 por Carlos Morel no seu curso *Genes and Antigens of Parasites*, que tem servido como livro base de procedimentos em bioquímica e imunologia de tripanosomatídeos para muitas gerações de novos cientistas. Assim como os cursos, o livro compõe-se de duas partes, uma com conceitos teóricos atuais sobre a doença e a resposta do hospedeiro à infecção, e outra que sistematiza procedimentos práticos para abordagens parasitológicas e imunopatológicas da doença de Chagas em modelos animais. É claro que a atual multidisciplinaridade indispensável à ciência moderna nos impede de fazer uma publicação completa e nos remete a outros manuais de protocolos práticos, seja em bioquímica, em imunologia ou em biologia celular. Da mesma forma, referimos um conjunto de publicações recentes que podem complementar os aspectos introduzidos nos capítulos teóricos deste manual. Na falta de um manual prático atual de parasitologia experimental, esperamos que essa publicação possa ser útil. Pretendemos que o livro contribua também para o engajamento futuro de outros colegas na redação de aspectos teóricos e práticos da experimentação animal que certamente ainda precisam ser desenvolvidos e, por isso, permanecem como lacunas nesta edição. Esperamos que a versão em CD-ROM, que se seguirá a este manual, garanta agilidade e a possibilidade de atualização de arquivos a todos os que se interessarem por esse trabalho, agora e no futuro. A escolha da língua portuguesa foi definida pelo público que pretendemos atingir: estudantes brasileiros e latino-americanos, que formarão a nova geração de cientistas com que o Brasil contará no início do próximo século e milênio, e que ainda encontrarão cinco a seis milhões de indivíduos chagásicos sob o risco de morte por cardiopatia a desafiar nossa capacidade de explicação para o fato de que alguns desenvolvem a doença enquanto outros equilibram muito bem seu convívio na relação parasita-hospedeiro. Todas as contribuições de leitores na avaliação deste livro, seja em sua utilidade como guia prático ou em seus aspectos teórico-conceituais, serão muito bem-vindas e agradecidas.

Rio de Janeiro, agosto de 1999

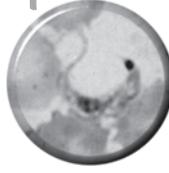
Tania C. de Araújo-Jorge & Solange Lisboa de Castro

Parte 1



Conceitos Atuais em Doença de Chagas
Humana e Experimental

Capítulo 1



Desafios da pesquisa científica após 90 anos da descoberta da doença de Chagas

1.1

Questões da Doença Humana para Trabalho em Modelos Animais

Tania C. Araújo-Jorge & Solange L. de Castro

Quando Dr. Carlos Chagas viu pela primeira vez, sob as lentes de seu microscópio, o protozoário flagelado que denominou *Schizotrypanum cruzi*, em homenagem a seu mestre e amigo Oswaldo Cruz, começou a estudar a biologia desse interessante microorganismo e seu comportamento em animais experimentais. Este fato, único na medicina, da mesma pessoa descobrir e descrever o quadro clínico de uma nova doença, com um novo agente etiológico, o ciclo de vida desse agente, seus vetores e reservatórios, foi explicado mais tarde pelo próprio Chagas (Chagas 1922): "...quando no sangue periférico de uma criança febril, observamos o flagelado patogênico, de sua biologia já possuíamos noção completa, adquirida em demorados estudos anteriores", usando sobretudo animais inoculados experimentalmente com a urina de triatomíneos ou com o sangue de macacos infectados.

Desde essa época, cientistas em todo o mundo tentam desvendar questões obscuras dessa relação parasita-hospedeiro para as quais hoje, após noventa anos da descoberta da doença, não se tem resposta. Como o *Trypanosoma cruzi* entra em tantos tipos celulares diferentes? Como pelo menos parte da população de parasitas que infecta um indivíduo escapa da potente resposta imune e mantém uma carga parasitária latente e em equilíbrio com seu hospedeiro por todo o longo período em que permanece assintomático? Os próprios pacientes e seus parentes também formulam claramente questões ainda não esclarecidas como: "doutor, por que meu irmão, que sempre viveu nas mesmas condições que eu, tem o coração bom e o meu está assim tão doente?" ou "doutor, não tem um remédio que possa matar o bicho que está causando esse inchaço na minha barriga?" ou ainda "doutor, por que esse remédio que o senhor me deu está me fazendo tão mal?".

Com o sucesso da iniciativa das Organizações Mundial e Pan-americana da Saúde no programa de erradicação da transmissão vetorial, e com a melhoria nas técnicas de diagnóstico e da qualidade do sangue visando a interrupção da transmissão transfusional ou através de transplante de órgãos, o problema de novos casos de doença de Chagas na América Latina poderá estar resolvido na primeira década do novo século se as medidas que têm sido

eficientes para o controle da infestação de casas por *Triatoma infestans* forem igualmente eficazes para diferentes vetores como *Rhodnius prolixus* e outras espécies. O Uruguai já teve êxito na interrupção da transmissão vetorial e há previsão de certificação da interrupção da transmissão no Brasil e no Chile para 2001 (WHO, 1999). Com isso, o foco dos estudos deve, necessariamente, ser direcionado mais para os pacientes chagásicos e para as lesões que evoluem durante as fases indeterminada e crônica da infecção. Acreditamos que, nesse campo, permanecem como desafios o encontro de respostas definitivas a questões como:

- qual a fisiopatologia da miocardite chagásica, dos “megas”, e das lesões neurológicas?
- que fatores determinam a patogênese em órgãos específicos?
- quais os mecanismos decisivos para a cronificação da infecção: mecanismos de imunossupressão ou de imunopatogênese? Ou ambos?
- o que protege da doença os indivíduos infectados em fase indeterminada?
- que fatores concorrem para a evolução de pacientes da fase indeterminada para a crônica, disparando o surgimento de lesões com diferentes aspectos anátomo-clínicos?
- qual a influência da infecção materna na transmissão congênita e no desenvolvimento de doença em seus descendentes?
- existem, ou não, populações de parasitas com tropismo por certos órgãos?
- há possibilidades reais de imunoproteção e perspectivas concretas para o desenvolvimento de vacinas? Quais as estratégias mais promissoras de imunoproteção?
- a eficácia de quimioterápicos tripanocidas está associada a diferentes populações parasitárias?
- como aprimorar o tratamento etiológico de indivíduos infectados? Como intervir, terapeuticamente, na fase indeterminada da infecção?
- como melhorar o tratamento sintomático de pacientes crônicos?
- como melhorar a qualidade de vida dos seis milhões de pacientes ainda infectados?
- como proceder à profilaxia e ao tratamento de infecções por *T. cruzi* reativadas por imunossupressão, e quais as conseqüências do não-tratamento?

Uma pesquisa sobre a produção científica recente em doença de Chagas, na base de dados bibliográficos *MedLine*, feita em julho de 1999, identificou o seguinte quantitativo:

Palavra-chave	1964-1999	1995-1999	1990-1999
<i>Chagas disease</i>	5.240	1.098	2.155
<i>Chagas disease & review</i>	415	129	250
<i>Chagas disease & chemotherapy</i>	523	128	224
<i>Chagas disease & pathology</i>	816	172	355
<i>T. cruzi</i>	5.206	1.279	2.487
<i>T. cruzi & review</i>	234	69	155
<i>T. cruzi & animal models</i>	222	92	157
<i>T. cruzi & experimental infection</i>	324	99	186

Mais de 90% das referências correspondem a trabalhos originais e apenas 6% dos trabalhos estão associados a estudos com infecção experimental. Até estudos de quimioterapia, reconhecidamente pouco numerosos frente à necessidade de novas drogas clínicas e profiláticas, atingem cerca de 10% da produção científica em doença de Chagas, um percentual maior que o de estudos com infecção experimental. Talvez a heterogeneidade de resultados obtidos em diferentes modelos e a complexidade do trabalho com experimentação animal estejam na origem dessa carência de estudos, bem como na ausência de consenso quanto aos modelos mais adequados para cada aspecto da doença a ser estudado.

Como parte das comemorações dos noventa anos da descoberta da doença de Chagas, muitas revisões e livros vêm sendo lançados sobre o assunto e fica patente a necessidade de um uso mais objetivo dessa ferramenta já usada por Carlos Chagas: o estudo do curso da infecção por *T. cruzi* em modelos experimentais. A presente publicação se insere nesse contexto comemorativo e aponta a aplicabilidade dos modelos experimentais para a busca de respostas a questões como as levantadas acima.

Finalmente, uma vez que a detecção das fases indeterminada e crônica típicas da doença de Chagas em animais domésticos naturalmente infectados nas áreas endêmicas (como, por exemplo, o cão) ainda não tem base bibliográfica segura, apesar de não poder ser descartada, ressaltamos que este manual tratará da experimentação animal sobre a doença de Chagas, no sentido de reproduzir o mais fielmente possível, aspectos da doença humana. Dos diferentes modelos revisados (ver Capítulo 9), há nítida predominância de dados obtidos em camundongos, um reflexo da produção global da pesquisa básica em doença de Chagas. Talvez a sistematização de protocolos para estudos em murinos, apresentada nos capítulos finais deste manual, incentive a produção de um conjunto de protocolos para estudo em humanos, de modo a acelerar o encontro de respostas às questões acima.



1.2

A Doença de Chagas Humana e seus Modelos de Estudo

José Rodrigues Coura

Nenhum dos modelos experimentais da infecção chagásica utilizados, até o presente, reproduz rigorosamente a infecção e a doença humana como ela ocorre na natureza, nem mesmo quando se utilizam primatas filogeneticamente mais próximos do homem. Este fato se deve a diferenças espécie-específicas e intra-específicas, relacionadas, de um lado aos mecanismos de defesa de cada espécie de hospedeiro, particularmente ao seu sistema imune, e de outro às características das diversas cepas e clones do *Trypanosoma cruzi*, de seus determinantes antigênicos, receptores e mecanismos de escape, os quais denominamos de “complexo cruzi” em trabalhos anteriores (Coura et al., 1966, 1990). Por outro lado, os mecanismos de seleção clonal por passagens sucessivas de cepas do *T. cruzi* em diferentes vetores e reservatórios, inclusive no próprio homem, e as transformações por elas sofridas ao longo do tempo, quando mantidas em meios artificiais de cultura, transformam-nas em verdadeiras “cepas de laboratório”, com perda total ou parcial de suas características originais.

Dois outros aspectos extremamente importantes, no que se refere às diferenças entre os estudos experimentais e a infecção natural do homem pelo *T. cruzi*, são a quantidade de parasitas inoculados nos estudos experimentais (inóculo), em contraste com o número de parasitas que penetram no homem em uma primo-infecção natural ou em reinfecções, e o tipo de parasito (epi ou tripomastigota) utilizado, o que em última análise depende, na infecção experimental, da decisão do pesquisador e, na natural, da qualidade do vetor e das chances de penetração do *T. cruzi* na ocasião de sua deposição na pele ou mucosa do homem. Geralmente os inóculos experimentais são enormes em relação às infecções naturais do homem. Por exemplo, um inóculo considerado pequeno na maioria dos estudos é de 10^3 (1.000 parasitas) para um camundongo jovem de 8 a 10 g, enquanto uma dejeção de triatomíneo infectado contém em média 140 parasitas (Pereira et al., 1988), dependendo naturalmente da espécie vetora, do sexo, do tempo de infecção e evacuação, e do estágio do parasita (Wood, 1951; Dias, 1956; Zeledon et al., 1977; Perlowagora-Szumlewicz & Müller, 1979). Quantos desses parasitos depositados na pele ou na mucosa de uma criança ou adulto teriam a chance de penetrar? Dez, vinte, quarenta? Por outro lado os inóculos experimentais são total, ou predominantemente, com formas infectantes (tripomastigotas), enquanto a metaciclo-gênese do *T. cruzi*

para formas infectantes, na infecção natural, varia muito de acordo com o vetor (Perlowagora-Szulewicz & Moreira, 1994).

Em revisão sobre os determinantes epidemiológicos da doença de Chagas humana – a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade –, apresentamos em detalhe (Coura, 1988) as diversas variáveis condicionantes daqueles determinantes. Por outro lado, Andrade (1990), analisando a influência de diversas cepas de *T. cruzi*, na patogênese da miocardiopatia crônica em camundongos *inbred* e *outbred*, conclui que:

embora não descartando a influência da cepa do hospedeiro, a análise estatística dos nossos resultados indicou a cepa do parasita como o fator mais importante na determinação da lesão cardíaca no camundongo, especialmente quando as cepas do tipo III são consideradas.

Em síntese, a interação parasita-hospedeiro é de fundamental importância na modulação da infecção, da doença e de sua morbi-mortalidade, tanto na infecção natural humana como na infecção experimental (Postan et al., 1987). Por infecção entende-se a penetração, multiplicação e desenvolvimento do parasita no hospedeiro, enquanto doença são os danos causados no organismo pelo parasita e seus produtos ou pela própria resposta do hospedeiro. O equilíbrio ou desequilíbrio entre o parasita e o hospedeiro definem a infecção, a doença e a sua morbi-mortalidade. Definitivamente não há uma correlação entre a virulência e a patogenicidade de uma cepa de *T. cruzi* do homem, principalmente na fase crônica da infecção ou da doença, em relação à infecção experimental com a mesma cepa (Schlemper Jr., 1982).

Embora o homem seja o modelo ideal para estudos experimentais sobre a infecção e a doença de Chagas, por motivos éticos apenas os estudos observacionais podem ser realizados no homem, ou seja, observações retrospectivas ou prospectivas sobre a prevalência, a incidência, a morbidade, a mortalidade e a letalidade decorrentes da infecção e da doença. Diversos tipos de estudos clínicos e epidemiológicos descritivos e analíticos podem ser realizados para definir a história natural da doença de Chagas.

1.2.1 Estudos Descritivos

Os estudos descritivos são os mais freqüentemente utilizados para avaliação da infecção e da doença de Chagas e analisam a forma e a distribuição da doença, enquanto os estudos analíticos avaliam os seus determinantes. Para descrever a ocorrência da doença, algumas questões amplas têm que ser respondidas: quem está afetado? onde e quando os casos ocorrem?, ou seja, é necessário especificar *pessoa, lugar e tempo*, de acordo com a epidemiologia clássica.

Embora exista um número infinitamente grande de variáveis relacionadas com a pessoa, as seguintes são

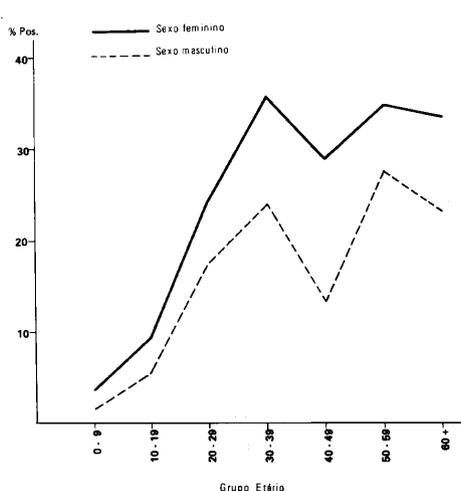


Figura 1 – Prevalência sorológica da infecção chagásica por idade e sexo. Virgem da Lapa, Minas Gerais, 1976

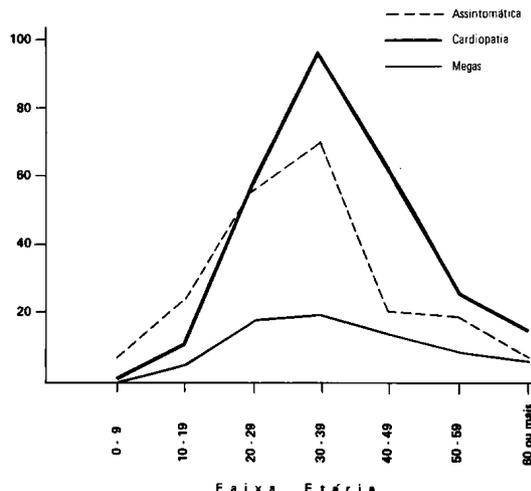


Figura 2 – Distribuição das formas clínicas de portadores de doença de Chagas de acordo com a faixa etária. Rio de Janeiro, 1960-1983

fundamentais na investigação sobre a doença de Chagas: idade, sexo, grupo étnico ou raça, ocupação, classe social e exposição à infecção.

A infecção chagásica é cumulativa e proporcional ao tempo e intensidade da exposição; portanto é lógico que a prevalência da infecção aumente com a idade, como pode ser observado na Figura 1. Da mesma forma a doença de Chagas, sendo uma doença evolutiva, tende a aumentar com a idade até a quarta/quinta década da vida (Figura 2), quando se estabiliza ou decresce devido à mortalidade (Coura et al., 1983).

Quanto ao sexo, por fatores ainda desconhecidos, a prevalência da infecção chagásica, na maioria dos estudos, tem se mostrado maior no sexo feminino, enquanto a doença incide mais no masculino. Admite-se que a mulher, por permanecer mais tempo em casa, esteja mais exposta à infecção, enquanto no homem, embora menos exposto, a infecção evolui mais freqüentemente para a doença devido ao maior esforço físico que desenvolve em suas atividades. Por outro lado, o negro, possivelmente por fatores coadjuvantes como a hipertensão arterial, tem tendência ao agravamento mais freqüente e precoce da doença de Chagas.

A ocupação, a classe social e a exposição à infecção estão intimamente relacionadas. A infecção e a doença de Chagas são mais freqüentes em pessoas procedentes de áreas rurais, de baixa condição social, que habitam ou habitaram cafuas, geralmente infestadas por triatomíneos, portanto, com maior chance de exposição de seus habitantes à infecção.

Outros fatores pessoais como estado civil, variáveis familiares como tamanho da família, ordem de nascimento, idade materna ao nascer, parecem de pouca importância na prevalência da infecção e da doença. Entretanto, a mortalidade precoce dos pais e irmãos é um dos indicadores importantes da doença de Chagas. Os estudos sobre fatores genéticos como os sistemas ABO e HLA são ainda controversos e necessitam ser ampliados para melhores conclusões.

As variáveis lugar e tempo (onde e quando) são muito importantes na investigação epidemiológica da doença de Chagas. O lugar está intimamente relacionado à distribuição e adaptação de triatomíneos ao domicílio e o tempo está diretamente relacionado à freqüência e intensidade da exposição. É indispensável em uma investigação epidemiológica sobre a infecção chagásica que se mostre ao paciente uma coleção de triatomíneos, adultos e ninfas, dos três gêneros (*Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma*) e que a ele se pergunte: conhece? de onde? existe ou existia em sua residência? já foi picado por esse inseto? quando e onde? qual a freqüência? Deve-se indagar ainda sobre o tipo de residência, viagens e migrações e sobre a existência de casos idênticos na família.

De grande importância é a história de cirurgias, partos, transfusão de sangue, manipulação de animais e de materiais potencialmente contaminados, principalmente em laboratórios.

1.2.2 Estudos Analíticos

Os estudos analíticos avaliam os determinantes ou as razões da maior ou menor freqüência de um certo evento. Em síntese, eles estudam o “porquê”, através de formulação de hipóteses. Para testar uma hipótese sobre a causa de um evento, de uma doença ou de sua evolução, há duas possibilidades: observação ou experimentação. No caso da doença de Chagas, por motivos éticos, como já foi referido, os estudos devem ser observacionais. Excepcionalmente podem-se fazer “experimentos naturais”, ou seja, observar um fenômeno que ocorre naturalmente, sem interrompê-lo; por exemplo, verificar a incidência da doença de Chagas, em uma área com transmissão ativa, desde que a responsabilidade do controle não seja nossa. De qualquer forma esse tipo de estudo é criticável do ponto de vista ético.

Os estudos analíticos podem ser retrospectivos, prospectivos, seccionais, longitudinais e históricos prospectivos.

1.2.2.1 Estudos retrospectivos

Os estudos retrospectivos necessariamente são compostos de *casos* e *controles*. No caso da infecção chagásica, *casos* são indivíduos com sorologia, xenodiagnóstico, hemocultura e/ou PCR positivo para infecção chagásica, enquanto *controles* são indivíduos do mesmo grupo social, idade e sexo, porém com exames negativos para infecção chagásica.

Vantagens dos estudos retrospectivos: são relativamente baratos, necessitam de um menor número de participantes, apresentam resultados relativamente rápidos e são mais adequados para doenças raras ou pouco frequentes. Desvantagens: informações incompletas, possibilidade de variáveis confusionais e de medir apenas o risco relativo.

Para avaliação da doença de Chagas pareamos indivíduos da mesma área, idade e sexo, com sorologia positiva, com outros com as mesmas características e com sorologia negativa, os quais submetemos rotineiramente à anamnese e a exames clínico, eletrocardiográfico e radiológico do coração e do esôfago e ocasionalmente do cólon. Exames mais sofisticados como ecocardiografia, eletrocardiografia dinâmica (*holter*), ultrassonografia, eletrofisiologia cardíaca e digestiva com estimulação e até biópsias cardíaca e do aparelho digestivo orientadas, podem ser feitos; os três primeiros não invasivos, sem restrição, e os três últimos com as restrições éticas desses tipos de procedimentos na investigação clínica (Borges-Pereira et al., 1998).

1.2.2.2 Estudos prospectivos

Os estudos prospectivos ou de coortes, embora mais precisos, são pouco ou quase nunca utilizados na infecção chagásica devido a restrições éticas, ao deixarmos deliberadamente um grupo de pessoas expostas à infecção para analisarmos a sua incidência e evolução. Por outro lado, seriam estudos caros, necessitando o acompanhamento de um grande número de indivíduos, por um longo período de tempo e com possibilidade de muitas perdas devido à migração, morte ou abandono do estudo.

1.2.2.3 Estudos seccionais

Este talvez seja o tipo de estudo mais utilizado em trabalhos de campo sobre a doença de Chagas. Nele definimos uma determinada população exposta ao risco da infecção chagásica e verificamos os infectados através da prevalência sorológica e os não infectados, ou sorologicamente negativos, utilizando uma população definida ou uma amostra representativa. Podemos determinar a intensidade da exposição pelo índice de triatomíneos domiciliados e infectados com *T. cruzi*, pelo tempo de exposição da população e pela prevalência sorológica da infecção nos diversos grupos etários.

Podemos ainda determinar a morbidade da doença pareando, por idade e sexo, indivíduos sorologicamente positivos e negativos e procedendo aos diversos tipos de estudos sorológicos, parasitológicos, clínicos, radiológicos, eletrocardiográficos e outros já mencionados para avaliação do risco relativo ou “excesso de risco” dos infectados.

Tomando-se as devidas providências para a interrupção da transmissão, através dos órgãos encarregados do controle da doença de Chagas ou quando possível com recursos próprios, estaremos eticamente autorizados a prosseguir o estudo evolutivo da morbidade, mortalidade e letalidade pela doença. Naturalmente essa população deverá receber a devida assistência enquanto permanecermos na área.

1.2.2.4 Estudos longitudinais

Embora seja um tipo de estudo prospectivo, no caso da doença de Chagas deve-se afastar o risco de “novos casos”, acompanhando *casos* e *controles*, após a sua definição no primeiro estudo seccional. Periodicamente, de forma ideal anualmente, os *casos* e os *controles* devem ser reexaminados com a mesma metodologia ao longo do tempo. Dessa forma podemos acompanhar a morbidade, a mortalidade e a letalidade e estudar, até certo ponto, a história natural da doença.

Dentro dessa linha, os chamados “estudos prospectivos históricos” tendem a combinar as vantagens dos

estudos retrospectivos, através de anotações anteriores, com os estudos prospectivos, como no caso da doença de Chagas, com as limitações já mencionadas para esse tipo de estudo.

Alguns modelos de estudos realizados

O primeiro estudo epidemiológico que realizamos sobre a doença de Chagas foi do tipo descritivo multidisciplinar, visando caracterizar o ciclo ou os ciclos da doença no antigo estado da Guanabara (Coura, 1965), hoje município do Rio de Janeiro, que constou de avaliação sobre reservatórios e triatomíneos silvestres, de estudo sorológico em populações autóctones, de demanda hospitalar e doadores de sangue, da doença em doadores e receptores de sangue e de um estudo descritivo histórico em uma série de migrantes e não migrantes do Rio de Janeiro.

De forma analítica, podemos caracterizar dois tipos de ciclos do “complexo cruzi” (Coura et al., 1966): um silvestre entre animais e triatomíneos, que somente acidentalmente atingia o homem e outro inter-humano, em nível hospitalar, entre doadores e receptores de sangue.

A partir daquele estudo, analisamos prospectivamente uma série histórica, inicialmente de cem pacientes entre 170 estudados (Coura, 1965), acrescidos posteriormente para 260 (Coura, 1976) e depois para 510 (Coura et al., 1983), de vários estados do Brasil, mostrando importantes diferenças regionais da morbidade da doença de acordo com a área de procedência dos pacientes.

Em uma série de trabalhos seccionais e longitudinais, realizados nos estados de Minas Gerais, Paraíba, Piauí e Amazonas (Coura et al., 1984, 1985, 1994a,b, 1995, 1996), confirmamos as variações regionais da doença de Chagas e praticamente definimos a sua história natural, desde a sua origem, como ocorre por exemplo na Amazônia, na forma de *antropozoonose* (infecção de animais que se transmite ao homem), onde triatomíneos silvestres atacam o homem (Coura et al., 1994a), para áreas intermediárias, como as do Nordeste, onde triatomíneos como o *T. brasiliensis* são ubíquos, vivendo e transmitindo a infecção dentro e fora do domicílio, entre animais e o homem, sob a forma de *anfixenose*, até áreas mais antigas, onde o *T. infestans* é, ou foi, totalmente domiciliado e a infecção é praticamente uma *zooantroponose* (zoonose mantida pelo homem).

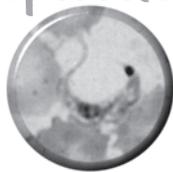
Na nossa experiência, nas áreas primitivas, onde a infecção é predominantemente silvestre, a doença é de baixa morbidade por falta de adaptação do *T. cruzi* ao homem, enquanto nas áreas intermediárias a morbidade da infecção humana é menor que nas áreas de *zooantroponoses* (áreas antigas), onde o *T. cruzi* é muito bem adaptado ao homem e a morbidade da doença de Chagas é alta.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, S. G. Influence of *Trypanosoma cruzi* strain on pathogenesis of chronic myocardiopathy in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:17-27, 1990.
- BORGES-PEREIRA, J.; XAVIER, S. S.; PIRMEZ, C. & COURA, J. R. Chagas disease in Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brazil. IV. Clinical and epidemiological aspects of left ventricular aneurism. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 31:457-463, 1998.
- CHAGAS, C. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanozomíase americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 15:67-76, 1922.
- COURA, J. R. *Contribuição ao estudo da doença de Chagas no Estado da Guanabara*, 1965. Tese, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- COURA, J. R. Evolutive pattern in Chagas' disease and life-span of *Trypanosoma cruzi*. In: American Trypanosomiasis Research Symposium. *PAHO/WHO, Scientific Publication*, 318:378-383, 1976.
- COURA, J. R. Determinantes epidemiológicos da doença de Chagas no Brasil: a infecção, a doença e sua morbi-mortalidade. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83 (Supl.I):192-402, 1988.

- COURA, J. R. Avanços do conhecimento sobre o “complexo cruzi” e a doença de Chagas. *Boletim da Academia Nacional de Medicina*, 151:141-144, 1990.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; DUBOIS, L. E. G.; CORREIA LIMA, F. G.; ARRUDA Jr., E.; WILLCOX, H. P. F.; ANUNZIATO, N. & PETANA, W. Morbidade da doença de Chagas. II. Estudos seccionais em quatro áreas de campo do Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:101-124, 1984.
- COURA, J. R.; ABREU, L. L.; PEREIRA, J. B. & WILLCOX, H. P. F. Morbidade da doença de Chagas. IV. Estudo longitudinal de dez anos em Pains e Iguatama, Minas Gerais, Brasil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 80:73-80, 1985.
- COURA, J. R.; ANUNZIATO, N. & WILLCOX, H. P. F. Morbidade da doença de Chagas. I. Estudo de casos procedentes de vários estados do Brasil, observados no Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 78:363-372, 1983.
- COURA, J. R.; BARRETT, T. V. & ARBOLEDA, M. N. Ataque de populações humanas por triatomíneos silvestres no Amazonas: uma nova forma de transmissão da infecção chagásica? *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27:251-253, 1994a.
- COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J.; ALVES FILHO, F. I.; CASTRO, J. A. F.; CUNHA, R. V.; COSTA, W. & JUNQUEIRA, A. C. V. Morbidade da doença de Chagas em áreas do Sertão da Paraíba e da Caatinga do Piauí. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29:197-205, 1996.
- COURA, J. R.; FERREIRA, L. F.; PEREIRA, N. C. & SILVA, J. R. *Trypanosoma* do “complexo cruzi” em reservatório silvestre no Estado da Guanabara. Estudo de sua patogenicidade. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 8: 125-133, 1966.
- COURA, J. R., JUNQUEIRA, A. C., GIORDANO, C. M. & FUNATSU, R. K. Chagas’ disease in the Brazilian Amazon. I - A short review. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 36:363-368, 1994b.
- COURA, J. R.; WILLCOX, H. P. F.; ARBOLEDA, M. N.; FERNANDES, O. & PAIVA, D. D. Chagas’ disease in the Brazilian Amazon. III. A cross-sectional study. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 37:415-420, 1995.
- DIAS, E. Observações sobre a eliminação de dejeções e tempo de sucção em alguns triatomíneos sulamericanos. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 54: 115-124, 1956.
- PEREIRA, J. B.; PESSOA, I. & COURA, J. R. Observações sobre as dejeções e o número de *T. cruzi* eliminados em diferentes espécies de triatomíneos durante a alimentação. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83 (Supl.):195, 1988.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MOREIRA, C. J. C. *In vivo* differentiation of *Trypanosoma cruzi*. 1. Experimental evidence of the influence of vector species on metacyclogenesis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89:603-618, 1994.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MÜLLER, C. A. Experiments in a search for an insect model for xenodiagnosis of chronic Chagas’ disease. I. The prevalence and intensity of infection of *Trypanosoma cruzi* in nine vector species. *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas, Rio de Janeiro*, 1979, E11-E16.
- POSTAN, M.; BAILEY, J. J.; DVORAK, J. A.; McDANIEL, J. P. & POTALLA, E. W. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. Histopathological and eletrocardiographical response to chronic infection. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 37:541-549, 1987.
- SCHLEMPER Jr. B. R. *Caracterização de cepas do Trypanosoma cruzi isoladas de pacientes com diferentes formas clínicas da doença de Chagas*. 1982. Tese, Rio de Janeiro: Universidade Federal do Rio de Janeiro.
- WHO. Chile and Brazil to be certified free of transmission of Chagas disease. *TDR News* 59:10, 1999.
- WOOD, S. F. Importance of feeding and defecation times of insect vectors in transmission of Chagas’ disease. *Journal of Economic Entomology*, 44:52-54, 1951.
- ZELEDON, R.; ALVARADO, R. & JIRÓN, L. F. Observations on the feeding and defecation patterns of three triatomine species (Hemiptera-Reduviidae). *Acta Tropica*, 34:65-67, 1977.

Capítulo 2



Vetores da Doença de Chagas e sua Relação com o Hospedeiro Vertebrado e o Parasita

Jacenir R. dos Santos-Mallet

Os estudos relativos aos transmissores de doenças são vastos, abordando aspectos diversos da morfologia, fisiologia, controle, resistência ao jejum, ecologia, taxonomia e muitos outros. Ao escrever este capítulo não há pretensão de esgotar o assunto e sim levar ao estudante um resumo que relacione esses aspectos tão diversos.

O “barbeiro”, nome vulgar do vetor de *Trypanosoma cruzi* no Brasil, pertence à Classe Insecta, Filo Arthropoda, que abrange uma grande variedade de espécies de importância médica como, por exemplo, membros da Ordem Diptera: Subordem Braquicera: Família Muscidae (mosca doméstica = *Musca domestica*, promovendo a disseminação de bactérias, bacilos da febre tifóide, cistos de protozoários e até mesmo ovos de helmintos); Família Cuterebridae (mosca do berne = *Dermatobia hominis*); Família Calliphoridae (mosca da bicheira = *Cochiliomyia hominivorax*); Família Sarcophagidae (moscas que produzem miíases) e Família Glossinidae (moscas transmissoras da tripanosomíase africana). Subordem Nematocera: Família Psycodidae (flebotomíneos, transmissores das leishmanioses); Família Simuliidae (barragem, envolvidos na transmissão da oncocercose); Família Ceratopogonidae (maruins, incluindo espécies vetoras de filárias); Família Culicidae abrangendo espécies transmissoras de malária (mosquitos-prego ou pernilongos do gênero *Anopheles*), de dengue, arboviroses, filariose linfática e febre amarela (mosquitos dos gêneros *Culex* e *Aedes*); Ordem Siphonaptera (pulgas, envolvidas na transmissão da peste bubônica e do tifo murino) e da Ordem Anoplura (piolhos, provocam ftíriase e atuam como agente causal do tifo exantemático, febre das trincheiras e febre recorrente na forma epidêmica).

Os insetos de interesse médico são estudados em conjunto com espécimes da Ordem Acari (produzem dermatite, às vezes paralisia motora, transmitindo febre maculosa, febre Q e febre recorrente na forma endêmica), constituindo a disciplina entomologia médica, ministrada nos cursos de parasitologia das cadeiras da área de saúde. Todos estes artrópodos atuam como vetores na transmissão de vírus, bactérias, protozoários e helmintos.

Ressalto aqui a importância dos trabalhos entomológicos dirigidos para o conhecimento da biologia e ecologia dos vetores, pois são indispensáveis para um controle efetivo das grandes endemias através do combate antivetorial. Exemplo disso pode ser constatado ao lembrarmos as palestras do saudoso mestre Dr. Leônidas de Mello Deane*, quando relatava fatos ocorridos ao ser chamado para combater a malária no Nordeste, onde a doença se alastrava independente do combate ao *Anopheles*. Naquela ocasião, o pesquisador observou que nas palmeiras havia uma espécie de planta que armazenava quantidade de água suficiente para formar um criadouro, e subindo até o local constatou a presença de uma outra espécie do mosquito caracterizando-a como mais uma espécie vetora naquela região a qual, por estar fora do alcance do inseticida se alastrava cada vez mais.

* Dr. Leônidas Deane foi pesquisador do Departamento de Entomologia do Instituto Oswaldo Cruz, de 1980 a 1993, que chefiou por muitos anos, tendo sido para todos nós exemplo de dedicação e sabedoria.

2.1. O “Barbeiro” na Escala Zoológica

De todas as classes zoológicas, os insetos são os mais numerosos em espécies e é inegável a sua importância na natureza, como dispersores de sementes, polinizadores, além de sua utilidade para o homem, como é o caso das abelhas e do bicho-da-seda, entre outros. Por outro lado, existem os insetos “nocivos” ao homem, como as pragas que atingem a agricultura, os ectoparasitas hematófagos e os transmissores de doenças.

Os “barbeiros” apresentam a seguinte classificação: Reino: ANIMALIA (METAZOA); Filo: ARTHROPODA; Subfilo: MANDIBULATA; Classe: INSECTA; Subclasse: PTERIGOTA; Ordem: HEMIPTERA; Subordem: GYMNOCERATA; Superfamília: REDUVIOIDEA; Família: REDUVIIDAE; Subfamília: TRIATOMINAE.

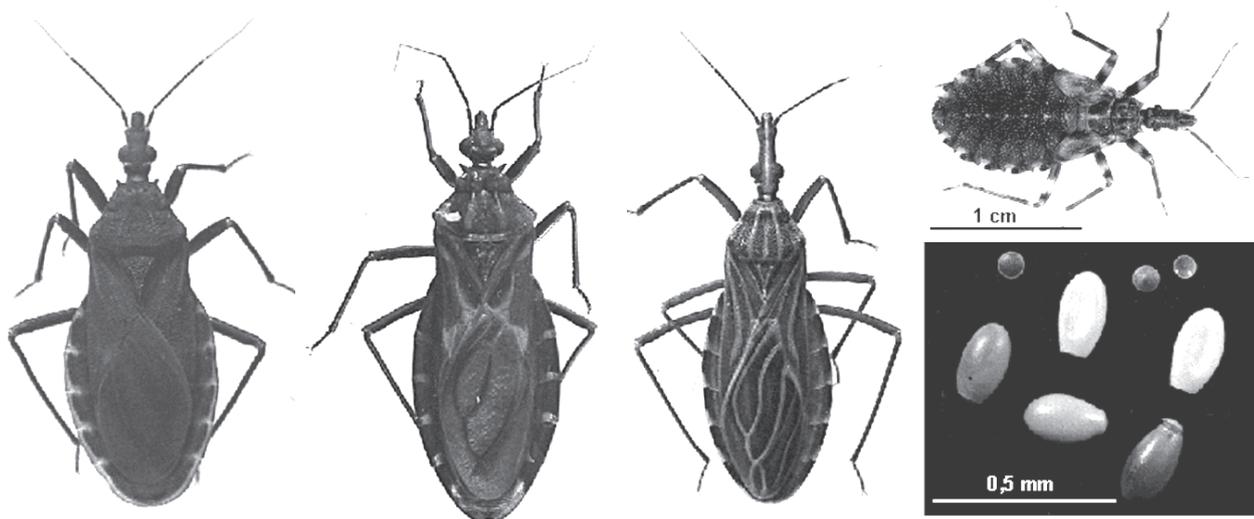
É comum nos referirmos a esses insetos como hemípteros, reduvídeos ou triatomíneos. Com base nesta classificação, conclui-se que o melhor termo, por ser mais específico, seria “triatomíneo”, uma vez que a Ordem Hemiptera abrange uma variedade muito grande de insetos.

Atualmente são conhecidas 123 espécies de triatomíneos, agrupados em cinco tribos e 145 gêneros (Jurberg, 1996). Duas destas tribos, Triatomini e Rhodniini, contêm os gêneros mais importantes, do ponto de vista de transmissão da doença de Chagas: *Triatoma*, com 69 espécies (Figura 1) e *Panstrongylus*, com treze espécies (Figura 2) referentes à primeira tribo, e o gênero *Rhodnius*, com treze espécies (Figura 3), referente à segunda tribo citada. Àqueles que desejarem informações mais detalhadas sobre a sistemática destes insetos, sugerimos consultar Costa Lima (1940) e Lent & Wygodzinsky (1979).

A tabela abaixo lista alguns nomes vulgares pelos quais os triatomíneos são conhecidos em diferentes países.

Nome vulgar	País
BARBEIRO; BICHO DE PAREDE; BICIMO; CHUPÃO; FINCÃO; PROCOTÓ; VUM-VUM	Brasil
BLOOD-SUCKING CONE NOSE; KISSING-BUG	Estados Unidos
CHINCHORRO	Equador
CHINCHA-VOLADORA	México
CHIPO	Colômbia, Venezuela
CHUPÓN	Venezuela
VINCHUCA*	Argentina, Bolívia, Chile, Paraguai, Uruguai

* Este nome é originário do povo inca, significando “o que cai por terra; o que vem de cima”, lembrando que estes insetos são comumente encontrados nos telhados de palha das habitações.



Figuras 1-4 – Triatomíneos adultos, ovos e ninfas. 1. Gênero *Triatoma*: *Triatoma infestans* (Klug, 1834); 2. Gênero *Panstrongylus*: *Panstrongylus megistus* (Burmeister, 1835); 3. Gênero *Rhodnius*: *Rhodnius prolixus* (Stal, 1859); 4. Ovos (a) e ninfas (b)

2.2. Características Gerais dos Triatomíneos

Os “barbeiros”, como todos os insetos, possuem o corpo dividido em três regiões: cabeça, tórax e abdômen. A cabeça, sempre móvel, possui os apêndices sensoriais, que são as antenas, peças bucais e olhos compostos. O tórax, formado pela união do protórax, mesotórax e metatórax, apresenta a inserção dos apêndices locomotores, ou seja, dois pares de asas e três pares de patas (Figura 5). O nome Hemiptera refere-se à morfologia do primeiro par de asas, que apresenta a metade anterior coriácea e a posterior membranosa, denominada hemélitro (hemi = metade; élitro = asa) (Figura 6). O abdômen, geralmente achatado e largo, com as margens laterais expandidas (conexivo), é constituído de onze segmentos. Através do 8º e 9º segmentos (genitália interna) podemos identificar machos e fêmeas (Figura 7).

Os insetos da ordem Hemiptera apresentam morfologia variável, com alguns espécimes bem conhecidos como é o caso da “maria-fedida”, dos percevejos e das baratas d’água. Estes apresentam, geralmente, um cheiro característico em decorrência da presença de glândulas odoríferas situadas na região torácica. Nos “barbeiros”, a responsável pelo odor característico é a glândula de Brindley.

Em relação aos hábitos alimentares, existem formas predadoras (rostro recurvado em forma de gancho, com três segmentos), fitófagas (rostro reto, com quatro segmentos) e hematófagas (rostro reto, com três segmentos, dispostos quase paralelamente à cabeça). Os triatomíneos enquadram-se nesta última categoria, apresentando o seu aparelho bucal do tipo picador-sugador, com as mandíbulas e as primeiras maxilas transformadas em estiletos quitinosos. Na Figura 8, podemos comparar e diferenciar os tipos de aparelho bucal dos hemípteros.

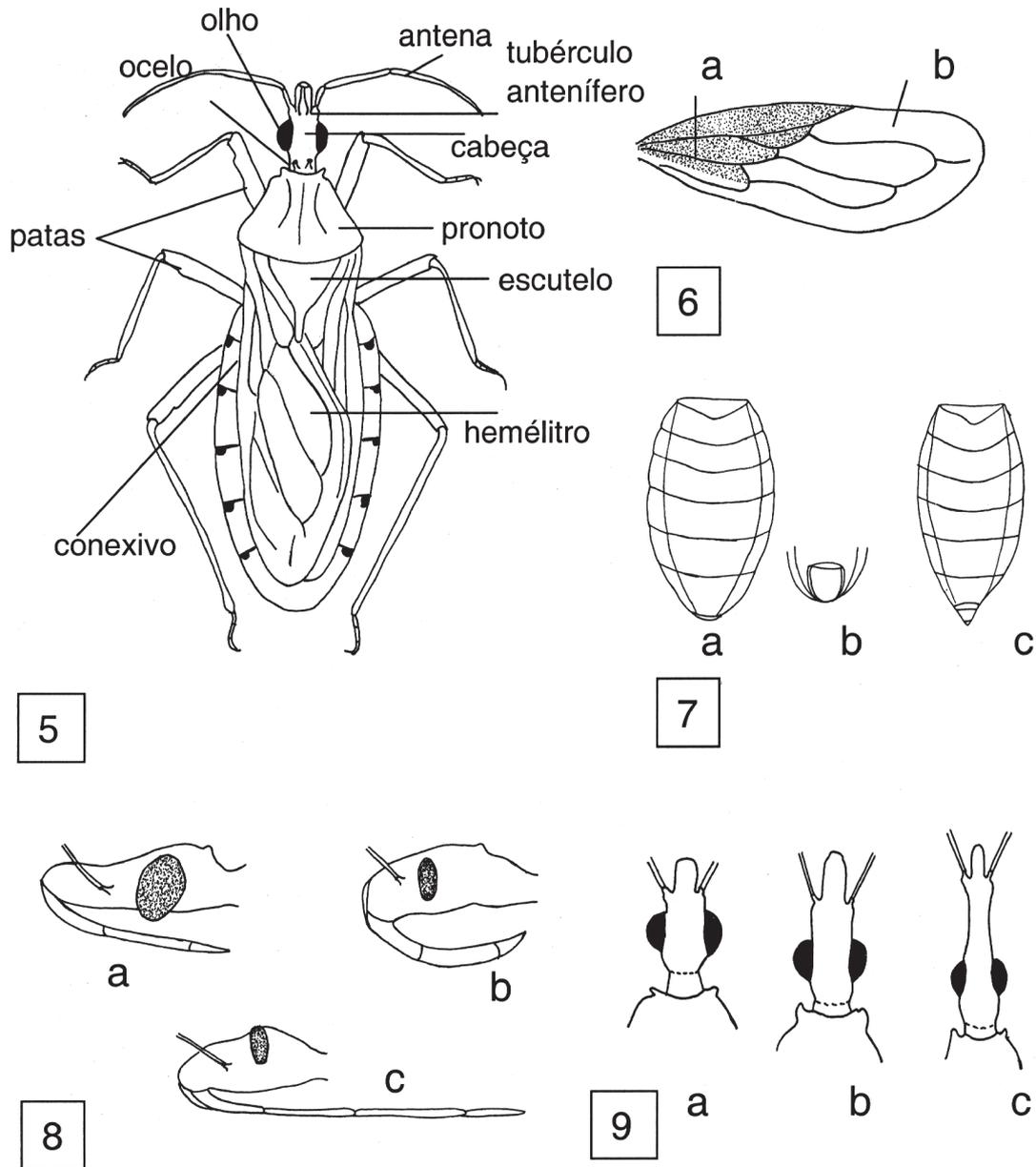
Os triatomíneos são insetos hematófagos em todos os estágios de desenvolvimento, ou seja, em todas as fases, de ninfa até a fase adulta, incluindo machos e fêmeas. Do ponto de vista epidemiológico, este fato é muito importante na transmissão da doença. Esta ocorre durante ou logo após a picada, quando os insetos iniciam as refeições. Uma vez infectados, transmitem o *T. cruzi*, através das fezes, ao indivíduo ou animal que está sendo sugado.

Sem o repasto sanguíneo não ocorrerá desenvolvimento, isto é, as ninfas farão no máximo uma ecdise (muda). A tolerância destes insetos ao jejum é muito grande, existindo espécies que ficam mais de seis meses sem alimentação; porém, quando esta ocorre, logo a seguir a muda volta a acontecer normalmente.

Estes insetos possuem tamanho e cores variadas, sob a forma de manchas espalhadas em diversas regiões do corpo, que permitem, dentre outros caracteres, diferenciar espécies. Obviamente, não podemos esquecer que para uma classificação apurada, é necessário uma chave dicotômica para sistemática, publicada em várias obras especializadas que se encontram citadas nas referências ao final do capítulo.

A diferenciação dos três gêneros de interesse médico pode ser feita através da localização do tubérculo antenífero, ponto de inserção das antenas na cabeça (Figura 9).

- Gênero *Triatoma* – Apresenta a cabeça de tamanho médio, com a inserção das antenas na metade da distância entre os olhos e o ápice da cabeça.
- Gênero *Panstrongylus* – Apresenta a cabeça curta, de aspecto “robusto”, com a inserção das antenas na região imediatamente anterior aos olhos.
- Gênero *Rhodnius* – Apresenta a cabeça alongada, com a inserção das antenas bem próxima ao ápice da cabeça.



Figuras 5-9 – Esquemas da morfologia de triatomíneos. 5. Aspecto geral da morfologia externa; 6. Hemélitro com a asa típica da ordem Hemíptera, suas porções anterior coriácea (a) e posterior membranosa (b); 7. Abdômen de um macho com vistas dorsal (a), ventral (b) e de uma fêmea com vista dorsal (c); 8. Tipos de aparelho bucal de hemípteros: hematófago (a), predador (b), fitófago (c); 9. Diferenciação dos gêneros *Panstrongylus* (a), *Triatoma* (b) e *Rhodnius* (c)

2.3. Ciclo de Vida

São insetos ovíparos e hemimetabólicos, isto é, apresentam a fase de ovo, ninfa e adulto. A diferença entre as formas jovens (ninfas) e os adultos está na presença de asas nos adultos e na ausência de aparelho reprodutor completo nas ninfas. A fêmea realiza a postura cerca de vinte a trinta dias após a fecundação, com uma quantidade variável, dependendo da espécie. Na literatura encontramos exemplos de até 220 ovos para *P. megistus* em posturas variadas. A coloração dos ovos após a postura é igual para todas as espécies, apresentando-se brancos inicialmente, tornando-se amarelados, e à medida que o embrião vai se desenvolvendo, passam a rosados chegando a rubros

próximo à eclosão. Esses ovos têm características morfológicas do cório (cobertura protetora) distintas, fornecendo por isso, bom material para a classificação das espécies. O tempo de eclosão também varia de acordo com as espécies, sendo de oito a quinze dias (Figura 4 a, b).

Após a eclosão, que se dá por uma abertura denominada opérculo, a ninfa se apresenta rosada e, à medida que o tempo passa, o contato com o ar faz com que adquira a coloração definitiva. Este fato também é observado cada vez que ocorre uma ecdise, ou seja a troca do tegumento velho por um novo e maior. Uma vez despojado, o tegumento recebe o nome de exúvia.

A partir da saída do ovo, cada período compreendido entre uma muda e outra é denominado estágio. São cinco estágios de ninfa seguidos de um adulto alado, completando um ciclo de aproximadamente duzentos a 250 dias sob condições de laboratório.

2.4. Espécies Transmissoras e sua Distribuição Geográfica

Nos gêneros considerados de importância médica temos como principais espécies transmissoras da doença de Chagas no Brasil:

Espécie	Distribuição geográfica
<i>Triatoma infestans</i>	Bahia, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins
<i>Panstrongylus megistus</i>	Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Espírito Santo, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Pará, Paraíba, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio de Janeiro, Rio Grande do Norte, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Sergipe, Tocantins
<i>Triatoma brasiliensis</i>	Alagoas, Bahia, Ceará, Goiás, Maranhão, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Tocantins
<i>Triatoma sordida</i>	Bahia, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraná, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Sul, Santa Catarina, São Paulo, Tocantins
<i>Triatoma pseudomaculata</i>	Alagoas, Bahia, Ceará, Distrito Federal, Goiás, Maranhão, Mato Grosso do Sul, Minas Gerais, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte, Sergipe, Tocantins

Rhodnius prolixus pode ser encontrado no Brasil nos estados do Amazonas, Goiás e Tocantins, porém esta espécie possui maior importância na transmissão em países da América Latina, como é o caso da Venezuela.

2.5. As Zoonoses Parasitárias

Zoonoses são enfermidades que são transmitidas naturalmente dos animais ao homem. O conceito de zoonose é bastante complexo, envolvendo o homem, em alguns casos, outro vertebrado, um artrópode, o agente causador da doença e o ambiente como um todo, formando um conjunto biológico que é ativado por ações recíprocas entre todas as partes. A natureza se compõe de uma interação destes conjuntos que são modificados constantemente por mudanças no ambiente. Isto leva a alterações nos hábitos de todos os envolvidos no conjunto. Tomemos por exemplo os triatomíneos. Certamente, a infecção por tripanosomatídeos estava restrita, inicialmente, ao ecótopo silvestre, ou seja, as espécies que viviam unicamente em habitats silvestres utilizavam como fonte de alimentação animais silvestres (roedores, marsupiais, aves, morcegos, tatus). Com o desmatamento e a colonização dessas áreas pelo homem, houve substituição dos animais silvestres pelo homem e seus animais domésticos (aves, cão, gato e pequenos mamíferos). Essa modificação provocou uma mudança no hábito alimentar de várias espécies, ou seja, espécies que eram essencialmente silvestres iniciaram um processo de ocupação do peridomicílio chegando em alguns casos até a domiciliação.

Baseados nestes aspectos, podemos classificar as espécies de triatomíneos em silvestres, peridomiciliadas e domiciliadas.

Vejamos como as espécies transmissoras mais importantes se enquadram.

- *T. infestans*: é uma espécie domiciliada, com raros focos silvestres, vivendo nas casas em frestas de parede, telhados de palha, embaixo de colchões e caixas, atrás de quadros e objetos pendurados nas paredes. Podem habitar também o peridomicílio, alimentando-se de animais que vivem em galinheiros e currais, podendo também ser encontrada sob pedras, tocos ou folhas próximos a estes locais.
- *P. megistus*: espécie domiciliada, podendo ser encontrada no peridomicílio e nos ecótopos naturais como ninhos de pássaros, copa de palmeiras, bromélias, ninhos de gambás, etc.
- *T. brasiliensis*: espécie domiciliada, podendo ser encontrada no peridomicílio e no meio silvestre em buracos de pedra.
- *T. pseudomaculata*: espécie domiciliada, encontrada também no peridomicílio e no meio silvestre, principalmente em oco de árvores.
- *T. sordida*: espécie domiciliada, localizando-se algumas vezes no peridomicílio e no meio silvestre em troncos de árvores, raízes expostas, palmeira, bromélia, parede de pedra.
- *R. prolixus*: espécie domiciliada, localizando-se principalmente nos telhados das casas, feitos de palha, onde seus ovos encontram-se aderidos. É encontrado também no peridomicílio e ecótopos naturais (como tocas de tatu e ninhos de aves).

2.6. Controle

A doença de Chagas é uma das mais importantes endemias dentre as que ocorrem na América Latina. Devido a isso, os governos têm dedicado atenção especial aos métodos de controle de triatomíneos, que são prioridade em saúde pública. Quando se fala em controle, porém, não podemos levar em conta somente os aspectos sociais e epidemiológicos que envolvem a doença. Devemos lembrar que para um país, além dos aspectos citados, também é importante analisar as implicações econômicas que uma população “doente” traria no seu desenvolvimento como um todo e, por outro lado, o benefício que o controle da endemia traria nos diversos aspectos.

Uma série de fatores envolvem o controle da doença de Chagas. A simples eliminação do vetor não resolverá o problema. Antes de qualquer medida é necessário ensinar a população a identificar os “barbeiros” como transmissores de uma doença grave e a levar estes insetos aos postos de saúde para determinar se estão ou não infectados, possibilitando aos técnicos em saúde pública determinar as áreas endêmicas. Feito isso, o segundo passo seria melhorar as condições de vida daquela população, substituindo as casas de pau-a-pique, palha e outros materiais que favorecem a proliferação desses insetos, por habitações mais adequadas, com reboco interno e externo nas paredes.

Para um controle efetivo, o primeiro passo seria a “pesquisa entomológica” ou “triatomínica”, que nada mais é do que a busca de vetores ou de vestígios destes, isto é, a presença de fezes nas paredes e ovos. No caso de ser a primeira investigação na área, esta pesquisa, denominada levantamento triatomínico, possibilita conhecer que espécies estão presentes na área, bem como o grau de domiciliação, infecção e densidade destas. Quando se trata de áreas onde já houve tratamento com inseticidas, essa pesquisa possibilita determinar a extensão e a frequência de utilização dessas substâncias. Como esses insetos normalmente se escondem em frestas das paredes, para facilitar a captura utiliza-se um desalojante químico (piriza); porém todas as superfícies internas e externas das residências devem ser revistadas, bem como móveis e objetos. Além do ambiente intradomiciliar, todos os ambientes do peridomicílio, principalmente os que servem de abrigo ou viveiro de animais, cercas e muros, devem ser verificados.

Feita a pesquisa, inicia-se a aplicação de inseticidas, devendo os agentes ter o cuidado de esclarecer à população a necessidade de sua aplicação para o controle da doença. Vários pesquisadores relatam em suas aulas e conferências o fato de a população mal informada lavar as paredes das casas logo após a utilização dos inseticidas.

Os inseticidas recomendados são piretróides de síntese como, por exemplo, ciflutrina, cipermetrina,

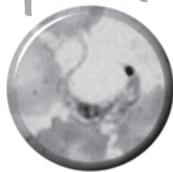
deltametrina e lambdacialotrina, com doses determinadas por técnicos especialistas em utilização de praguicidas para uso em saúde pública.

Além destes procedimentos, a Fundação Nacional de Saúde recomenda que seja feita uma avaliação sorológica, para verificar o impacto do controle vetorial na transmissão da doença.

Referências Bibliográficas

- BRENNER, R. I. L. & STOKA A. I. M. *Chagas Disease Vectors*. Boca Raton: CRC Press, 1988. vols. 1-3.
- COSTA-LIMA, A. M. *Insetos do Brasil. Hemiptera*. Rio de Janeiro: Editora Imprensa Nacional, 1940. p.351.
- JURBERG, J. *A taxonomia de triatomíneos baseada nas estruturas fállicas (H.R.)*, 1996. Tese, Rio de Janeiro: Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
- LENT H. & WYGODZINKY P. Revision of the Triatominae, Hemiptera, Reduvidae and their significance as vectors of Chagas' disease. *Bulletin of the American Museum of Natural History*, 163:23-520, 1979.
- SCHOFIELD, C. J. *Triatominae - Biología y Control*. Eurocommunica Publications Ed., 1994. p. 67.

Capítulo 3



A Ecologia e a Complexidade dos Ciclos de Transmissão do *Trypanosoma cruzi* na Natureza

Ana Maria Jansen, Cristiane V. Lisboa, Ana Paula S. Pinho, Renato Sérgio Marchewski, Regina H.R. Mangia, Elisa Cupolillo & Octavio Fernandes

O *Trypanosoma cruzi*, protozoário flagelado digenético pertencente à Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, é um dos parasitas de maior e mais bem-sucedida distribuição na natureza. Capaz de infectar um amplo espectro de mamíferos, distribuídos entre oito ordens, é transmitido principalmente através de contaminação de fezes infectadas dos vetores, triatomíneos dos gêneros *Rhodnius*, *Triatoma* e *Panstrongylus*.

Um dos aspectos mais interessantes e discutidos do *T. cruzi* é a extrema variabilidade intra-específica. A estrutura populacional do parasita é clonal e uma das hipóteses que explicaria a significativa variabilidade genética deste parasita seria uma divergência e a evolução clonal antiga e independente (Tibayrenc & Ayala, 1988).

Classicamente admitem-se dois ciclos de transmissão: o ciclo doméstico envolvendo o homem, animais sinantrópicos, domésticos e triatomíneos domiciliados, e o ciclo silvestre envolvendo animais e triatomíneos silvestres. A invasão do ecótopo silvestre pelo homem ou a domiciliação de triatomíneos e/ou mamíferos silvestres explicariam a ligação entre estes dois ciclos. No entanto, temos observado que o assim chamado ciclo silvestre do *T. cruzi* é bem mais complexo, na medida em que, em um mesmo segmento de floresta, podem ocorrer distintos e independentes ciclos de transmissão e que o estabelecimento de um ciclo domiciliar dependerá da presença de animais infectados com uma determinada subpopulação do parasita (Fernandes et al., 1993).

3.1 A Heterogeneidade da Espécie

As distintas formas sangüícolas chamaram a atenção dos primeiros pesquisadores que estudaram a biologia do parasito. Assim, considerava-se serem as formas finas e largas, gametas masculinos e femininos, respectivamente (Chagas, 1909) formas jovens e adultas (Brumpt, 1912). Depois destes estudos iniciais, as várias tentativas que vêm sendo feitas no sentido de correlacionar alguma característica morfológica, biológica ou bioquímica dos isolados com as diferentes formas da doença humana ou com o curso da infecção em animais de laboratório, chegaram a resultados ainda bastante controvertidos (Brenner, 1973; Gonçalves et al., 1984; Luquetti et al., 1986; Carneiro et al., 1991). No entanto, marcadores bioquímicos e moleculares têm permitido esclarecer alguns aspectos da epidemiologia do parasita. A análise do perfil eletroforético de enzimas isofuncionais de numerosos isolados obtidos de doentes humanos, reservatórios silvestres e triatomíneos permitiu que se definissem três zimodemas (Z1, Z2 e Z3), de acordo com a circulação do parasita no ambiente domiciliar (Z2) ou silvestre (Z1 e Z3) (Miles et al., 1977; Barrett et al., 1980). A análise do perfil eletroforético dos produtos de

digestão de DNA do cinetoplasto por enzimas de restrição discriminou ainda mais a heterogeneidade do parasita (Gonçalves et al., 1984). A possibilidade de caracterizar, bioquimicamente, as subpopulações do *T. cruzi*, demonstrou que a variabilidade desta espécie pode ser maior do que aquela encontrada em outros *taxa* bem definidos e que os métodos de manutenção do parasita *in vitro* e *in vivo* favoreciam ou eliminavam subpopulações e/ou clones (Dvorak et al., 1972; Deane et al., 1984).

Caracterizações moleculares (RAPD - *randomly amplified polymorphic DNA* e seqüências de genes de minixon e da subunidade 24Sa ribossomal) sugeriram duas linhagens distintas e bastante distantes filogeneticamente. A linhagem 1 foi correlacionada ao ciclo domiciliar e a linhagem 2 ao ciclo silvestre de transmissão do *T. cruzi*. Mais recentemente as subpopulações de *T. cruzi* foram agrupadas em dois grandes grupos. Assim, isolados caracterizados como zimodema 1, linhagem 2, tipo III e ribodema II/III, passaram a compor o grupo *T. cruzi* I. As subpopulações caracterizadas como zimodema 2, linhagem 1, tipo II e ribodema I foram incluídas no grupo *T. cruzi* II (Andrade et al., 1974; Miles et al., 1977; Clark & Pung, 1994; Tibayrenc, 1995; Souto et al., 1996; Zingales et al., 1997; Luquetti et al., 1999).

3.2 As Peculiaridades da Infecção nos Mamíferos Silvestres

Embora se saiba que basicamente cada espécie de mamífero e/ou triatomíneo possa representar um elemento selecionador de subpopulações do parasita, pouco se conhece sobre a dinâmica da transmissão do *T. cruzi* na natureza e as variáveis bióticas e abióticas envolvidas. Os estudos realizados, na maioria das vezes, refletem situações momentâneas da enzootia, sem aprofundar a questão das diferentes interações entre os reservatórios, vetores e seus padrões comportamentais que certamente são fundamentais na manutenção e dispersão dessa protozoose.

Os estudos sobre a interação do *T. cruzi* com marsupiais da Família Didelphidae, que são considerados os mais antigos e importantes reservatórios do parasita (Stevens et al., 1998), não só resultaram no esclarecimento de numerosas questões relacionadas com a biologia e epidemiologia do *T. cruzi*, mas também levantaram outras tantas:

- a) observou-se que gambás controlam a infecção pelo *T. cruzi* desde muito jovens (45 dias, ainda inteiramente dependentes do marsúpio). Representam um “filtro biológico” bastante seletivo: mantêm indefinidamente, com alto percentual de hemocultivos positivos, as infecções experimentais por cepa F e isolados silvestres, todos de zimodema 1, mas controlam muito rapidamente, chegando em alguns casos a eliminar, as infecções experimentais pelas cepas Y e FL (Deane et al., 1984; Jansen et al., 1997);
- b) o ciclo do *T. cruzi*, como é conhecido, envolve duas fases de multiplicação, uma intracelular, na forma amastigota em diversos tecidos do hospedeiro vertebrado e a outra inteiramente extracelular como epimastigota na luz do tubo digestivo do inseto vetor. Entretanto, Deane et al. (1984) observaram que os dois ciclos podem ocorrer simultaneamente no gambá *Didelphis marsupialis*, no qual o parasita pode multiplicar-se extracelularmente (na forma epimastigota) e diferenciar-se na luz das glândulas de cheiro. O encontro, nestas glândulas do *D. marsupialis*, de formas evolutivas do *T. cruzi* antes descritas apenas no tubo digestivo dos triatomíneos, demonstrou ser o gambá ao mesmo tempo reservatório e vetor, e apontou a necessidade de revisão cuidadosa da biologia dos tripanosomatídeos de um modo geral, e do *T. cruzi* em particular, a fim de esclarecer a importância deste achado na manutenção do parasita na natureza. Vale assinalar que glândulas de cheiro são encontradas na grande maioria dos mamíferos e estão relacionadas a numerosos padrões comportamentais tais como acasalamento, defesa e marcação de território. Tripanosomatídeos em geral, e o *T. cruzi* em particular, são parasitas extremamente ecléticos no que se refere a substrato nutricional e aos diversos microhábitats oferecidos pelos numerosos hospedeiros (Vickerman, 1994). A adaptação do parasita às glândulas de cheiro, hábitat tão inusitado, reflete este ecletismo e é provavelmente uma aquisição secundária na história da interação do *T. cruzi* com o gambá (Jansen et al., 1997).

A importância epidemiológica do parasitismo nas glândulas de cheiro ainda é desconhecida, já que não se avaliou a sua capacidade vetorial. Vale mencionar que, se por um lado o encontro de gambás com parasitas nas

glândulas de cheiro é raro (Naiff et al., 1987; Steindel et al., 1988; Fernandes, 1993), por outro, surtos endêmicos de malária ou leishmaniose se mantêm com índices de infecção dos vetores em torno de 1%. São vários os relatos na literatura de alta prevalência de infecção natural entre gambás onde a população de triatomíneos é praticamente ausente; portanto, a raridade de glândulas de cheiro naturalmente infectadas não exclui a possibilidade de ser este um mecanismo importante na manutenção da circulação de *T. cruzi* no meio ambiente. Epidemias circunscritas da doença de Chagas, não explicáveis pelos mecanismos habituais de transmissão por triatomíneos, são de há muito conhecidas. Muito antes da descrição do ciclo do *T. cruzi* nas glândulas anais do gambá, já se havia sugerido uma correlação entre a presença de gambás e um surto epidêmico da doença de Chagas em Nova Teutônia, RS (Nery-Guimarães et al., 1968). Em condições artificiais foi possível infectar camundongos com alimentos contaminados com conteúdo de glândulas de cheiro infectadas.

Avaliando, comparativamente, o curso da infecção natural de gambás e de cuícas (*Philander frenata*), um outro marsupial didelfídeo que vive em simpatria com *D. marsupialis*, observamos que também estes didelfídeos apresentam infecções estáveis por *T. cruzi*, embora não mantenham o ciclo de multiplicação extracelular nas glândulas de cheiro. As lesões histopatológicas não são severas, mas são um pouco mais importantes do que as dos gambás. Este estudo foi realizado em um fragmento de Mata Atlântica de altitude (Teresópolis, RJ) onde se observaram altas taxas de infecção nas duas espécies: 50% em *P. frenata* e 60% de *D. marsupialis*. A busca de vetores resultou na coleta de 23 *R. prolixus*, dos quais 13 estavam infectados.

A caracterização biológica (acompanhamento do curso da infecção experimental em camundongos suíços) separou os isolados de gambás e cuícas em dois grupos distintos: um, bastante virulento para camundongos, onde predominaram os isolados de cuícas, e outro, constituído principalmente por isolados de gambás e barbeiros, que não resultava em mortalidade de camundongos experimentalmente inoculados. A caracterização bioquímica (análise dos perfis eletroforéticos de enzimas isofuncionais) também separou os isolados dos marsupiais em dois grandes grupos: um incluindo todos os isolados dos vetores e a maioria dos isolados de gambás; no outro predominaram os isolados de cuícas.

Foram observados 15 zimodemas e, como era esperado, uma maior variabilidade genética entre os isolados de cuícas. A tipagem molecular (análise da seqüência de gens de miniexons) mostrou 40% de cuícas infectadas com subpopulação *T. cruzi* II.

A correlação entre os marcadores empregados não foi absoluta, mas evidenciou a circulação na natureza de subpopulações do *T. cruzi* vinculadas às infecções humanas, além de sua associação preferencial com a cuíca *P. frenata*. Estes resultados, e a observação prévia de que cuícas não são filtros biológicos seletivos, levantaram a hipótese de que estas duas espécies, tão próximas filogeneticamente e que vivem em simpatria, estariam participando de dois ciclos independentes de transmissão do *T. cruzi*. Esta hipótese foi reforçada na medida em que, em condições experimentais, *R. prolixus* foi capaz de manter os dois grupos do parasita.

Esta questão nos levou a estender o espectro de espécies de animais estudados e que ocupassem diferentes estratos florestais na mata. Passamos então a avaliar animais pertencentes às ordens Primata, Rodentia, Quiroptera e Edentata da Reserva Biológica de Poço das Antas.

A Reserva Biológica de Poço das Antas situa-se no município de Silva Jardim, limitando-se com Casimiro de Abreu e Araruama, RJ. A vegetação é caracterizada por florestas secundárias em diferentes estágios sucessionais e por áreas bastante devastadas. O local ainda conta com uma rica fauna de mamíferos típicos e endêmicos e algumas espécies vegetais primárias. Neste local vem sendo desenvolvido um dos mais reconhecidos programas de conservação de espécie animal endêmico e em extinção: o mico-leão-dourado (*Leontopithecus rosalia*). O programa de conservação inclui a reintrodução e a translocação desta espécie (Kleinman et al., 1990; Beck et al., 1991). Dentro do programa de translocação, grupos isolados de micos-leões-dourados encontrados em pequenos fragmentos remanescentes de Mata Atlântica, são transferidos para uma outra reserva (Reserva Biológica União). No programa de reintrodução, fazendas adjacentes à reserva Poço das Antas são repovoadas com micos criados em diversos zoológicos do mundo. Estes programas levam sempre em consideração a distribuição original da espécie.

A maioria dos primatas tem uma estrutura social bastante estável. Cada grupo de micos-leões-dourados conta com quatro a seis indivíduos. Cada membro do grupo fica responsável por diferentes tarefas que incluem

reprodução, cuidado com os filhotes, alimentação e estratégia de defesa. São territoriais, têm atividade diurna, ocupam o estrato arbóreo/intermediário e se abrigam em ocos de árvores.

Até o momento, observamos que o *T. cruzi* circula pelo menos entre quatro ordens de mamíferos da Reserva de Poço das Antas: primata (mico-leão-dourado), edentados (preguiça-de-coleira), roedores (rato silvestre) e marsupiais (gambá).

A enzootia em Poço das Antas apresenta características bastante peculiares quando comparada com Teresópolis. O percentual de marsupiais naturalmente infectados foi 5%, bastante baixo em relação às descrições de outros autores e de nossas observações em outras áreas. Entre os roedores encontramos 13% infectados. Por outro lado, 50% da população de *L. rosalia* se mostrou infectada. Os micos-leões-dourados infectam-se provavelmente logo após o desmame, não tendo sido observada transmissão vertical; pesquisa realizada em quatro animais recapturados entre três e doze meses, mostra que a enzootia está se expandindo, o que pode ser comprovado pela existência da infecção em alto percentual de *L. rosalia* reintroduzidos nas fazendas adjacentes à reserva.

Em todos os grupos examinados encontramos micos-leões-dourados infectados, mas a prevalência foi maior nos grupos que pernoitam no mesmo oco, o que sugere que a fonte da infecção se localize neste local. A caracterização molecular (análise de gens de miniexon) dos isolados de micos-leões-dourados correspondeu à linhagem 1 (*T. cruzi* II), ao contrário dos isolados dos demais animais que correspondem à linhagem 2 (*T. cruzi* I). A caracterização biológica mostrou que estes isolados tendem a ser mais virulentos para camundongos suíços, com taxas de mortalidade entre 40% e 100%. Os isolados dos demais animais resultaram sempre em parasitemia patente baixa, com raros exames de sangue a fresco positivos e 100% de sobrevivência.

Estes resultados confirmam a complexidade do ciclo silvestre do *T. cruzi*, na medida em que observamos distintos ciclos de transmissão, que independem do estrato florestal, podendo acontecer em um mesmo ecótopo.

O encontro de micos-leões-dourados naturalmente infectados por uma subpopulação de *T. cruzi* correlacionada com a infecção humana torna fundamental avaliar a importância desses animais como fonte de dispersão do parasita na natureza e, principalmente, para indivíduos humanos, uma vez que os micos-leões-dourados vêm sendo muito manejados dentro dos programas de reintrodução e translocação acima mencionados. É importante também que sejam repensados todos os programas de translocação e reintrodução não só desta espécie, uma vez que a metodologia usada no projeto mico-leão-dourado serve como modelo para outros programas de conservação de animais em extinção. Além das implicações epidemiológicas deve-se levar em consideração o impacto sobre as outras espécies animais que possa resultar do manejo dos micos infectados.

Nossos resultados mostram que, em relação à circulação do *T. cruzi* na natureza, se deveriam mencionar “os ciclos silvestres do *T. cruzi*” uma vez que vários e independentes ciclos de transmissão podem ocorrer num mesmo segmento de floresta. Mais ainda, os nossos estudos indicam que as variáveis envolvidas na circulação do *T. cruzi* na natureza são únicas para cada área, o que inviabiliza qualquer estudo de impacto ambiental baseado em dados secundários.

Cada vez mais o homem vem intervindo nas florestas em função de diferentes objetivos, que incluem desde a exploração até os numerosos programas de conservação, que sempre resultam em fluxos migratórios humanos, translocação e reintrodução de animais, o que torna obrigatório o conhecimento dos fatores determinantes da dispersão, não somente do *T. cruzi*, mas das parasitoses de um modo geral.

Referências Bibliográficas

- ANDRADE S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas no Recôncavo Baiano. *Revista de Patologia Tropical* 3:65-121, 1974.
- BARRETT, T. V.; HOFF, R. H.; MOTT, K. E.; MILES, M. A.; GODFREY, D. G. TEIXEIRA, R. & ALMEIDA DE SOUZA, J. A. Epidemiological aspects of three *Trypanosoma cruzi* zymodemes in Bahia State, Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 74:84-89, 1980.
- BECK, B. B., KLEIMAN, D. G., DIETZ, J. M., CASTRO, J. & B. RETTBERG-BECK. Losses and reproduction in reintroduced golden lion tamarin. *DoDo* 27: 50-61, 1991.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review Microbiology* 27:240-247, 1973.
- BRUMPT, E. *Trypanosoma cruzi* évolue chez *Conorhis megistus*, *Cimex lectularius*, *Cimex bourti ornithodoros moubata*. *Bulletin de la Société de Pathologie Exotique*, 5:360-367, 1912.
- CARNEIRO, M.; ROMANHA, A. J. & CHIARI, E. Biological characterization of *Trypanosoma cruzi* strains from different zymodemes and schizodemes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86:387-394, 1991.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1909.
- CLARK, C.G. & PUNG, O. Host especificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Molecular and Biochemical Parasitology* 66:174-179, 1994.
- DEANE, M. P.; JANSEN, A. M. & LENZI, H. L. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host the opossum *Didelphis marsupialis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:513-515, 1984.
- DVORAK, J. A.; HARTMAN, D. L. & MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi*: correlation of growth kinetics to zimodeme type in clones derived from various sources. *Journal of Protozoology*, 27:472-474, 1972.
- FERNANDES, A. P.; NELSON, K. & BEVERLEY, S. M. Evolution of nuclear ribosomal RNAs in kinetoplastid protozoa: perspectives on the age and origin of parasitism. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 90:11608-11612, 1993.
- GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S. & MOREL, C. M. Trypanosomatid characterization by schizodeme analysis. In: *Genes and Antigens of Parasites. A laboratory manual*, 2nd ed., Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz, 1984. p. 95-109.
- JANSEN, A. M.; MADEIRA F.; CARREIRA, J. C.; MEDINA-ACOSTA, E. & DEANE, M. P. *Trypanosoma cruzi* in the opossum *Didelphis marsupialis*: a study of the correlations and kinetics of the systemic and scent gland infections in naturally and experimentally infected animals. *Experimental Parasitology* 86: 37-44, 1997.
- KLEINMAN, D. G.; BECK, B. B.; BAKER, A. J.; BALLOU, J.D.; DIETZ, L.A. & DIETZ, J. M. The conservation program for the golden lion tamarin. *Endangered Species UPDATE*, 8:82-85, 1990.
- LUQUETTI, A. D.; MILES, M.; RASSI, A.; REZENDE, J. M.; SOUZA, A. A.; POVOA, M. M. & RODRIGUES, I. *Trypanosoma cruzi*: zymodemes associated with acute and chronic Chagas' disease in Central Brasil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, 80:462-470, 1986.
- LUQUETTI, A.; PRATA, A.; MONCAYO, A.; ROMANHA, A.; JANSEN, A.; ZINGALES, B.; MOREL, C.; PONCE, C.; CHIARI, E.; CUPOLILLO, E.; GUHL, F.; MOMEN, H.; COURA, J. R.; STEINDEL, M.; MILES, M.; TIBAYRENC, M.; FERNANDES, O.; OLIVEIRA, R.; ZELEDÓN, R.; ANDRADE, S.; BARRET, T.; MACÊDO, V. & BRENER, Z. Recommendations from a satellite meeting. Simp. Int. sobre Avanços do Conhecimento da Doença de Chagas 90 anos após sua Descoberta. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl.I): 429-432, 1999.
- MILES M. A., TOYÉ, P. J.; OSWALD, S. C., GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct strain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 71:217-225, 1977.
- NAIFF, R. D.; NAIFF, M. F.; BARRETT, T. V. & ARIAS, J. R. *Trypanosoma cruzi* nas glândulas anais do *Didelphis marsupialis*: primeiro registro de infecções naturais. *Anais do X Congresso da Sociedade Brasileira de Parasitologia*, 1987. Resumo 165.
- NERY-GUIMARÃES, F.; da SILVA, N. N.; CLAISELL, D.; de MELLO, A. L.; RAPONE, T.; SNELL, T. & RODRIGUES, N. Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva ocorrido em Teutonia (Estrela-Rio Grande do Sul). *O Hospital*, 73:1767-1804, 1968.
- SOUTO, R.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A. & ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology* 83:141-152, 1996.
- STEINDEL, M.; SCHOLZ, A.; TOMA, H. K. & SCHLEMPER, B. R. Presence of *Trypanosoma cruzi* in the anal glands of naturally infected opossum (*Didelphis marsupialis*). *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79:513-515, 1988.

- STEVENS J.; NOYES, H. & GIBSON, W. The evolution of trypanosomes infecting humans and primates. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 93:669-676, 1998.
- TIBAYRENC, M. Genetic epidemiology of parasitic protozoa and other infectious agents: the need for an integrated approach. *International Journal of Parasitology* 28:85-104, 1995.
- TIBAYRENC, M. & AYALA, F. J. Isoenzyme variability in *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas' disease: genetical, taxonomical and epidemiological significance. *Evolution*, 42:277-292, 1988.
- VICKERMAN, K. The evolutionary expansion of the trypanosomatid flagellates. *International Journal of Parasitology*, 24:1317-1331, 1994.
- ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPEBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A. M. & FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal of Parasitology* 28:105-112, 1998.

Capítulo 4



Resposta do hospedeiro à infecção

4.1

Respostas Imune Inata, Inflamatória e de Fase Aguda na Doença de Chagas

Tania C. Araújo-Jorge

A infecção humana pelo *Trypanosoma cruzi* deflagra um conjunto de reações que levam ao reconhecimento do parasita e à montagem de uma resposta imune específica bastante eficaz, capaz de controlar o crescimento parasitário por toda a vida do indivíduo. Parasitemias subpatentes e a resistência à reinfeção passam então a caracterizar a infecção humana e de outros modelos experimentais mamíferos, inclusive em camundongos.

Os sinais típicos da fase aguda humana são o chagoma (lesão na porta de entrada do parasita) e a parasitemia (presença do parasita no sangue circulante). A parasitemia desenvolve-se por uma fase indetectável microscopicamente (período pré-patente), outra detectável e crescente e uma terceira, detectável e decrescente (Figura 1). Este estágio da doença é pouco compreendido em humanos devido aos poucos casos estudados. As fontes principais de estudos são casos de infecção acidental em laboratório (Hofflin et al., 1987; Grauert et al., 1993) e casos de infecção congênita. Tal escassez está relacionada à curta duração dessa fase (um a dois meses) e à presença de uma sintomatologia tão fugaz, que pode passar totalmente despercebida (Antas et al., 1999). Após a fase aguda, geralmente benigna e inaparente, segue-se uma fase clínica conhecida como “indeterminada” ou “inaparente”, na qual associam-se ausência de sintomatologia clínica com sorologia positiva. Após vinte a trinta anos, cerca de 20% dos indivíduos infectados desenvolvem a fase crônica, sintomática, com diferentes formas clínicas: cardíaca, digestiva ou neurológica.

Nos indivíduos imunocompetentes, a articulação da resposta imune ocorre em três etapas (Figura 1). A primeira se desenvolve nas duas primeiras semanas pós-infecção, antes do aparecimento de parasitemia patente e ascendente, e depende dos mecanismos efetores da *resposta imune inata*, também chamada imunidade natural, com destaque para a resposta inflamatória. A segunda etapa, que se desenvolve nos estágios intermediário e tardio da fase aguda da infecção, quando a fase ascendente da parasitemia é refreada e controlada até atingir novamente níveis subpatentes, depende dos componentes celulares e humorais da *resposta imune específica adquirida*. A terceira etapa, também dependente da resposta imune específica, se mantém por toda a fase crônica da infecção e é responsável pela manutenção da parasitemia subpatente por longo prazo, por forte sorologia positiva e pela *memória imunológica* que garante resistência à reinfeção (e

portanto ausência de reagudização por qualquer outra cepa do *T. cruzi*) no hospedeiro imunocompetente, mas não no imunossuprimido. Essa fase é abolida se o indivíduo infectado for tratado durante a fase aguda e for curado parasitologicamente.

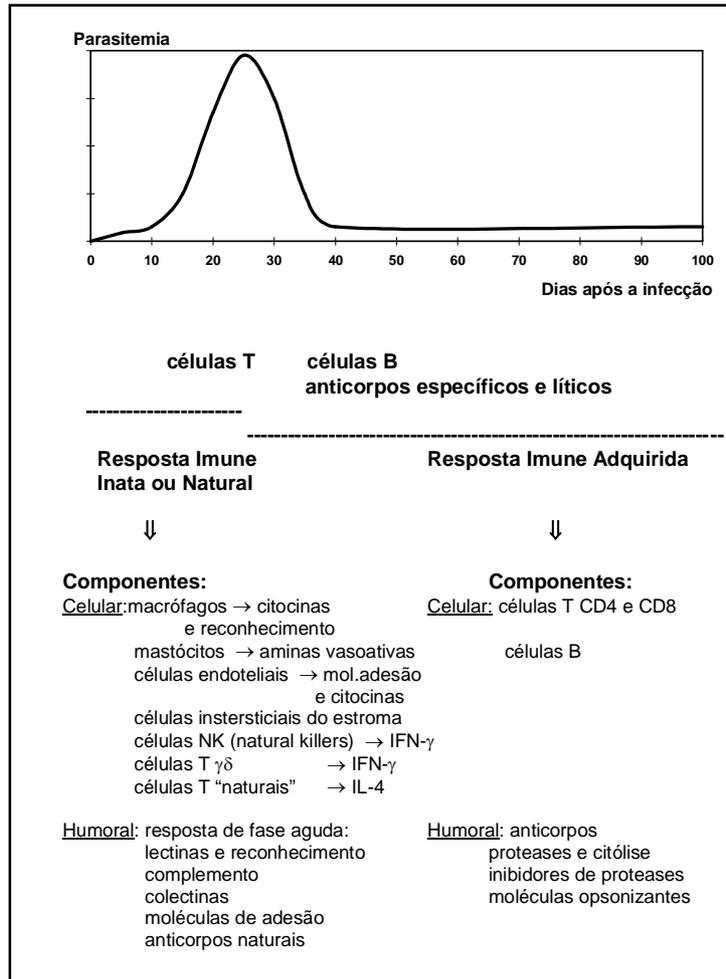


Figura 1 – Cinética das respostas imune inata e adquirida durante a infecção por *Trypanosoma cruzi*, avaliada a partir da detecção da parasitemia

4.1.1 Evolução da Infecção no Sítio de Inoculação

Historicamente, a primeira questão colocada e confirmada no modelo do camundongo foi a infectividade das formas metacíclicas obtidas dos triatomíneos infectados capturados em campo, bem como das sangüíneas obtidas de animais infectados. Em 1912, Brumpt referia que em algumas horas tripomastigotas sangüíneas inoculados por via subcutânea já podiam ser encontrados no sangue, e em 1934 Dias relatou que 40 minutos após uma inoculação subcutânea, e 165 minutos após uma intraperitoneal, já se podiam evidenciar parasitas circulantes. A porta de entrada foi investigada experimentalmente em camundongos também por Romaña (1943). Este autor demonstrou que as mucosas permitiam a instalação e expansão da infecção, ao contrário da pele íntegra, que se constituía numa barreira à penetração do *T. cruzi*. O parasita só coloniza a pele por inoculação subcutânea, por escarificação e manutenção por duas horas do inóculo com fezes de triatomíneo contaminadas com metacíclicos.

A evolução da infecção no sítio de inoculação subcutânea foi também abordada no modelo do camundongo e indica a relação parasita-célula hospedeiro *in vivo* (Dias, 1934; Romaña, 1943). Durante o primeiro período de multiplicação intracelular do *T. cruzi* (três primeiros dias) não ocorrem fenômenos infiltrativos celulares. Só quatro a cinco dias após à inoculação, em seguida às primeiras rupturas de células parasitadas, é que aparecem as primeiras células de infiltrado inflamatório: leucócitos polimorfonucleares, monócitos, linfócitos e mobilização e ativação de macrófagos tissulares. Enquanto as células estão íntegras não ocorre inflamação em torno, mas à medida que aumenta o número de células destruídas pela multiplicação parasitária, aumenta a infiltração celular. É freqüente o encontro de células parasitadas no tecido conjuntivo subcutâneo e entre os feixes musculares, em especial macrófagos e fibroblastos, mas a invasão de fibras musculares vizinhas ao ponto de inoculação é um fenômeno um pouco mais tardio.

O processo inflamatório inicial é dependente da presença do parasita e envolve o recrutamento de macrófagos, células NK, neutrófilos e alguns eosinófilos nestas regiões focais. Isso foi reanalisado por Deuschländer et al. (1978). Inoculando a cepa Brazil, subcutaneamente, na pata de camundongos NMRI, os autores observaram a presença de granulócitos dois dias após a inoculação, de macrófagos infectados quatro dias após a infecção, forte infiltrado inflamatório somente nove dias pós-infecção, em todos os tecidos da pata, com ninhos de parasitas ainda em macrófagos e pseudocistos em células musculares íntegras. Após dezoito dias não havia mais parasitas nos macrófagos mas havia muitos pseudocistos nas fibras musculares, junto com forte reação inflamatória, necrose de fibras e reação de cicatrização causada pela ruptura dos pseudocistos. É portanto comum o encontro de macrófagos parasitados, servindo como hospedeiros para o parasita e sem capacidade microbicida imediata sobre eles. Com a formação do infiltrado inflamatório e a ativação celular, podem ser encontrados macrófagos com parasitas íntegros e em divisão e outros com parasitas destruídos (Romaña, 1943). É comum também a destruição de células adiposas, e há relatos de que células de parede de vaso (endoteliais) também podem ser encontradas parasitadas (Dias, 1934). Recentemente foi demonstrado que a carga parasitária na fase aguda é decisiva no desenvolvimento da patologia, do parasitismo e da ativação do sistema imune na fase crônica da infecção (Marinho et al., 1999).

Um recente estudo de Montéon et al. (1996) confirmou que o primeiro infiltrado inflamatório no sítio de inoculação subcutânea do *T. cruzi* ocorre com polimorfonucleares após 1 hora, atinge um pico em 24 horas e não é mais visto após sete dias. Já o infiltrado mononuclear inicia-se após um dia, é máximo após quinze dias, é ainda detectável aos trinta dias, e regride totalmente em oitenta dias pós-infecção. No sítio de inoculação só foi possível detectar o parasita histologicamente e por imunocitoquímica 1 ou 15 minutos após a infecção; no entanto, por PCR detecta-se DNA de *T. cruzi* desde um até quinze dias. Após trinta ou 180 dias nem mesmo por PCR os autores detectaram vestígios do parasita no sítio de inoculação. Já miosite e miocardite foram detectadas em intensidade crescente após sete, quinze e trinta dias, sempre acompanhadas de infiltrado mononuclear e da detecção do *T. cruzi* por PCR. O parasitismo decresce histologicamente após 180 dias mas mantém-se positivo por PCR, assim como a miosite e a miocardite.

Os autores acima referidos geralmente concordam em que os macrófagos têm papel decisivo na etapa inicial de proliferação parasitária:

A completa mudança do parasitismo no sítio de inoculação para o compartimento muscular sugere que a quantidade de parasitas e os macrófagos disponíveis no sítio inflamatório são fatores determinantes na fase inicial da infecção (Deuschländer et al., 1978).

Em 1929, Galliard chamou a atenção para o fato de que no peritônio dos camundongos, onde há grande disponibilidade de macrófagos residentes, se desenvolve uma infecção muito mais intensa que a percebida pelo exame do sangue. Desde muito cedo (dois dias após a infecção) já se pode detectar uma quantidade apreciável de tripomastigotas no líquido peritoneal.

4.1.2 A Resposta Imune Inata

Considerada por muito tempo como um vestígio ancestral de resposta imune, apenas recentemente a resposta imune inata vem sendo reexaminada. Seu papel no desenvolvimento e na articulação das respostas específicas adquiridas e em problemas de imunorregulação e imunopatologia vem sendo reinterpretado e considerado chave nas definições da intensidade e do tipo de resposta específica (Fearon & Locksley, 1996).

Os sistemas imune inatos, naturais, são compostos por proteínas solúveis e receptores de membrana produzidos pelas linhagens germinativas para *identificar substâncias potencialmente nocivas*. Seus principais componentes solúveis são o *sistema complemento* e as *proteínas de fase aguda*, com destaque para as *colectinas* (*mannose-binding protein* e outras), as *pentraxinas* e os *inibidores de proteases*. Seus principais componentes celulares são os *macrófagos* tissulares e *inflamatórios* (macrófagos ativados inespecificamente), as *células NK* (linfócitos *natural killers*), *outras células apresentadoras de antígenos* (especialmente células dendríticas), e *algumas células T* ($\gamma\delta$ e células T “naturais”). A característica comum a todas essas células é a expressão de moléculas de superfície com capacidade de reconhecimento dos componentes solúveis da resposta inata (receptores para complemento e para diversas proteínas de fase aguda), bem como de reconhecimento de padrões estruturais diferentes do próprio (*non-self*), especialmente carboidratos e glicolipídios complexos comuns em microorganismos. Assim, diversos tipos de receptores de superfície são moléculas de reconhecimento características dessas células, tais como os receptores *scavenger*, os receptores para complemento, o receptor para LPS (CD14) e os receptores lectínicos como o receptor de manose ou as galactinas. Por meio de sinalização desses receptores são estimuladas a síntese de IL-1, IL-6, IL-12 e TNF- α (fator α necrosante de tumor). Já a resposta imune adquirida, que envolve o rearranjo dos elementos V, D, e J dos genes RAG 1 e RGA 2 para gerar bilhões de clones com distintos BCR e TCR, baseia-se num sistema de detecção de peptídeos que fornece uma faixa de reconhecimento de estruturas moleculares mais ampla do que os carboidratos, mas não distingue patógenos potenciais, que precisam de uma resposta imune, de substâncias inócuas para as quais uma resposta imune pode ser desnecessária ou até mesmo problemática, como no caso de antígenos próprios.

Articulando as respostas imune inata e adquirida encontram-se as citocinas, que se classificam em classes funcionalmente distintas: TNF, TGF, IL-1, IL-6, IL-8 e MCP-1 que são consideradas a resposta de fase aguda; CNF, SCF, TPO e EPO que são citocinas envolvidas na hematopoiese e INF- γ , IL-2, -4, -6, -7, -10, -12, -13 e -15, que são as citocinas ditas reguladoras da função imune adquirida (Les & Van Voorhis, 1995).

A intensidade de apresentação de um determinado antígeno é o primeiro determinante da montagem da resposta específica adquirida pelo reconhecimento por células T auxiliaadoras. Todos os sistemas de endocitose mediada por receptores em macrófagos e células dendríticas que facilitem a apresentação de antígenos parasitários (por exemplo, lectinas e receptores diversos de remoção de componentes fisiológicos) conferem, portanto, capacidade de instrução da resposta imune inata para a resposta específica adquirida. Do mesmo modo, todos os sistemas ativadores do complemento, que geram C3d, potencializam a resposta imune humoral, pois o receptor para C3d (CD21) na membrana dos linfócitos B ao interagir com seu ligante estabiliza a ligação de CD19 com o BCR. No hospedeiro não imune os ativadores do complemento são as IgM naturais, a pentraxina CRP, as colectinas ou a via alternativa.

A resposta inflamatória é a primeira fase da resposta imune inata (Figura 2), e tem sido estudada com diversos agentes infecciosos e traumáticos (Stadnyk & Gauldie, 1991), mas pouco com *T. cruzi*. Macrófagos e mastócitos são as principais células efetoras inflamatórias residentes nos tecidos. Além destas, as células intersticiais do estroma conjuntivo (fibroblastos) e as células endoteliais dos vasos sanguíneos das regiões afetadas, compõem o universo celular responsável pela orquestração da resposta inflamatória e pelo recrutamento de células inflamatórias circulantes como linfócitos, neutrófilos, eosinófilos, basófilos e plaquetas. Estas últimas são provavelmente as geradoras dos primeiros sinais para a ativação de macrófagos tissulares, quimiocinas PF4 e β TG e a citocina TGF- β , secretados por plaquetas que ativam macrófagos a secretar as duas primeiras citocinas pró-inflamatórias,

IL-1/TNF- α , e os fatores de crescimento PDGF e FGF, que atuam sobre as células intersticiais do estroma do tecido lesado. Dessa ativação de plaquetas, monócitos, mastócitos e fibroblastos derivam a amplificação da resposta local e a montagem de uma resposta sistêmica. A resposta local constitui-se de um aumento de permeabilidade vascular causado principalmente por aminas vasoativas, óxido nítrico (NO), prostaglandinas e leucotrienos, ativação do endotélio vascular e de células do estroma, causada por IL-1 e TNF, com aumento de expressão e da funcionalidade de diversas moléculas de adesão e liberação de estímulos quimiotáticos (leucotrienos -LTB₄- e quimiocinas como IL-8 e MCAF), para a marginação vascular de neutrófilos, linfócitos e monócitos. A resposta sistêmica constitui-se de uma ação de IL-1, IL-6, TNF e prostaglandinas ao nível do sistema nervoso central, levando à febre, à produção de cortisol, de IL-1, IL-6 e TNF ao nível hepático, estimulando a resposta de fase aguda, dos fatores estimuladores de colônias (GM-CSF e G-CSF) e de IL-3 ao nível da medula óssea para aumento do número de leucócitos e, finalmente, pelo efeito de IL-1 e IL-6 na inicialização da resposta imune por células B e T.

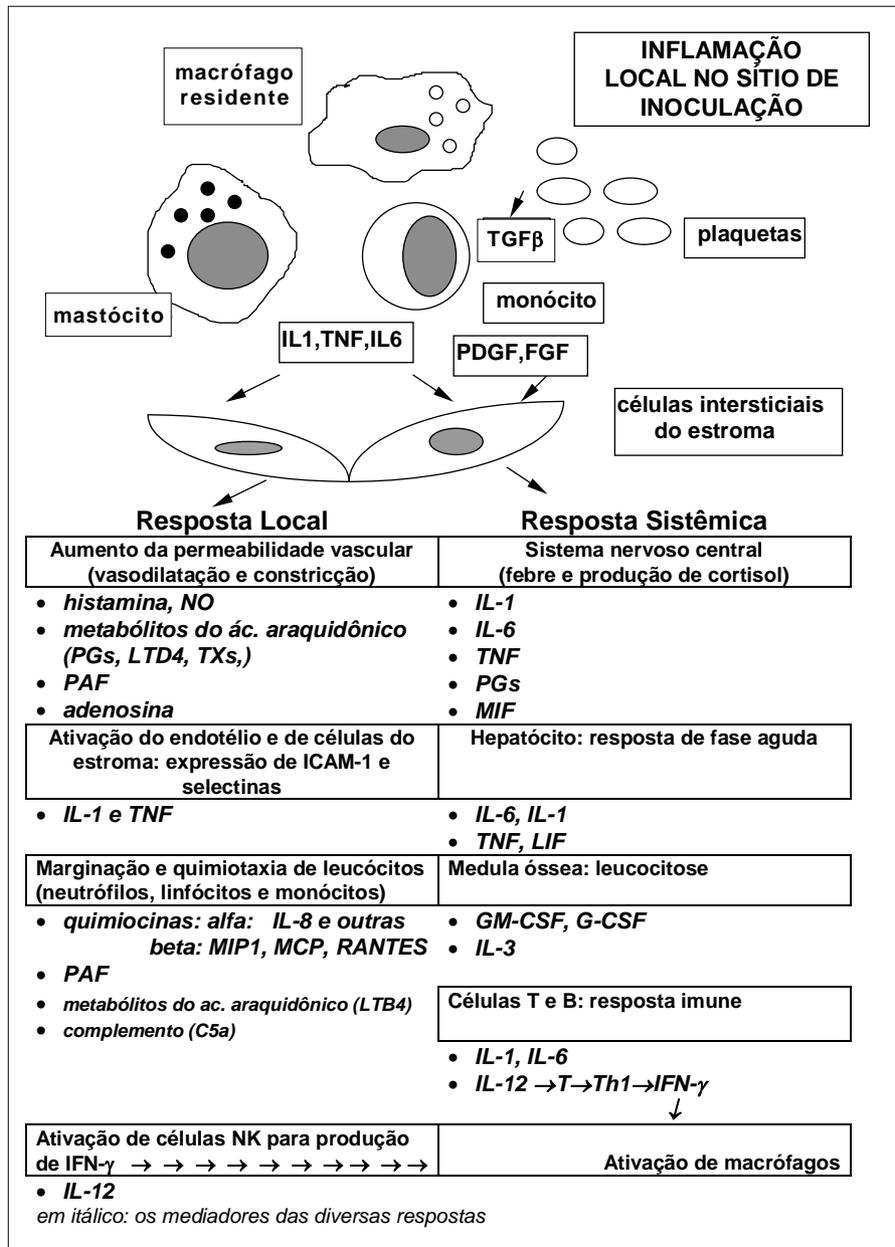


Figura 2 – Células e mediadores envolvidos na resposta de fase aguda

4.1.3 A Resposta Imune Inata na Doença de Chagas

Existem poucos estudos sobre a resposta inflamatória imediata à inoculação subcutânea com *T. cruzi*, protótipo da infecção natural ou acidental. Além disso, a infecção por via vetorial ocorre, provavelmente, mais por via da mucosa ocular do que por via subcutânea, posto que o *T. cruzi* não está presente na saliva e sim nas fezes que o triatomíneo deposita na região onde lesou um vaso sanguíneo para seu repasto.

Num sítio de inoculação intradérmico, provavelmente as plaquetas são as primeiras sinalizadoras para a inflamação. O processo de invasão de macrófagos e células não fagocíticas é bastante complexo, envolvendo mecanismos ativos e passivos, tanto por parte do parasita quanto da célula-alvo, bem como numerosos componentes da membrana de ambos (revisto em Araújo-Jorge et al., 1992a e em Burleigh & Andrews, 1995). Após vários ciclos reprodutivos, as formas amastigotas sofrem diferenciação para tripomastigotas, que são liberados após ruptura da célula, podendo invadir células vizinhas ou serem levados a outros tecidos pela corrente sanguínea; por isso a parasitemia não é detectável nos primeiros sete a dez dias de infecção, quando a proliferação parasitária ainda está restrita à lesão de porta de entrada. Num estudo de infecção acidental, a parasitemia foi detectada apenas 33 dias após a infecção (Hofflin et al., 1987). O chagoma de inoculação cutânea é a primeira reação observada no mamífero após o contato com as formas infectantes e lembra uma reação tipo hipersensibilidade retardada (Romaña, 1943). Após o início da disseminação por circulação sanguínea ou linfática, quando um a dois parasitas já podem ser observados numa gota de sangue periférico, há uma fase rápida de expansão parasitária (fase ascendente rápida da parasitemia) devida sobretudo à proliferação em macrófagos de baço e fígado. Essa fase é logo em seguida refreada pela ação eficiente de uma resposta específica mediada por células T (ver item 4.2).

4.1.3.1 Citocinas pró-inflamatórias e moléculas de adesão na fase aguda

Alguns estudos já abordaram as variações e o papel das citocinas IL-1, IL-6, TNF- α e TGF- β , principais orquestradoras da resposta inflamatória durante a infecção experimental por *T. cruzi* (Tarleton, 1988, 1990; Russo et al., 1989; Russo & Starobinas, 1991; Starobinas et al., 1991; Silva et al., 1991, 1995; Truyens et al., 1994; Zhang & Tarleton 1996; Laucella et al., 1996). Todas são detectáveis, aumentam rapidamente, geralmente precedem de uma semana o aumento da parasitemia, elevam-se cerca de dez vezes mais que o normal entre o 14^o e o 17^o dias, a depender do inóculo utilizado, e decaem posteriormente para valores três a cinco vezes os iniciais, normalizando-se após quarenta dias de infecção. A produção de TNF- α por camundongos C57BL/6 pode ser induzida mesmo utilizando-se parasitas fixados como estímulo (Tarleton, 1988). Os níveis de parasitemia não necessariamente se correlacionam com o nível de produção de TNF- α (Russo et al., 1989). Além disso, a susceptibilidade de uma linhagem a um certo isolado de *T. cruzi* parece ser o resultado do conjunto de interações que ocorrem via rede de citocinas, e não do efeito isolado de uma delas, pois em diferentes combinações camundongo/parasita são detectadas produções de todas as citocinas citadas, com pequenas variações de cinética (Zhang & Tarleton, 1996).

A produção de IFN- γ , TNF- α , IL-1- α e IL-6 por camundongos Balb/C infectados com duas diferentes cepas de *T. cruzi* (Tulahuen e CA-1) foi estudada, tanto no baço, como no coração (Laucella et al., 1996). O interessante é que no coração há intenso aumento da produção de todas as citocinas testadas, que em alguns casos chega a ser maior do que no baço. Estes autores também analisaram os níveis da molécula de adesão ICAM-1e mostraram que, como previsto pela presença de citocinas inflamatórias, foi possível a detecção de níveis elevados de ICAM-1 solúvel, bem como de expressão aumentada de ICAM-1na superfície de células. Essa molécula é fundamental para o extravasamento de células inflamatórias nos sítios de lesão, mediando o reconhecimento dos leucócitos com o endotélio pela interação de ICAM-1 com a integrina LFA-1.

4.1.3.2 Ativação inespecífica de macrófagos

Os macrófagos têm um papel essencial nas infecções. Secretam uma vasta gama de mediadores químicos e de citocinas que podem regular a resposta T emergente (funções endócrinas e parácrinas). Adquirem, processam e apresentam antígenos para células T e B, e são uma fonte de moléculas co-estimulatórias para a ativação dessas células. Uma vez sensibilizados (“primados”) por citocinas, eles podem se desenvolver em células ativadas para uma atividade efetora citotóxica deflagrada por citocinas (como IFN- γ e TNF- α) ou outros co-sinais, como LPS ou produtos do alvo. Secretam então muitos produtos com atividade microbicida (metabólitos reativos de nitrogênio e de oxigênio, lisozimas e citocinas citotóxicas como TNF- α), efetivos a depender da susceptibilidade do alvo.

Um trabalho clássico de Hoff, em 1975, mostrou a cinética de ativação de macrófagos *in vivo*, em camundongos C3H infectados com *T. cruzi*. Os macrófagos peritoneais se tornavam resistentes à infecção *in vitro* apenas 21 dias após a infecção, no final da fase ascendente da parasitemia. Mostrou também que as curvas de parasitemia dos animais infectados não se modificavam em indivíduos imunizados com BCG ou com *Listeria monocytogenes*, mas eram reduzidas em animais previamente imunizados com formas epimastigotas de *T. cruzi*. No ano seguinte, Brener & Cardoso (1976) mostraram que a imunização com *Corynebacterium parvum* reduzia a parasitemia e retardava a mortalidade de camundongos inoculados com altas doses de *T. cruzi*. Em 1977 uma série de trabalhos de Nogueira (Nogueira et al., 1977a,b) mostraram que tanto a imunização com epimastigotas como com BCG pode ativar macrófagos a exercerem atividade fagocítica e citotóxica contra *T. cruzi in vitro*, e que nesses casos já na primeira semana pós-infecção era possível detectar a ativação dos macrófagos. *Portanto, se a ativação inespecífica de macrófagos pelo BCG for eficiente, pode contribuir para a resistência à infecção.*

A julgar pelo aumento da expressão de moléculas de MHC classe II, *a cinética de ativação de macrófagos depende do número de parasitas inoculados e da via de inoculação*. A porcentagem de macrófagos Ia+ aumenta de três para cem em oito dias após um inóculo intraperitoneal de 10^5 parasitas, mas apenas após 12 dias com o mesmo inóculo intradérmico, e após 28 dias com um inóculo ID de 10^2 parasitas (Behbehani et al., 1981). O curso temporal da ativação de macrófagos *in vivo* acompanha o aumento nos níveis IFN- γ , a principal citocina responsável pela ativação. Outras citocinas como GM-CSF, M-CSF e TNF- α também podem contribuir sinergicamente ao efeito do IFN- γ . Estudos mais recentes mostraram que as citocinas IFN- γ , e TNF- α são as principais mediadoras dessa ativação de macrófagos (ver Capítulo 4.4) e que IFN- γ e IL-12 compõem um sistema autócrino de *feed-back* positivo que amplifica os níveis de IFN- γ para ativação de macrófagos e de IL-12 para produção e ativação de células NK e Th1.

4.1.3.3 A resposta de fase aguda

A resposta de fase aguda é o nome dado para um padrão característico de alterações metabólicas que ocorrem em resposta a diferentes formas de infecção, inflamação ou danos tissulares (Koj, 1984). Estas mudanças metabólicas incluem leucocitose, diminuição da concentração plasmática de zinco e ferro, aumento da concentração de cobre, aumento do catabolismo protéico e gliconeogênese, aumento da síntese protéica total e febre, entre outros. Os níveis de complemento aumentam (Scharfstein et al., 1982), mas animais deficientes no componente C5 do complemento desenvolvem curso normal de parasitemia e apresentam níveis similares de mortalidade a animais com o sistema complemento funcionando (Dalmasso & Jarvinen, 1980). Além disso, tripomastigotas são resistentes à ativação direta da via alternada do complemento, por possuírem molécula com atividade similar que apresenta *decay accelerating factor* humano (DAF, CD55) (Norris et al., 1991). O complemento pode também ser ativado por pentraxinas, como CRP, ou por colectinas, como *mannose-binding protein* (MBP). No entanto o *T. cruzi* apresenta um antígeno de superfície que mimetiza CRP humana, a julgar pela capacidade de interagir com anticorpos poli- e monoclonais anti CRP humana (Coutinho et al., 1998), que pode também contribuir para o escape do parasita aos efeitos do sistema complemento. Quanto à possível participação da MBP, que reconhece padrões de manoses comumente

expostos na superfície dos microorganismos, ela não reconhece formas tripomastigotas, contribuindo, desse modo, possivelmente, para o escape à lise por complemento na fase inicial da infecção (Kahn et al., 1995). Já as formas amastigotas se ligam à MBP, através de glicoproteínas de superfície, da família SA85 (Kahn et al., 1996).

Durante a inflamação, há um grupo bem definido de proteínas, conhecidas como proteínas de fase aguda, cujos níveis plasmáticos aumentam. Entre elas temos: (a) proteína C reativa (CRP), que funciona como uma opsonina não específica para aumentar a fagocitose de bactérias; (b) α -2-macroglobulina (A2M) e outros inibidores de proteases; (c) proteína fibrinogênio da coagulação; (d) proteína amilóide do soro (SAP); (e) haptoglobina; (f) fibronectina solúvel (Fn). A maioria das alterações nas concentrações plasmáticas pode ser diretamente atribuída a alterações nos níveis de síntese dessas proteínas plasmáticas por hepatócitos, que por sua vez são regulados primariamente por IL-1 /TNF- α e por IL-6.

Até o presente, pouco se sabe a respeito do papel dos elementos da resposta de fase aguda na doença de Chagas. Do conjunto de proteínas de fase aguda apenas três foram estudadas em camundongos: SAP, A2M e Fn.

A SAP aumenta drasticamente no plasma de camundongos C57BL/6, em paralelo ao aumento da parasitemia, dependendo do inóculo utilizado (Scharfstein et al., 1982; Luz et al., 1994). Já em camundongos C3H seus níveis não se alteram em resposta à infecção (Luz et al., 1994), e em camundongos Balb/C aumentam, mas muito menos do que em C57BL/6 (Luz et al., 1994; Truyens et al., 1994). Crianças na fase aguda da doença de Chagas também apresentam uma resposta heterogênea quanto à elevação de CRP (o homólogo da SAP de camundongos), com predomínio de aumento (Medrano-Mercado et al., 1996a). Sabe-se que a CRP ativa complemento, atua como um opsonizante e ativa macrófagos e neutrófilos (revisto em Steel & Whitehead, 1994). Os componentes C3 e C4 do complemento também aumentam na fase aguda da infecção experimental (Scharfstein et al., 1982).

Tanto camundongos como crianças infectadas apresentaram níveis elevados de α -macroglobulinas, inibidores fisiológicos de proteinases, durante a fase aguda (Luz et al., 1994, 1995; Medrano-Mercado et al., 1996a,b). O aumento do nível de A2M é mais significativo nas crianças assintomáticas do que naquelas sintomáticas, que se encontravam hospitalizadas no momento da colheita do soro (Medrano-Mercado et al., 1996b). Camundongos Balb/C que sobreviveram à infecção aguda apresentaram níveis mais elevados de A2M plasmática comparável àqueles que morreram (Araújo-Jorge et al., 1992b). No entanto, tal como para SAP também é grande a heterogeneidade observada nos animais e em humanos quanto à elevação dos níveis de A2M (Luz et al., 1994, 1995; Medrano-Mercado et al., 1996b). Como é conhecido o envolvimento de proteinases de *T. cruzi* em eventos moleculares ligados à sua interação com células hospedeiras (revisto em Araújo-Jorge et al., 1992a), o efeito de A2M nesse processo foi estudado *in vitro* e mostrou-se que A2M pode inibir a invasão de macrófagos e fibroblastos por parasitas das cepas Y, Colombiana e CL, possivelmente devido à sua ação inibidora sobre proteinases. Além disso, a pré-incubação de macrófagos peritoneais residentes com A2M resulta em um aumento na endocitose e na destruição celular de tripomastigotas da cepa Y. Um papel potencialmente importante e ainda pouco explorado da AM é sua atividade como carreadora de citocinas (revisto em Borth, 1992 e em Legrés et al., 1994). Esta ligação resulta na redução de atividade dessas citocinas, ou no aumento de sua meia-vida. A2M liga-se a TGF- β , TNF- α , IL-1, IL-2 e IL-6.

Finalmente, foi demonstrado que também a Fn apresenta níveis ligeiramente elevados na fase aguda da infecção experimental (Truyens et al., 1995), resultado encontrado também em crianças chagásicas na fase aguda (Antas, 1996). Em ambos os casos foi mostrado que há elevação dos níveis de anticorpos anti Fn. Estudos *in vitro* sugerem que Fn tenha papel como adjuvante na penetração do parasita nas células do hospedeiro vertebrado (Wirth & Kierszenbaum, 1984; Ouaiissi et al., 1985), e que anticorpos anti Fn podem ter efeito “protetor” na infecção (Ouaiissi 1988). Apesar desse conjunto de dados, ainda não foi esclarecido o real papel que essas proteínas de fase aguda apresentam *in vivo* na infecção.

4.1.4 Atividade de Células NK e de Células T $\gamma\delta$

Quando ativadas, as células NK cumprem duas funções primordiais: sintetizar IFN- γ e lisar alvos reconhecidos por seus receptores. Um dos sistemas de ativação das células NK é a interação. Na década de 80 foi observado um aumento de atividade NK no baço de animais C57BL/6 e C3H infectados experimentalmente (Hatcher et al., 1981), bem como a indução de atividade citotóxica em macrófagos peritoneais. Essa atividade pode ser verificada tanto utilizando-se parasitas vivos como mortos por calor. Com base em seus resultados, os autores discutiram que não havia indícios de que células NK desempenhassem um papel direto na proteção durante a infecção por *T. cruzi*. A administração de indutores da atividade NK, como o ácido poliinosino-citidílico (Hatcher & Kuhn, 1982), gera células NK com atividade tripanocida. Do mesmo modo, a administração de tilerone (James et al., 1982), indutor de atividade NK, aumenta a resistência à infecção. No entanto, o papel-chave das células NK como secretoras de IFN- γ e participantes da resistência do hospedeiro à infecção por *T. cruzi* foi recentemente demonstrado (Silva et al., 1995), especialmente quando da sua depleção *in vivo* por anticorpos anti NK (ver item 4.4).

Já a subpopulação de linfócitos T $\gamma\delta$ pode ser ativada por antígenos contendo prenil-pirofosfato (componentes de membranas de microorganismos envolvidos na ligação de carboidratos), e não precisam de processamento intracelular ou de associação com produtos MHC. Secretam IFN- γ e TNF α e induzem a diferenciação de células Th1. Seu número aumenta bastante durante a infecção (Minoprio et al., 1989). Essas células podem modular a parasitemia em certos modelos (Cardillo et al., 1993) e a inflamação característica da miocardite aguda (Santos-Lima & Minoprio, 1996).

4.1.5 Regulação da Resposta Imune Inata

Há muitas evidências de que a resposta imune inata se auto-regula, reduzindo a ativação de macrófagos e a produção local de óxido nítrico (NO). Em excesso, altos níveis de TNF- α , de IFN- γ e de NO podem ser extremamente prejudiciais ao próprio hospedeiro (Hunter et al., 1997; Meyer zum Buschenfelde et al., 1998). Assim, nas situações experimentais de resolução da fase aguda, tanto a resposta imune adquirida, específica anti *T. cruzi*, como o controle da ativação da resposta inata têm um papel decisivo (ver item 4.3). As citocinas responsáveis por essa “desativação” são IL-10 e TGF- β , cuja síntese aumenta. IL-10 começa a ser detectada três semanas após a infecção em Balb/c, tanto com cepa virulenta como atenuada de *T. cruzi* (Revelli et al., 1999) e apresenta maiores níveis séricos, justamente no modelo mais resistente, sem lesão tissular. A produção de IL-10 é necessária para controlar os efeitos inflamatórios letais de citocinas tipo 1 produzidas durante a infecção (Hunter et al., 1997) e camundongos resistentes apresentam maior produção de IL-10 quando comparados com susceptíveis (Zhang & Tarleton, 1996). O declínio da síntese de TNF- α , NO e IL-13, medidos por detecção do mRNA por RT-PCR no tecido cardíaco (Powell et al., 1998) é mais rápido num modelo experimental resistente do que num susceptível à infecção.

Esse conjunto de evidências e estudos são claros indicativos de que a resposta imune inata é ativa durante a infecção por *T. cruzi*, colabora para o estabelecimento da resposta imune específica e, dependendo da regulação homeostática de seus componentes efetores, pode ser decisiva para o estabelecimento de resistência ou susceptibilidade à fase aguda, bem como ao desenvolvimento posterior de patologia associada à fase crônica da infecção.



4.2

A Resposta Imune Celular na Infecção Experimental por *Trypanosoma cruzi*

George A. Dos Reis

A infecção experimental de camundongos por *Trypanosoma cruzi* induz a uma série de alterações no sistema imune: imunossupressão, ativação policlonal linfocitária e hiperprodução de imunoglobulinas (Igs), além de resultar na persistência indefinida do parasita nos tecidos do hospedeiro e na lesão dos tecidos nervoso e cardíaco (revisto em Brener, 1994 e em Dos Reis & Lopes, 1999). Estas características em muitos aspectos mimetizam a infecção humana conhecida como doença de Chagas ou tripanosomíase americana. O camundongo constitui o principal modelo experimental disponível para o estudo dos mecanismos patogênicos e imunoprotetores relacionados à infecção chagásica, com a ressalva de que será sempre necessário verificar a validade das observações descritas através da sua ocorrência em humanos infectados. A discussão aqui apresentada não tenciona rever os dados já publicados, mas sim discutir alguns aspectos controversos sobre o tema que permanecem por ser esclarecidos.

4.2.1 A Resposta Imune: Proteção e Lesão

Como outros microorganismos patogênicos intracelulares, o *T. cruzi* é capaz de infectar o hospedeiro mamífero vertebrado, resistindo indefinidamente ao ataque da resposta imune. Esta no entanto, após um período de imunossupressão e ativação policlonal generalizada, torna-se capaz de controlar o nível de parasitismo nos tecidos. Segundo a tendência atual mais aceita, é o controle imunológico da carga parasitária nos tecidos que gera mecanismos de lesão tecidual progressiva (Tarleton, 1995). No entanto, não está descartado que mecanismos imunológicos de auto-reconhecimento disparados pelo processo infeccioso também possam ter um papel adicional na patogênese das lesões observadas (Ribeiro dos Santos et al., 1992). O nível de conhecimento obtido sobre a imunidade celular contra o parasita, apesar de sofisticado em alguns casos, é descritivo. Os mecanismos de persistência do *T. cruzi*, e a natureza das alterações imunológicas que permitem esta persistência são amplamente ignorados, devido às limitações do conhecimento atual sobre imunorregulação.

Diferentes grupos de pesquisa, utilizando diferentes isolados de *T. cruzi* e diferentes linhagens isogênicas de camundongo, estão estudando aspectos da imunidade inata e da imunidade adquirida contra o parasita, geralmente baseados na produção de diferentes citocinas regulatórias da resposta imune. Numerosas evidências recentes indicam um papel importante da imunidade inata, não só como primeira linha de defesa do hospedeiro, mas também no direcionamento instrutivo da qualidade da resposta imune adquirida subsequente (Fearon & Locksley, 1996). Vários estudos demonstraram um importante papel de células NK (*natural killer*) na defesa inicial contra a infecção por *T. cruzi* (Cardillo et al., 1996), cuja função protetora está ligada

à produção da citocina IFN- γ por estas células. Esta citocina tem um papel protetor inicial na infecção chagásica (Reed, 1988), presumivelmente devido à sua capacidade de ativar a produção de metabólitos do óxido nítrico (NO), com atividade tripanocida em macrófagos infectados (Gazzinelli et al., 1992). Por outro lado, a ativação intensa de células NK parece dependente da produção da citocina IL-12, além de TNF- α , por macrófagos infectados pelo *T. cruzi* (Aliberti et al., 1996). Já foi amplamente demonstrado que a produção local de IL-12 e IFN- γ por mecanismos inatos de defesa facilita a indução subsequente de células T CD4 específicas para antígeno com o fenótipo secretório de células Th1. Esta deve ser a razão pela qual uma onda de ativação de células Th1 ocorre primeiro na infecção chagásica, predominando no início da fase aguda (Zhang & Tarleton, 1996).

Ainda durante a resposta imune inata, ocorre produção das citocinas regulatórias IL-10 (Reed et al., 1994) e TGF- β (Silva et al., 1992), com uma cinética mais retardada em relação ao IFN- γ . Estas citocinas, entre outros mecanismos, antagonizam a ação ativatória do IFN- γ ao nível da resposta dos macrófagos teciduais a esta citocina. Tanto macrófagos (Reed et al., 1994) como células B CD5 (Minoprio et al., 1993) podem produzir IL-10, e é possível que esta produção seja necessária para minimizar os efeitos tóxicos causados por uma grande produção das citocinas inflamatórias IL-12 e IFN- γ . As células B CD5 correspondem a uma subpopulação “primitiva” de linfócitos B, com algumas características semelhantes a macrófagos, apesar de reorganizarem os genes de Ig (Hardy et al., 1994). As Igs formadas reconhecem, em geral, determinantes antigênicos localizados em antígenos polissacarídicos únicos de microorganismos, e a ativação destas células requer citocinas que podem aparentemente ser supridas por células NK como células auxiliaadoras (Snapper & Mond, 1996). A maior resistência de animais deficientes de células B CD5 à infecção chagásica foi atribuída a uma maior produção de IFN- γ e à reduzida produção de IL-10 neste caso (Minoprio et al., 1993). Também as células T $\gamma\delta$, uma linha de defesa intermediária entre a resposta inata e a adquirida, e que reconhecem um grupo restrito de determinantes antigênicos comuns a vários microorganismos, podem modular a parasitemia e o grau de lesão tecidual na infecção chagásica (Cardillo et al., 1993).

A resposta imune inata tem um papel inicial importante na defesa anti *T. cruzi*, controlando parcialmente a infecção. Animais geneticamente deficientes de respostas adquiridas (animais RAG *knockout* cujos linfócitos não fazem rearranjo gênico) controlam a infecção tão bem como animais normais durante a primeira semana de infecção, perdendo, a seguir, o controle da parasitemia, enquanto animais normais conseguem resolvê-la (Abrahamsohn & Coffman, 1996). A resposta imune adquirida, mediada por linfócitos T CD4 e CD8 convencionais (TCR $\alpha\beta$) e pelos anticorpos produzidos por células B convencionais, é absolutamente essencial para o controle da parasitemia e para a sobrevivência do hospedeiro. Estes dados foram obtidos infectando-se camundongos deficientes na expressão de moléculas de histocompatibilidade classe I ou classe II, deficientes em células T CD8 ou CD4 maduras, respectivamente (Tarleton et al., 1992; Rottenberg et al., 1993). Os animais são altamente susceptíveis à morte pela infecção. Existe ainda uma correlação entre o grau de lesão tecidual e a imunocompetência do hospedeiro na fase aguda. Os animais deficientes em células T CD8 ou CD4 apresentam alta carga parasitária nos tecidos, mas pouca ou nenhuma lesão tecidual (Tarleton et al., 1992, 1995). Estes dados sugerem que a lesão tecidual é consequência inescapável do processo de controle do parasitismo tecidual por linfócitos efetores competentes (Tarleton, 1995). A necessidade de células T CD4 na defesa poderia estar relacionada com a ativação imunológica de macrófagos infectados e com a destruição intracelular de parasitas por células do tipo Th1, produtoras de IFN- γ e, no caso de células Th2, com a indução da produção de anticorpos líticos protetores (Brenner, 1986). Um estudo recente demonstrou a existência de uma onda de atividade Th1 na infecção chagásica que posteriormente se extingue, dando lugar a uma onda de atividade Th2 que persiste durante a infecção crônica (Zhang & Tarleton, 1996). O mecanismo de inativação das células Th1 não está claro, podendo derivar da indução de anergia clonal ou de morte celular programada. Por último, a necessidade de células T CD8 na defesa deve estar relacionada com a capacidade do parasita de infectar qualquer tipo celular do hospedeiro, incluindo células que não expressam MHC classe II, apenas MHC classe I. Neste caso, a defesa anti *T. cruzi* deve estar relacionada com a atividade citotóxica de efetores do tipo T CD8. No entanto, o estudo deste importante

aspecto da resposta imune celular tem sido prejudicado pela inexplicável dificuldade de se demonstrar e isolar células T CD8 citotóxicas específicas para antígenos do parasita. Foi demonstrado que células T CD8 da infecção chagásica sofrem um processo de morte celular por apoptose espontânea quando explantadas imediatamente de animais infectados (Lopes et al., 1995), o que poderia ter relação com a dificuldade de isolar células funcionais viáveis nesta infecção.

Vários estudos identificaram a presença de uma etapa de imunossupressão generalizada *in vitro* de linfócitos T (Harel-Bellan et al., 1985) e foi sugerido que esta etapa é crítica para o escape e persistência do parasita nos tecidos (Kierszenbaum, 1981). Estudos recentes apontam para dois mecanismos distintos de imunossupressão: um mediado por produtos de macrófagos ativadas, e outro mediado por um programa de morte programada induzida por ativação pelo TCR da célula T. Confirmando estudos anteriores, uma investigação recente identificou um mecanismo de supressão de células T CD4 na infecção aguda por *T. cruzi* mediado por células aderentes/macrófagos (Abrahamshon & Coffman, 1995). Neste trabalho, contudo, foi demonstrado que após ativação linfocitária, a produção exacerbada de IFN- γ levou também à produção de radicais de NO por macrófagos, que inibiram a proliferação celular de linfócitos T (Abrahamshon & Coffman, 1995). Portanto, este mecanismo resulta de respostas Th1 exacerbadas que culminam com a produção de mediadores tóxicos por macrófagos ativados. Utilizando um modelo de infecção de baixa virulência, com formas metacíclicas de *T. cruzi*, outros estudos identificaram um defeito intrínseco na ativação de células T CD4 via o receptor antigênico (TCR), mas não através da via alternativa de ativação mediada pelo antígeno CD69 (Lopes & Dos Reis, 1994, 1996). Neste modelo, não se encontrou evidência de anergia nas células T (Lopes & Dos Reis, 1996), mas o defeito intrínseco foi identificado como morte programada induzida por ativação, levando à apoptose linfocitária (Lopes et al., 1995). Neste estudo, células T CD8 morriam espontaneamente por privação de fatores (exaustão clonal?), mas não morriam após ativação (Lopes et al., 1995). A morte por ativação de células T CD4 parece ser um fenômeno imunorregulatório decorrente da extensa ativação policlonal, e causa supressão das respostas proliferativas *in vitro*, estando ausente quando a ativação se processa por vias alternativas como CD69 e Ly-6 (Lopes & Dos Reis, 1996). Em conjunto, estes estudos indicam a operação de mecanismos supressores distintos, possivelmente atuando em fases distintas da infecção. A imunorregulação de células T CD8 na infecção permanece pouco entendida.

Os dados discutidos aqui revelam um avanço significativo na compreensão da patogênese da infecção chagásica. No entanto, as várias lacunas existentes ainda não permitem estabelecer com clareza as anomalias imunológicas que resultam na cronificação da infecção. Animais geneticamente alterados em determinadas vias moleculares de regulação imunológica (como citocinas, receptores sinalizadores de apoptose e proteínas protetoras contra a exaustão clonal) serão ferramentas importantes para dissecar estes processos *in vivo*. Também faltam modelos adequados para definir os mecanismos imunopatogênicos de lesão do tecido cardíaco, e resolver se esta é primariamente causada pela presença do parasita, ou por linfócitos T auto-reativos, sensibilizados durante o processo agudo de ativação policlonal. Uma última fronteira pouco explorada é a identificação de moléculas e mecanismos utilizados pelo parasita para subverter local e sistemicamente a imunidade celular. Nesta linha situam-se os trabalhos recentes de identificação do TIF (fator imunossupressor de tripomastigotas) (Majunder & Kierszenbaum, 1996), e do glicoinositol fosfolípídeo (GIPL) de *T. cruzi* (Gomes et al., 1996) como moléculas capazes de bloquear respostas imunes celulares do hospedeiro.



4.3

A Resposta Imune Humoral e As Funções do Linfócito B na Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Maria Teresa Rivera

A forma aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* se caracteriza por uma intensa multiplicação parasitária. A parasitemia aumenta rapidamente, associada à morte de um certo número de indivíduos. Naqueles que sobrevivem, o controle da infecção se traduz por uma diminuição progressiva da parasitemia, que se tornará praticamente indetectável na forma crônica da infecção. Os parasitos circulantes não são eliminados completamente, apesar de o hospedeiro parasitado na fase crônica ter se tornado resistente a uma nova infecção.

A infecção por *T. cruzi* apresenta, assim, o paradoxo encontrado freqüentemente nas relações parasita-hospedeiro, ou seja, a persistência de uma população parasitária no hospedeiro imune. Além disso, a infecção acarreta uma desregulação do sistema imune, com uma ativação policlonal dos linfócitos B e T, um certo grau de hipergamaglobulinemia e um estado de imunossupressão, que são, provavelmente em parte, a origem da patologia da doença de Chagas.

4.3.1 A Ativação Policlonal dos Linfócitos B

No camundongo infectado pelo *T. cruzi* ocorre logo uma ativação policlonal de células B na fase aguda, que persiste na fase crônica (D'Imperio Lima et al., 1985, 1986; Minoprio et al., 1986a). Esta ativação causa uma hipergamaglobulinemia poliisotípica importante e reversível, sendo caracterizada por um aumento considerável de imunoglobulinas e uma resposta específica ao parasita, que também é poliisotípica e estável. Nesta resposta se detectam altas concentrações de IgG2a e IgG2b entre os anticorpos anti *T. cruzi*, e IgG2a entre os anticorpos inespecíficos (Spinella et al., 1992; El Bouhdidi et al., 1994), podendo esse isotipo atingir 50% das imunoglobulinas totais do soro (Hontebeyrie-Joskowicz, 1994). Esta ativação policlonal foi bem demonstrada no modelo murino da doença de Chagas, porém na infecção humana ainda não está totalmente estabelecida (Kierszenbaum & Szein, 1994). Existem, no entanto, os seguintes relatos indicativos de sua ocorrência em humanos: (1) num caso de infecção acidental em laboratório foi estudado o curso da produção de imunoglobulinas específicas anti *T. cruzi*, bem como de imunoglobulinas dirigidas para auto-antígenos (Grauert et al., 1993); foi demonstrada hipergamaglobulinemia precoce desde 17 até 66 dias (máxima em trinta dias) após a infecção, quando a parasitemia se tornou subpatente, de IgM e IgG, de caráter poliisotípico (IgA, IgM e IgG), e também com elevados níveis de auto-anticorpos IgM e das subclasses de IgG; (2) foi demonstrado que pacientes chagásicos crônicos apresentam na circulação uma alta freqüência de células ativadas (Dutra et al., 1994), tanto B como T, características de condições patológicas com respostas auto-ímmunes, hiperímmunes e policlonais, e que esta ativação se mantém mesmo após a cura

parasitológica (Dutra et al., 1996). Recentemente foi identificado um antígeno de *T. cruzi* de 24 kDa com capacidade de ativação policlonal de células B (Silva et al., 1998), que utilizada para sorologia em ELISA correlaciona-se aos resultados obtidos com o método de detecção de anticorpos líticos (Krautz et al., 1994; Taibi et al., 1995).

4.3.2 A Função das Células B CD5

As células B CD5 constituem uma população de linfócitos B, presentes principalmente durante a vida fetal, que participam da seleção dos linfócitos maduros (Minoprio et al., 1989). Estas células aumentam consideravelmente durante a infecção por *T. cruzi*, e assim poderiam estar implicadas nas reações auto-imunes associadas à doença de Chagas (Minoprio, 1991). Em pacientes crônicos também foi demonstrada alta frequência de células B CD5 (Dutra et al., 1996). Camundongos geneticamente deficientes em linfócitos B CD5 (mutação Xid) controlam a parasitemia de modo mais eficaz, não apresentando alterações no estado geral (caquexia) e desenvolvendo somente poucas lesões inflamatórias no início da fase crônica da infecção. Além disso, produzem níveis menores de imunoglobulinas tanto não específicas (policlonais) como anticorpos específicos anti *T. cruzi* (dez vezes menores do que nos animais sem mutação) (Minoprio et al., 1993). Estas informações sugerem que as células B CD5 estão implicadas na maturação das células B seja diretamente, ou aumentando a atividade dos linfócitos CD4 Th2; no camundongo Xid, a deficiência em linfócitos B CD5 poderia produzir uma inibição das células CD4 Th2 e uma ativação das células CD4 Th1 (Hontebeyrie-Joskowics, 1991), aumentando assim a resistência à infecção por *T. cruzi*. Em conclusão, as células B CD5 permitiriam uma forte ativação das células B convencionais com uma produção dos isotipos IgG2a e IgG2b, acarretando lesões inflamatórias e auto-imunes associadas com a doença de Chagas (Minoprio et al., 1991).

4.3.3 A Produção dos Anticorpos Específicos anti *T. cruzi*

A investigação de anticorpos anti *T. cruzi* por meio de diferentes técnicas é a base do diagnóstico imunológico da doença de Chagas (Brenière et al., 1985; Carlier et al., 1985; Brener & Krettlí 1990; Tanowitz et al., 1992). Na infecção experimental, a resposta específica é poliisotípica com um predomínio dos anticorpos IgG2a, IgG2b e IgM (Spinella et al., 1992; El Bouhdidi et al., 1994).

Um trabalho clássico no estudo dos mecanismos humorais de proteção demonstrou que, associados ao estado de proteção do hospedeiro, estavam apenas os anticorpos reativos contra formas vivas de tripomastigotas (e não formas fixadas ou extratos e frações celulares), que podiam mediar nestas a lise por complemento (Krettlí & Brener, 1982). Essa linha de investigação firmou o conceito de anticorpos anti *T. cruzi* líticos, reativos apenas contra formas vivas do parasita, e que decaem quando ocorre cura parasitológica após terapia tripanocida (e proposto como critério de cura parasitológica), e anticorpos anti *T. cruzi* convencionais, capturáveis com antígenos de parasitas fixados, extratos ou frações. Um polipeptídeo de 160 kDa da superfície dos tripomastigotas foi identificado como alvo para os anticorpos protetivos (Martins et al., 1985), e posteriormente foi clonado um antígeno de 160 kDa (gp160) que é capaz de induzir a síntese de anticorpos líticos e que apresenta homologia com o DAF (CD55) humano (Norris et al., 1991).

O papel protetor dos anticorpos foi bem estudado no modelo camundongo (Kagan & Norman, 1961; Kierszenbaum & Howard, 1976). Estes anticorpos aparecem a partir da terceira semana de infecção (Krettlí & Brener, 1976) e participam da eliminação dos parasitas circulantes (Kipnis et al., 1981; Umekita et al., 1988).

Diferentes experiências evidenciam sua função protetora:

- a parasitemia e a mortalidade são muito mais elevadas em camundongos que são, geneticamente, maus produtores de anticorpos do que naqueles bom produtores (Kierszenbaum & Howard, 1976; Brener & Krettli, 1990);
- a pré-incubação de tripomastigotas com um soro de forma crônica diminui sua infectividade (MacHardy, 1977);
- a depleção de linfócitos B por injeção de anticorpos torna os animais mais susceptíveis à infecção (Okabe et al., 1980);
- a transmissão passiva de soros imunes ou de imunoglobulinas purificadas provenientes de animais na fase crônica protegem os camundongos contra uma infecção letal (Scott & Goss-Sampson, 1984; Brener 1986);
- por outro lado, níveis elevados de infecção são obtidos em animais sem células B; a transferência de células imunes do baço sem linfócitos B, não induz a uma proteção nestes animais (Scott, 1981).

A proteção depende da porção Fc dos anticorpos (Umekita et al., 1988), e mais especificamente dos isotipos IgG1, IgG2a e IgG2b, que aumentam a eliminação dos parasitos circulantes (Takehara et al., 1981; Brodskyn et al., 1988, 1989).

Diferentes mecanismos dependentes de anticorpos podem contribuir para a eliminação de tripomastigotas extracelulares:

- sua aglutinação com soros imunes específicos diminui sua infectividade (Krettli & Brener 1976; Brener & Krettli, 1990);
- a infecção de células não fagocíticas (como células miocárdicas e fibroblastos) pode ser inibida por anticorpos (Wirth & Kierszenbaum, 1988);
- anticorpos capazes de reconhecer um epítipo galactosil- α -1-3galactose presente na superfície da forma tripomastigota de *T. cruzi* destroem os parasitas, participando assim na diminuição da parasitemia das formas aguda e crônica da infecção (Gazinelli & Brener, 1991; Gazinelli et al., 1991);
- esta lise pode também ser mediada pela via clássica ou alternativa do complemento (Krettli et al., 1979), não necessariamente pela porção Fc dos anticorpos, mas sim pelo bloqueio que estes possam ter sobre o inibidor da C3 convertase presente na superfície de tripomastigotas circulantes (Joiner et al., 1988; Norris et al., 1994);
- a opsonização dos parasitas por anticorpos pode contribuir para sua eliminação através de mecanismos de ADCC (citotoxicidade celular dependente de anticorpos). Diferentes populações celulares apresentam receptores FcR na sua superfície, como eosinófilos (Sanderson et al., 1977), macrófagos (Okabe et al., 1980) e mastócitos (Tambourgi et al., 1989), podendo assim contribuir para a eliminação dos parasitas.

A expressão dos Fc γ RII/III de baixa afinidade está aumentada nas células de camundongos infectados (Araújo-Jorge et al., 1993). Mesmo assim, os parasitas opsonizados por anticorpos são mais facilmente fagocitados e lisados por macrófagos. A atividade tripanocida dos macrófagos resulta de sua ativação por certas citocinas liberadas por linfócitos T sensibilizados (Nogueira et al., 1981), como o IFN- γ , cuja função foi claramente demonstrada *in vitro* e *in vivo* (Golden & Tarleton, 1991). Outras citocinas podem entrar em sinergia com IFN- γ e contribuir para uma maior ativação dos macrófagos. Este é o caso de TNF- α , produzido pelos próprios macrófagos durante a infecção por *T. cruzi* (Tarleton, 1988), e que também tem uma função protetora demonstrada *in vitro* e *in vivo* (De Titto et al., 1986; Starobinas et al., 1991).

IL-1, GM-CSF e IL-3 parecem possuir também uma ação sobre a ativação de macrófagos, porém inferior a de IFN- γ e TNF- α (Reed, 1998). Além disso, a IL-1 complementada com a IL-2, estimula também a função das células T helper, participando deste modo na resposta imune dos linfócitos B (Reed et al., 1989).

4.3.4 Diagnóstico Imunológico da Doença de Chagas

A detecção de anticorpos anti *T. cruzi* é um instrumento muito importante, sobretudo no diagnóstico e na avaliação da forma crônica da infecção (Ferreira, 1992). Extratos antigênicos do parasita preparados a partir de formas epimastigotas de cultivo ou de tripomastigotas obtidos por cultivo celular, são utilizados em diferentes reações sorológicas como fixação do complemento (reação de Machado-Guerreiro), hemaglutinação, imunoprecipitação, imunofluorescência e ELISA (Carlier et al., 1985; Brenière et al., 1987). Estas técnicas permitem o diagnóstico de infecções crônicas em 95 a 99% dos casos. Além do diagnóstico clínico, estes métodos são utilizados no controle de doadores em bancos de sangue e em estudos epidemiológicos.

O problema ocasionado por reações falso-positivas levou ao desenvolvimento de técnicas de diagnóstico sorológico muito mais específicas. A utilização de antígenos purificados específicos para *T. cruzi*, ou de anticorpos monoclonais permitem eliminar as reações cruzadas devido a outros tripanosomatídeos encontrados na América Latina (*Leishmania* e *T. rangeli*) (Dragon et al., 1985; Lemesre et al., 1986; Martin et al., 1990; Paranhos-Bacalla et al., 1994). Também graças à detecção de anticorpos antiidiotípicos específicos para *T. cruzi*, pode-se diferenciar pacientes crônicos assintomáticos daqueles que apresentam doença crônica grave (D'Avila Reis et al., 1993b). A detecção de anticorpos que inibem a atividade da enzima transialidase de *T. cruzi* permite avaliar a infecção crônica e a congênita. Tal como os anticorpos líticos, estes anticorpos neutralizantes podem servir também como marcadores de remissão no acompanhamento de pacientes submetidos a quimioterapia (Leguizamón et al., 1994). Porém, uma resposta humoral específica contra um extrato total de *T. cruzi* e contra o peptídeo R-13 (derivado da proteína ribossomal P do parasita) mostra que os anticorpos anti R-13 permitem diferenciar formas da patologia chagásica: estes anticorpos se apresentaram em grande proporção em pacientes chagásicos cardíacos e ausentes em outros pacientes que apresentavam formas digestivas desta enfermidade; respostas positivas anti-R-13 também foram detectadas em recém-natos infectados por via congênita (Aznar et al., 1995).

A detecção de anticorpos líticos, que foi classicamente feita pelo teste de lise mediado por complemento (Krettli & Brener 1982), está sendo aprimorada. Já foram descritos métodos de citometria de fluxo (Martins-Filho et al., 1995) e de ELISA (Krautz et al., 1994; Taibi et al., 1995), utilizando respectivamente tripomastigotas de cultura de células como agente de captura, ou antígenos purificados ou recombinante (Tc-24), que também diferenciam a infecção por *T. cruzi* da infecção por *T. rangeli*. Apesar de anticorpos líticos estarem presentes em vários mamíferos, uma característica importante da doença de Chagas é a presença somente em humanos (e em primatas do Novo Mundo, mas não em camundongos) de anticorpos antigalactose, capturáveis por laminina de camundongo ou outros antígenos ricos no epítipo Gal- α 1-3-Gal (Szarfman et al., 1982; Milani & Travassos, 1988). São precoces e intensamente estimulados durante a infecção pelo *T. cruzi* (Gazzinelli et al., 1988; Grauert et al., 1993); são capazes de induzir a lise dos parasitas em presença de complemento (Almeida et al., 1991) e apresentam-se em níveis mais elevados em pacientes crônicos assintomáticos do que em sintomáticos (Gazzinelli, 1992). Estudos com crianças infectadas em área endêmica da infecção demonstraram que a presença desses anticorpos em diluições séricas de 1:5.000 pode ser indicativa da presença de infecção recente (Medrano-Mercado et al., 1996a, b; Antas et al., 1999).



4.4

Participação de Citocinas no Determinismo de Resistência ou Susceptibilidade à Infecção Experimental por *Trypanosoma cruzi*

Çislaine A. Martins, Júlio C. S. Aliberti & João S. Silva

Neste capítulo discutiremos o papel de algumas citocinas e quimiocinas e de alguns dos possíveis mecanismos que influenciam no determinismo da resistência e/ou susceptibilidade em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi*. Durante a fase inicial da infecção por esse parasita, os índices parasitêmicos e a mortalidade do hospedeiro dependem intrinsecamente da cepa de *T. cruzi* e das características genéticas do animal infectado, incluindo os genes do sistema principal de histocompatibilidade (Wrightsmann et al., 1982). Algumas cepas de parasitas são capazes de matar todos os animais infectados enquanto outras são quase avirulentas, induzindo baixa parasitemia e ausência de mortalidade. Certas linhagens de camundongos são resistentes à infecção enquanto outras são altamente suscetíveis e morrem durante ou logo após a fase aguda (Andrade et al., 1985; Silva et al., 1992).

A resposta imune protetora e/ou auto-imunidade desenvolvida durante a infecção pelo *T. cruzi* e o tipo de célula T auxiliar (Th) a ser expandido são certamente influenciados pelas citocinas presentes no ambiente durante o processo de diferenciação celular. Citocinas como IFN- γ , IL-4, IL-10 e IL-12, IL-13, IL-14 e IL-18 podem dirigir a diferenciação de subpopulações de células T com conseqüente ativação preferencial de linfócitos Th1 ou Th2. Estas subpopulações de células T foram definidas com base em seu padrão de secreção de citocinas (Mosmann et al., 1986), assunto recentemente revisto por Mosmann & Sad (1996). Com o desenvolvimento do padrão de resposta Th1 há um predomínio da secreção de IL-2 e IFN- γ , induzindo preferencialmente ativação de macrófagos e resposta mediada por células (Cher & Mosmann, 1987; Stout & Bottomly, 1989), enquanto o desenvolvimento de Th2 leva à síntese preferencial de IL-4, IL-5 e IL-10 favorecendo a resposta mediada por anticorpos (Coffmann et al., 1988). IFN- γ inibe a proliferação de células Th2 (Gajewski & Fitch, 1988) e IL-4 inibe a expressão de receptores de IL-2 e produção de IFN- γ (Peleman et al., 1989; Martinez et al., 1990). Por sua vez, IL-10 inibe a síntese de citocinas por Th1 (Fiorentino et al., 1989). O balanço entre estas citocinas determina o padrão de resposta celular a ser gerada, ditando as classes de anticorpos a serem produzidas e a resposta eferente a ser desenvolvida.

4.4.1 O Papel de IFN- γ

O IFN- γ é uma das citocinas mais estreitamente implicadas na resistência à infecção pelo *T. cruzi* e desempenha papel central em induzir a ativação de macrófagos e a inibição da replicação intracelular dos parasitas (Nogueira & Cohn, 1978; Silva et al., 1991; Gazzinelli et al., 1992), e quando administrado *in*

in vivo em camundongos aumenta a resistência à infecção, levando à diminuição de parasitemia e ao aumento da sobrevivência (Reed, 1988). A importância de IFN- γ no controle da infecção por *T. cruzi* foi definitivamente estabelecida por experimentos nos quais a neutralização por meio de tratamento *in vivo* com anticorpos monoclonais (Cardillo et al., 1996) ou a deleção gênica (Martins et al., 1999) de IFN- γ aumentou drasticamente a susceptibilidade à infecção. Resultados obtidos mais recentemente em nosso laboratório demonstram que além de ser necessário para a eliminação dos parasitas, através da indução da produção de óxido nítrico (NO), o IFN- γ participa ainda da modulação da expressão das moléculas Fas e Fas-L, expressas em níveis significativamente elevados nas células esplênicas após a infecção. Em seguida, baseados em uma série de experimentos realizados com animais geneticamente deficientes de IFN- γ , sugerimos que essa citocina está indiretamente implicada no controle da resposta imune, através da indução de NO e expressão de Fas e Fas-L e, conseqüente indução de apoptose nos linfócitos dos animais na fase aguda da infecção com *T. cruzi* (Martins et al., 1999). Contudo, experimentos recentes mostraram que camundongos resistentes e susceptíveis secretam quantidades semelhantes de IFN- γ quando infectados por *T. cruzi*. Esse achado sugere que outras citocinas secretadas durante a infecção poderiam inibir os efeitos de IFN- γ .

4.4.2 O Papel de TGF- β e IL-10

Citocinas que sabidamente inibem os efeitos de IFN- γ em macrófagos são TGF- β e IL-10 (Ding et al., 1990). Investigando a possibilidade dessas citocinas participarem do controle da resposta ao *T. cruzi*, mostramos a presença de TGF- β biologicamente ativo e de IL-10 em sobrenadantes de esplenócitos de animais infectados. A presença de tais citocinas coincidiu com o aumento da produção de IFN- γ e com o início do aparecimento de parasitemia patente nos animais. Experimentos *in vitro* mostraram que tanto TGF- β como IL-10 são capazes de inibir o efeito tripanocida de macrófagos ativados por IFN- γ (Silva et al., 1991, 1992). Adicionalmente, concluímos que TGF- β e IL-10 atuam *in vivo* durante a infecção com *T. cruzi*, pois o tratamento dos animais infectados com TGF- β recombinante ou com anticorpo anti IL-10 resultou em aumento e diminuição de parasitemia e mortalidade, respectivamente (Silva et al., 1991; Reed et al., 1994). Por outro lado, o tratamento com anticorpo anti IFN- γ determinou aumento da mensagem para IL-10, sugerindo que a produção de IL-10 e de IFN- γ em camundongos infectados é regulada por um mecanismo de *feed-back* negativo (Reed et al., 1994).

Uma série de experimentos foi realizada com o intuito de determinar a cinética de produção e o papel das citocinas sintetizadas logo após o primeiro contato dos parasitas com as células-alvos. Os resultados demonstraram que o tratamento com anticorpo anti IFN- γ foi mais eficaz em determinar o aumento de parasitemia quando realizado mais próximo do dia de infecção dos animais. O inóculo de anticorpo anti IFN- γ no 11º dia após à infecção, ou mais tarde, foi completamente ineficaz em determinar o aumento de parasitemia ou mortalidade dos animais. Isto é, neste período ainda que produzido em grande quantidade, IFN- γ já não é mais efetivo em controlar a infecção, possivelmente pela presença de TGF- β e IL-10. Com o objetivo de entender a regulação da resposta anti *T. cruzi* logo no início da infecção, incubamos esplenócitos normais com tripomastigotas vivos e verificamos que animais resistentes e susceptíveis produziram quantidades similares de IFN- γ . Entretanto, animais resistentes produziram quantidades significativamente menores de IL-10 que os susceptíveis. Este dado sugere que a susceptibilidade pode estar relacionada à maior produção de IL-10.

Investigamos em seguida quais células envolvidas na resposta imune inata eram responsáveis pela produção de IFN- γ . Verificamos que tripomastigotas vivos foram capazes de induzir a produção de IFN- γ tanto em células esplênicas de camundongos eutímicos como de atímicos, o que demonstrou que a produção de IFN- γ é independente de células T. Como a depleção de células NK bloqueou a produção de IFN- γ , sugerimos que estas seriam as principais responsáveis pela produção desta citocina após o estímulo inicial com *T. cruzi*,

num período da infecção no qual ainda não há resposta imune específica. Nestes experimentos mostramos também que sobrenadantes de esplenócitos aderentes cultivados com *T. cruzi* foram capazes de induzir a produção de IFN- γ por esplenócitos normais, sugerindo que as células produtoras desta citocina não necessitam contato direto com o parasita, mas sim com algum fator presente no sobrenadante, o qual é produzido após a interação macrófagos-tripomastigotas (Cardillo et al., 1996).

Em seguida, mostramos que macrófagos cultivados com tripomastigotas vivos, mas não epimastigotas ou parasitas mortos, secretam IL-12, que por sua vez foi capaz de induzir a produção de IFN- γ por esplenócitos normais. Nesses ensaios, a adição de anticorpo monoclonal neutralizante anti IL-12 aos sobrenadantes bloqueou completamente a capacidade de induzir a síntese de IFN- γ . O papel da IL-12 durante o curso da infecção *in vivo*, foi melhor entendido quando camundongos infectados e tratados com anticorpo anti IL-12 apresentaram aumento de parasitemia e mortalidade. Estes resultados levaram-nos a sugerir que IL-12, produzida por macrófagos quando da interação com *T. cruzi*, participa conferindo resistência ao hospedeiro, levando a uma diminuição da parasitemia e à mortalidade durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* (Aliberti et al., 1996). De fato, o tratamento com IL-12 recombinante levou a uma diminuição da parasitemia dos animais (Hunter & Araujo, 1996).

4.4.3 A Participação das Quimiocinas

Quimiocinas são mediadores inflamatórios amplamente implicados na modulação dos fenômenos que levam ao acúmulo de populações específicas de leucócitos em processos inflamatórios agudos e crônicos em uma série de doenças. Em termos gerais, as quimiocinas podem ser liberadas por diferentes tipos celulares depois da ativação e desempenham atividade quimiotática potente tanto *in vivo* como *in vitro*. Além da grande implicação na migração dos leucócitos, as quimiocinas podem participar, ainda, de outros eventos extremamente importantes para o estabelecimento da resposta imune, como proliferação de linfócitos T e diferenciação dos padrões Th1 e Th2, entre outros. Estudando a possível participação das quimiocinas na resposta imune contra o *T. cruzi*, experimentos realizados em nosso laboratório demonstraram que macrófagos inflamatórios obtidos da cavidade peritoneal de camundongos produzem as β -quimiocinas JE/MCP-1, MIP- α , MIP- β e RANTES quando cultivados *in vitro* com tripomastigotas vivos de *T. cruzi*. Adicionalmente, essas quimiocinas foram diretamente implicadas na indução da produção de NO e inibição do crescimento dos parasitas nesse sistema (Aliberti et al., 1999). Em concordância com esses resultados, Villalta et al. (1998) demonstraram que também em macrófagos humanos, a atividade tripanocida via produção de NO pode ser induzida *in vitro* pelas quimiocinas RANTES, MIP- α e MIP- β , sugerindo portanto que as quimiocinas devem estar amplamente implicadas na resposta imune contra o *T. cruzi*. Nesse contexto, cabe ressaltar que a produção dessas quimiocinas poderia estar envolvida também nos mecanismos mediadores de processos patológicos agudos e crônicos como a ocorrência de miocardite freqüentemente observada após a infecção com *T. cruzi*.

4.4.4 O Papel do Óxido Nítrico e TNF- α

A atividade tripanocida dos macrófagos ativados foi inicialmente atribuída à geração de peróxido de hidrogênio (Nogueira & Cohn, 1978; Reed et al., 1987). Entretanto, a quantidade de peróxido de hidrogênio liberada por macrófagos durante a infecção de camundongos susceptíveis pode ser mais alta que a observada em animais resistentes (Russo et al., 1989) e tratamentos capazes de exaurir ou eliminar os metabólitos do *burst* respiratório de macrófagos ativados não inibiram a atividade tripanocida destas células. Mesmo macrófagos incapazes de ativar o *burst* respiratório

rio matam parasitas intracelulares com a mesma eficiência que macrófagos normais (Gazzinelli et al., 1992). Esses dados sugeriram que a atividade tripanocida de macrófagos é independente da geração de peróxido de hidrogênio. Adicionalmente, as citocinas que facilitam a replicação dos parasitas (IL-10 e TGF- β) também inibem a indução da enzima óxido nítrico sintase (NOSi). Ao contrário, IFN- γ tem atividade tripanocida e ativa a NOSi. Realmente, o bloqueio dessa enzima por inibidores específicos abole completamente a atividade tripanocida de macrófagos ativados, demonstrando que o NO efetivamente controla a replicação intracelular do *T. cruzi* (Vespa et al., 1994).

Resultados obtidos em nosso laboratório demonstraram que células esplênicas de camundongos na fase aguda da infecção secretam altas quantidades de NO, sendo essa produção mais rápida nos animais resistentes. Camundongos infectados e tratados com inibidores da NOSi tornam-se mais susceptíveis à infecção, apresentando maiores parasitemias e mortalidade, sugerindo que o NO também é importante para controlar a replicação dos parasitas *in vivo*. De fato, tripomastigotas são altamente susceptíveis à morte induzida por NO, visto que quando incubados com uma droga doadora de NO como SNAP (S-nitrosoacetil-penicilamina), mas não com seu análogo penicilamina, morrem de maneira, dose e tempo dependente. Assim, sugerimos que formas amastigotas ou tripomastigotas de *T. cruzi* são mortas no interior de macrófagos por um mecanismo dependente de NO (Vespa et al., 1994).

Em outros experimentos avaliamos o papel de TNF- α em induzir a produção de NO em células isoladas ou em animais infectados. Verificamos que a adição de TNF- α sobre macrófagos infectados, tratados ou não com IFN- γ não induziu qualquer atividade tripanocida, nem potenciou o efeito de IFN- γ . Contudo, a adição de anticorpo anti TNF- α às culturas de macrófagos infectados e estimulados com IFN- γ promoveu uma diminuição significativa da produção de NO e um aumento da replicação dos parasitas intracelulares. Verificamos, ainda, que TNF- α é produzido por macrófagos na presença de tripomastigotas vivos e que a adição de IFN- γ exógeno potenciou essa produção em pelo menos dez vezes. Esses resultados permitiram sugerir que tripomastigotas de *T. cruzi* induzem liberação de TNF- α por macrófagos que, na presença de IFN- γ , atuam de maneira autócrina, promovendo a produção de NO. Desta forma, juntos IFN- γ e TNF- α desempenham importante papel no controle da quantidade de parasitas circulantes em animais infectados por *T. cruzi*. Além de IFN- γ e TNF- α , a produção de NO pelos macrófagos infectados com *T. cruzi* pode ser modulada também pelo fator ativador de plaquetas ou PAF (do inglês *platelet-activating factor*), como demonstrado por experimentos realizados recentemente em nosso laboratório. Os resultados desses experimentos indicam que a atividade indutora de produção de NO exercida por PAF nos macrófagos infectados *in vitro* também é dependente de TNF- α , ilustrando assim a importância de TNF- α na indução dos mecanismos tripanocidas. Com efeito, o tratamento de camundongos infectados com anticorpo anti TNF- α provoca aumento de parasitemia e mortalidade e conseqüente diminuição da produção de NO, confirmando os resultados obtidos *in vitro* (Silva et al., 1995).

4.4.5 Óxido Nítrico e Hiporresponsividade

Apesar da importância do NO como mecanismo microbicida na fase aguda da infecção experimental com *T. cruzi* ser patente, tem sido demonstrado que o NO também induz imunossupressão nessa fase da infecção (Abrahamsohn & Coffmann, 1995). De fato, tratamentos *in vivo* que levam à diminuição da produção de NO, como os tratamentos com os anticorpos monoclonais anti TNF- α ou anti IFN- γ ou com o inibidor da enzima NOSi, foram capazes de restaurar, ao menos parcialmente, a resposta proliferativa de células esplênicas de animais infectados ante a mitógenos. Ainda esses tratamentos promoveram aumento da viabilidade celular observada nestas células após cultura por 24 horas (Martins et al., 1998). O efeito imunossupressor do NO foi anteriormente demonstrado em outras infecções causadas por protozoários como *T. brucei* (Sternberg & McGuidan, 1992; Schleifer & Mansfield, 1993), *Toxoplasma gondii* (Candolfi et al., 1995), e *Plasmodium vinkei* (Rockett et al., 1994), ou por bactérias, como *Listeria monocytogenes* (Gregory et al., 1993). Nessas infecções, a resposta proliferativa pode ser parcial ou totalmente restaurada pelo tratamento *in vivo* ou *in vitro* com inibidores da NOSi.

Os mecanismos pelos quais o NO exerce função imunossupressora ainda não são claros, entretanto, foi demonstrado que o NO pode inibir a apresentação de antígenos por macrófagos regulando negativamente a expressão de moléculas do complexo principal de histocompatibilidade (Sicher et al., 1994). Adicionalmente, alguns trabalhos demonstram que o NO pode alterar o funcionamento de complexos enzimáticos imprescindíveis para o metabolismo celular (Granger & Lehninger, 1982; Kilbourn et al., 1984), inibir a duplicação de DNA (Lepoivre et al., 1990) ou causar danos diretos no DNA (Nguyen et al., 1992) sugerindo que o NO não só pode inibir a replicação mas também pode induzir a morte celular. De fato, o NO tem sido identificado como indutor de apoptose em macrófagos ativados *in vitro* com LPS e IFN- γ (Albina et al., 1993; Sarih et al., 1993), em células tumorais (Granger & Lehninger, 1982), células das ilhotas pancreáticas (Kaneto et al., 1995), timócitos (Fehsel et al., 1995) e em clones de células T antígeno-específicas (Stefani et al., 1994), entre outros. Por outro lado, o NO também pode bloquear a indução de apoptose em determinadas circunstâncias.

Resultados obtidos em nosso laboratório têm demonstrado que em animais agudamente infectados pelo *T. cruzi*, um dos possíveis mecanismos pelo qual o NO poderia participar mediando imunossupressão seria através da indução de apoptose. Inicialmente demonstramos que durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* há um aumento da porcentagem de células em apoptose no baço dos animais infectados por *T. cruzi*. Nesses animais os maiores índices de apoptose foram encontrados justamente quando os índices parasitêmicos e de produção de NO estavam elevados. Esses primeiros achados possibilitaram a formulação da hipótese de que o NO produzido em índices elevados durante a fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi* poderia participar na modulação da indução de apoptose. Tal possibilidade foi posteriormente confirmada quando experimentos *in vitro* demonstraram que, após 48 horas de cultivo, a porcentagem de apoptose em esplenócitos obtidos de animais agudamente infectados por *T. cruzi* poderia ser reduzida se fossem adicionados às culturas inibidores da enzima NOSi ou anticorpos monoclonais anti TNF- α ou anti IFN- γ . Quando os animais infectados receberam esses mesmos tratamentos *in vivo*, a porcentagem de apoptose nas células esplênicas foi menor que a dos controles infectados e tratados com salina ou anticorpo controle (Martins et al. 1998).

Em conjunto, os resultados apresentados (ver sumário na Figura 3.), além de demonstrarem o papel fundamental de citocinas na indução dos mecanismos efetores da morte dos parasitas, também documentam a importância desses mediadores na regulação de tais mecanismos. Nossos resultados comprovam a importância do NO como agente tripanocida e simultaneamente sugerem um mecanismo pelo qual o NO participaria na indução de imunossupressão durante a fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*. Tais achados contribuem para um melhor entendimento da relação hospedeiro-parasita na infecção por *T. cruzi* e podem abrir perspectivas para futuras intervenções imunoterápicas em pacientes chagásicos.

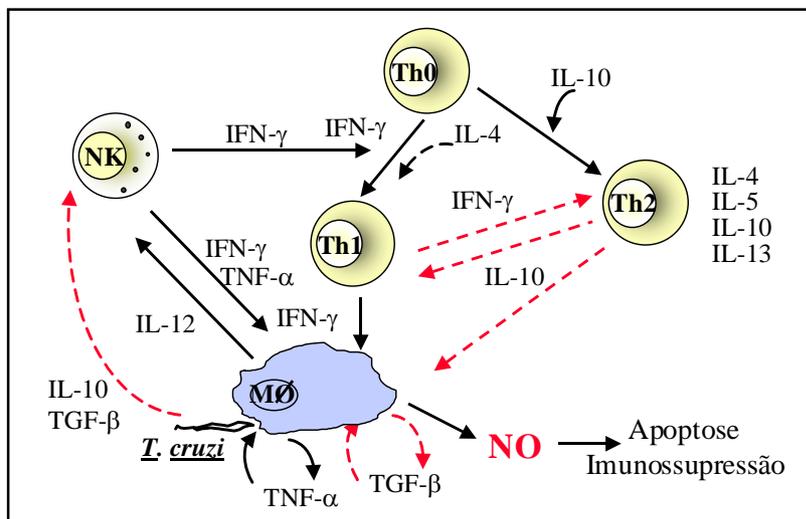
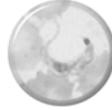


Figura 3— Principais interações de citocinas e células que podem resultar em modulação da resposta imune em camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi*. Mf: macrófagos, NK: células natural killer, NO: óxido nítrico, Th: células T auxiliar. Setas contínuas indicam ativação e setas interrompidas indicam inibição. Ver explicações no texto.



4.5

O Timo como Órgão-alvo na Infecção pelo *Trypanosoma cruzi*

Vinícius Cotta-de-Almeida & Wilson Savino

O sistema imunológico é determinante na resistência antiparasitária durante o curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Tarleton, 1991, 1995). Isto pode ser verificado quando camundongos atímicos são infectados pelo *T. cruzi* (Gonçalves-da-Costa et al., 1984), bem como após depleção específica de linfócitos T CD4⁺ (Minoprio et al., 1987; Russo et al., 1988) ou de CD8⁺ (Tarleton, 1990). Nesses animais ocorre aumento de parasitemia, concomitante a um alto grau de parasitismo tecidual, com uma diminuição no infiltrado inflamatório intracardíaco, demonstrando assim, que ambas as subpopulações CD4 e CD8 parecem ser relevantes no controle da infecção (Tarleton, 1991, 1995).

Paralelamente, diversas alterações no ramo celular da resposta imunológica celular podem ocorrer como, por exemplo, uma ativação policlonal maciça concomitante a uma imunossupressão (revisado em Minoprio et al., 1989). Destaca-se ainda uma diminuição na produção de IL-2 (Harel-Bellan et al., 1983; Nabors & Tarleton, 1991), redução na expressão de moléculas de superfície de linfócitos T (Kierszenbaum et al., 1989) e presença importante de apoptose de linfócitos T (Lopes et al., 1995).

Outro ponto relevante refere-se à presença de um componente auto-imune na miocardite da fase crônica da doença (Takle & Hudson, 1988; Cunha-Neto et al., 1995). Nesse fenômeno, foi sugerida a participação de linfócitos T, após estudo em camundongos, mostrando que as células T CD4⁺ são responsáveis pela efetuação de uma resposta auto-imune antimúsculo cardíaco que ocorre em animais cronicamente infectados (Ribeiro-dos-Santos et al., 1992). Entretanto, a demonstração de que células CD8⁺ predominam em sítios inflamatórios no coração de pacientes chagásicos (D'Avila Reis et al., 1993a) sugere uma participação dessas células na lesão cardíaca da fase crônica.

Esses distúrbios na imunidade celular nos levam a imaginar um possível comprometimento também na geração de células T. De fato, a influência do timo no curso da infecção pelo *T. cruzi* pode ser evidenciada pela noção de que a infecção em animais timectomizados (Schmunis et al., 1971) ou em camundongos atímicos (Kierszenbaum & Pienkowski, 1979; Gonçalves-da-Costa et al., 1984), apresenta-se com um grau maior de severidade, com os animais apresentando parasitemia e mortalidade mais altas. É importante ressaltar que a timectomia em animais adultos, seguida de infecção pelo *T. cruzi*, determina nestes animais redução na resposta policlonal de linfócitos B, e que pode ser evidenciada diminuição no número de células secretoras de Ig, principalmente em relação aos isotipos de IgG (Minoprio et al., 1989). Além disso, a detecção de formas amastigotas no timo (Savino et al., 1989) demonstra como este órgão pode ser diretamente afetado na infecção pelo *T. cruzi*.

Antes de descrevermos as diversas alterações que ocorrem no timo após a infecção pelo *T. cruzi*, é importante ressaltar alguns aspectos da fisiologia deste órgão.

4.5.1 O Timo e a Diferenciação de Células T

O timo é um órgão linfóide primário onde células precursoras dos linfócitos T se diferenciam e aqueles selecionados para sobreviver, ao terminar o processo de maturação, deixam o órgão e vão se localizar nas regiões timo-dependentes dos órgãos linfóides periféricos. Esse processo ocorre em íntimo contato com o microambiente tímico, uma rede tridimensional formada essencialmente por células epiteliais, células dendríticas, macrófagos e elementos da matriz extracelular (ver revisões de Boyd et al., 1993; Savino et al., 1993; Anderson et al., 1996).

As células epiteliais tímicas (TEC) formam o principal componente celular do microambiente tímico e apresentam significativa heterogeneidade morfológica e fenotípica (Boyd et al., 1993). As TEC são capazes de produzir diversas citocinas que estão envolvidas na proliferação e diferenciação de timócitos (ver revisão de Carding et al., 1991). Além disso, uma característica fundamental das TEC é a expressão de moléculas de classe I e classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), capazes de apresentar peptídeos ao receptor clonal de células T (TCR) expresso pelos timócitos, com a participação, respectivamente, dos co-receptores CD8 e CD4, também expressos na superfície dos timócitos.

Dentre as TEC, é importante destacar um grupo de células que apresenta um certo grau de organização celular e possíveis funções específicas, os complexos linfo-epiteliais denominados de células *nurse* do timo (TNC). Estes complexos, compostos de uma célula epitelial envolvendo de dois a duzentos timócitos, obtidos a partir de digestão enzimática de fragmentos de timo, foram primeiramente descritos por Wekerle & Ketelsen (1980). Eles parecem ser relevantes no processo de diferenciação, provavelmente participando em eventos de seleção positiva e negativa de timócitos (Kyewski, 1986; Aguilar et al., 1994). Os complexos TNC têm provável localização na região cortical tímica (Kyewski & Kaplan, 1982; Houben-Defresne et al., 1982; van de Wijngaert et al., 1984; van Vliet et al., 1984; Andrews & Boyd, 1985), e os timócitos intra TNC (TNC-T) apresentam características fenotípicas e funcionais de células imaturas (Kyewski & Kaplan, 1982; van Vliet et al., 1984; de Waal Malefijt et al., 1986; Leene et al., 1988; Li et al., 1992; Philp et al., 1993). Entretanto, ensaio em membrana cório-alantóica, onde TNCs de galinha são depositadas e TNC-T interagem com moléculas de MHC classe II expressas nessa membrana, demonstrou frequência alta de TNC-T com capacidade alo-reativa e auto-reativa (Wick & Oberhuber, 1986; Wick et al., 1991; Penninger & Wick, 1992). Além disso, as TNCs secretam hormônios tímicos e citocinas, expressam proteínas de MHC classe I e classe II, produzem proteínas de matriz extracelular e ainda apresentam junções comunicantes (ver revisão Villa-Verde et al., 1995).

É no contexto deste microambiente de TEC, macrófagos e células dendríticas, e de matriz extracelular, que ocorre um intenso processo de migração, concomitante a um vasto corpo de interações celulares e moleculares desde a chegada de precursores até a saída de linfócitos T imunocompetentes do timo. Durante a diferenciação, as células precursoras passam por diversos estágios de maturação, caracterizados, em parte, pela expressão diferencial de algumas moléculas de superfície (para revisão, ver Fowlkes & Pardoll, 1989; Godfrey & Zlotnik, 1993).

As primeiras células linfóides a colonizarem o timo, os pró-timócitos, foram identificados em camundongos como precursores, expressando baixas quantidades de CD4 (CD4^{lo}), sendo negativos para CD8 e CD3 (Wu et al., 1991), mas positivos para CD44. Em seguida estas células começam a expressar CD24 e CD90 (Thy-1) em níveis mais altos, perdem a molécula CD4, e passam a expressar também CD25, resultando na subpopulação de timócitos CD4⁻CD8⁻TCR⁻, referidos como triplo-negativos. Neste estágio as células passam a estar comprometidas com a linhagem de células T (Godfrey & Zlotnik, 1993), sendo precursoras das outras subpopulações timocitárias: os timócitos duplo-negativos, os timócitos imaturos corticais CD4⁺CD8⁺, ditos duplo-positivos, e os simples-positivos CD4⁺CD8⁻ e CD4⁺CD8⁺, considerados maduros (Figura 4) e que migrarão para a periferia (revisado em Fowlkes & Pardoll, 1989; Godfrey & Zlotnik, 1993; Anderson et al., 1996).

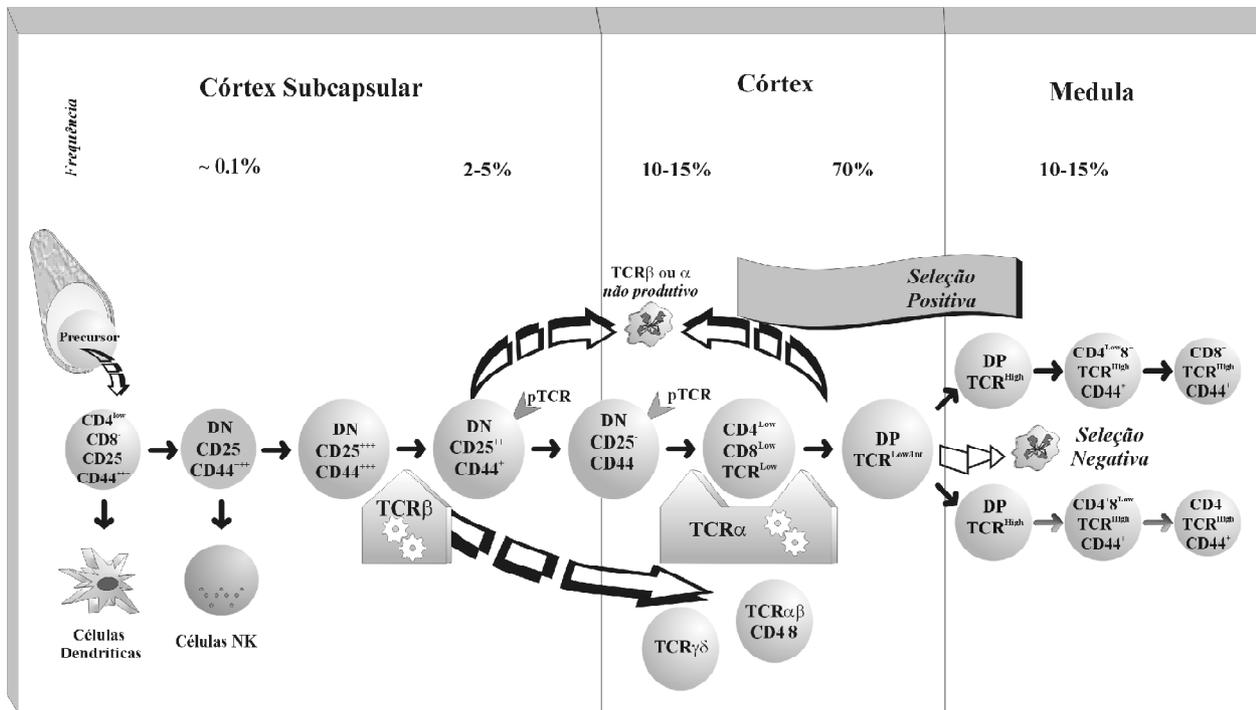


Figura 4 – Diferenciação intratímica de linfócitos T. Adaptado a partir de Oliveira-Dos-Santos (1997) e Godfrey & Zlotnik (1993)

Dentre essas subpopulações, é importante destacar os tímócitos duplo-positivos TCR^{lo} , que correspondem à subpopulação tímica mais freqüente e que, com a expressão do TCR/CD3, representam também o estágio no qual ocorre o principal evento da maturação timocitária, o fenômeno de seleção intratímica. Este fenômeno define quais dos inúmeros receptores gerados no processo de rearranjo do TCR darão origem ao repertório de células T maduras que povoará a periferia (Sprent et al., 1988). Dois são os processos envolvidos naquele fenômeno, a *seleção positiva* (Bevan, 1977) e a *seleção negativa* (Kappler et al., 1987). A seleção negativa tem como efeito a eliminação ou inativação de clones de tímócitos com potencial auto-reactivo, e a seleção positiva tem como efeito duplo permitir que as células progridam para a maturação (ao invés de morrerem) e definir o caminho de maturação. Essa definição se dá como consequência do reconhecimento pelos tímócitos de complexos peptídeo-MHC apresentados por células do microambiente tímico (fenômeno de restrição ao MHC). Assim, paralelamente ao aumento da expressão de TCR/CD3 (Bonifacino et al., 1990), dependendo da interação com moléculas do MHC, apenas uma das moléculas acessórias, CD4 ou CD8, permanecerá (Guidos et al., 1990). Desse modo, se um linfócito T, durante o processo de desenvolvimento, reconhecer um peptídeo em associação com a molécula de MHC de classe II, será uma célula simples-positiva CD4 que não expressa CD8 e, reciprocamente, se a especificidade da célula T for dirigida a um peptídeo complexado ao MHC de classe I, expressará apenas CD8 (von Boehmer & Kisielow, 1993; von Boehmer et al., 1993). Essas subpopulações de células CD4 e CD8 agora maduras, localizadas na região medular dos lóbulos tímicos, emigrarão do órgão indo povoar as áreas T-dependentes dos órgãos linfóides periféricos (ver esquema da Figura 4).

4.5.2 Alterações no Compartimento Linfóide após Infecção pelo *T. cruzi*

A atrofia é uma das principais características relacionadas ao timo em condições de imunodeficiência, estando entre elas diversas doenças infecciosas (revisado em Savino, 1990; Savino et al., 1992). Uma das características observadas na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* em murinos é uma atrofia tímica

progressiva, com perda de massa e celularidade do órgão (Savino et al., 1989; Leite-de-Moraes et al., 1991). A severa diminuição na celularidade tímica se reflete, principalmente, na diminuição de células imaturas de fenótipo CD4⁺CD8⁺ (duplo-positivas). Nesse contexto, verificou-se em paralelo um aumento na frequência de células simples-positivas CD4⁺CD8⁻ e CD4⁻CD8⁺ e duplo negativas CD4⁻CD8⁻. Além disso, a detecção de aumento na frequência de células CD3^{hi} corroboram a noção de que as células resistentes são, em sua maior parte, do tipo medular (Leite-de-Moraes et al., 1991). Histologicamente destaca-se uma redução na região cortical e até mesmo desaparecimento quando a atrofia é bastante intensa. Outro aspecto marcante é a presença de muitos núcleos picnóticos de timócitos na região cortical remanescente.

Como estas alterações se assemelham àquelas vistas em animais injetados com hidrocortisona, e como detectou-se no soro de animais infectados em fase aguda níveis três vezes aumentados de glicorticóides circulantes, as mesmas análises foram feitas em animais adrenalectomizados e infectados. Estas análises mostraram que o padrão das alterações se manteve semelhante àquelas descritas em animais intactos (Leite-de-Moraes et al., 1991).

Outro importante achado foi a demonstração de que toda esta modulação nas subpopulações de timócitos parece ser transitória, tendo em vista que as subpopulações de timócitos, definidos pela expressão de CD3, CD4 e CD8, retornam aos valores normais quando se analisa o timo de animais infectados na fase crônica da doença (Leite-de-Moraes et al., 1992). Nesse sentido, cabe frisar que ao final da fase aguda da doença experimental em camundongos isogênicos da linhagem C3H/HeJ, detectamos um aumento de células CD25⁺ e células em ciclo, que podem corresponder a timócitos em fases iniciais de diferenciação (Leite-de-Moraes et al., 1992).

Mais recentemente, a análise do repertório de timócitos de animais infectados revelou um aumento na porcentagem de células CD4⁺CD8⁺Vb5⁺ e CD4⁺CD8⁺Vb14⁺ e apenas um ligeiro aumento na porcentagem de células CD4⁺CD8⁻Vb5⁺ e CD4⁺CD8⁻Vb14⁺ (Leite-de-Moraes, 1993). Estas alterações ao nível do repertório devem ser analisadas à luz da presença de antígenos parasitários no timo, visto que recentemente foi demonstrada atividade do tipo “superantigênica” associada ao *T. cruzi* (Leite-de-Moraes, 1993), que pode ser detectado parasitando o parênquima tímico (Savino et al., 1989; Gonçalves-da-Costa et al., 1991).

A análise funcional dos timócitos no curso da fase aguda da infecção experimental demonstrou, ainda, reduzida resposta proliferativa à concanavalina A (Con A) e ao anticorpo anti CD3 (Leite-de-Moraes et al., 1994). Demonstrou-se, também, aumento na atividade citotóxica inespecífica destes timócitos. Estas alterações podem ser explicadas pela modulação na produção de citocinas por timócitos de animais infectados em fase aguda. Assim, a resposta proliferativa diminuída se deve, provavelmente, à insuficiente produção de IL-2, visto que a adição deste fator restaura a atividade proliferativa. Esta insuficiência na produção de IL-2, por sua vez, se deve, provavelmente, aos níveis aumentados na produção de IFN- γ e IL-10, já que a resposta proliferativa à Con A e a produção de IL-2 são recuperadas ao se utilizar anticorpos contra estas duas citocinas. Por outro lado, a atividade citotóxica inespecífica exacerbada se deve, provavelmente, aos níveis aumentados na produção de IL-4, IL-5 e IL-6 pelos timócitos dos animais infectados (Leite-de-Moraes et al., 1994).

4.5.3 Alterações Fenotípicas e Funcionais na Rede Epitelial Tímica

Em paralelo às alterações fenotípicas e funcionais de timócitos na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi*, demonstrou-se que o microambiente tímico também está modificado. Nos animais infectados apresentando atrofia tímica, observou-se um processo de densificação da rede epitelial do órgão. Um estudo mais detalhado desta rede foi realizado através de análise imunohistoquímica utilizando-se um painel de anticorpos dirigidos contra diferentes proteínas da família de citoqueratinas. Assim, células reconhecidas pelo anticorpo monoclonal (mAb) ER-TR.5, que em timos normais estão presentes exclusivamente na medula, passam a ser encontradas também no córtex subcapsular e interno. Além disso, células CK8/18⁺, normalmente restritas à região cortical, passam a ser detectadas também na medula tímica (Savino et al., 1989).

Um dado bastante relevante para a análise da patologia tímica na doença de Chagas é a observação de uma expressão maior de antígenos de classe II do MHC concomitante à atrofia que ocorre no timo de animais infectados (Savino et al., 1989). Este efeito seria, possivelmente, secundário ao processo de densificação da rede epitelial, mas talvez também decorra de indução por IFN- γ , cujos níveis intratímicos estão bastante elevados na fase aguda da doença (Leite-de-Moraes et al., 1994).

Por outro lado, a análise da produção do hormônio tímico timulina mostrou pequena redução nos níveis séricos e no número de células timulina-positivas (Savino et al., 1989).

Outra importante observação corresponde ao aumento progressivo na rede intralobular de proteínas de membrana basal fibronectina, do colágeno IV e do antígeno reconhecido pelo mAb ER-TR.7 (Savino et al., 1989).

4.5.4 Distúrbios nas Interações Timócitos/Microambiente

As alterações, tanto no compartimento linfóide como no microambiente tímico, nos levaram a investigar possíveis alterações das interações fisiológicas que acontecem entre timócitos/microambiente, no curso da infecção pelo *T. cruzi*. Assim, recentemente, estudando os complexos *nurse* do timo, verificamos uma diminuição no número destes, bem como alterações no tamanho, granularidade, e diversos danos em nível ultra-estrutural (Cotta-de-Almeida et al., 1997). Observamos também aumento na frequência de timócitos mortos no interior desses complexos *nurse*, bem como aumento na expressão de proteínas de matriz extracelular, com aumento concomitante na liberação de timócitos dos complexos isolados de animais infectados (Cotta-de-Almeida et al., 1997).

Estes dados devem ser analisados em conjunto com os dados recentes em que demonstramos que após à infecção aguda pelo *T. cruzi* há um aumento progressivo na expressão de ligantes de matriz extracelular, por exemplo fibronectina e laminina, bem como na expressão de respectivos receptores VLA-4/VLA-5 e VLA-6 (Cotta-de-Almeida, 1996). Interessante é a observação de que o aumento pode ser percebido antes de haver uma clara atrofia do órgão. Definimos ainda, por citometria de fluxo, que a expressão de VLA-4 se mostrava aumentada já no 15º dia de infecção, porém de forma mais exuberante no 22º dia de infecção. A expressão de VLA-5 e VLA-6 mostrava discretas flutuações nos dias analisados, com a subpopulação de células duplo-positivas sendo, provavelmente, o grupo-alvo do aumento observado na expressão das integrinas (Cotta-de-Almeida, 1996).

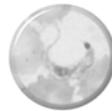
Interessantemente, a infecção aguda pelo *T. cruzi*, além de determinar alterações na expressão de ligantes de matriz extracelular que possuem propriedades adesivas, provoca também importante modulação na expressão de tenascina, uma proteína de matriz extracelular que apresenta propriedades imunorregulatórias, tendo sido descrita como uma proteína de de-adesão (Chiquet-Ehrismann, 1995). Análises imunocitoquímicas *in situ* da expressão de tenascina no timo mostraram uma marcação essencialmente restrita à medula do órgão, com o córtex expressando tenascina apenas no nível da membrana basal de vasos sanguíneos e pouca ou nenhuma marcação na membrana basal subseptal e subcapsular. Já no nono dia de infecção, os timos de animais infectados mostravam aumento de tenascina; progressivamente percebemos que a infecção induzia aparecimento de tenascina no córtex, bem como uma forte marcação na membrana basal de cápsula e septos (Cotta-de-Almeida, 1996).

Além disso, estudando funcionalmente *in vitro* a adesão de timócitos com células epiteliais tímicas, fenômeno este sabidamente mediado por ligantes e receptores de matriz extracelular, pudemos observar que, ao contrário da expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular, a adesão de timócitos obtidos de animais infectados se encontrava diminuída em relação aos timócitos de animais controles. Por outro lado, quando esses timócitos eram colocados sobre células epiteliais tímicas infectadas, observamos um bloqueio parcial na diminuição da adesão, o que ocorria em paralelo com um aumento de matriz extracelular nas culturas de células epiteliais tímicas infectadas (Cotta-de-Almeida, 1996). O conjunto de dados discutidos acima sugere que o

processo de adesão/de-adesão/migração intratímica de células T, sob influência das alterações na expressão de ligantes e receptores de matriz extracelular, esteja modificado no curso da infecção experimental pelo *T. cruzi*, com provável influência no processo normal da diferenciação intratímica de células T.

Nesse sentido, é importante salientar dados recentes em que evidenciamos em linfonodos e baço de animais infectados a presença de número anormalmente alto de células duplo-positivas nesses órgãos durante a infecção aguda. De fato, essas células também foram detectadas na fase crônica da infecção. Análises por citometria de fluxo dos antígenos de membrana CD3 e CD24 (HSA), demonstraram um fenótipo imaturo dessa população de células duplo-positivas. Embora seja necessária a demonstração inequívoca da origem tímica dessas células, esses resultados novamente apontam para a existência de distúrbios na migração e, conseqüentemente na diferenciação intratímica de células T durante a infecção pelo *T. cruzi*.

Os achados de atrofia e depleção linfocitária, juntamente com as diversas alterações no timo de animais infectados, e a detecção de formas amastigotas no parênquima tímico, parecem definir a existência de uma verdadeira patologia tímica na infecção experimental pelo *T. cruzi*.



4.6

Imunomodulação da Resposta T-dependente na Doença de Chagas Experimental

Sylvio Celso G. da Costa, Katia S. Calabrese & Tania Zaverucha do Vale

4.6.1 Inflamação e Resistência - da Antigüidade aos Dias Atuais

O emprego de uma terapia de imunoestimulação visando aumentar a resistência de um doente contra infecções e doenças parasitárias, ou controlar o desenvolvimento de um câncer, é bastante sedutor. É o futuro da medicina já conhecido há longo tempo. Assim, Chamfort relata em suas *Máximas* que os pacientes com paludismo encontravam-se relativamente protegidos contra a peste, fato este que já é conhecido desde o século XVIII. Os egípcios já haviam constatado, empiricamente, que os doentes portadores de certos abscessos resistiam melhor que pessoas sadias a epidemias, conforme mencionado na história clássica da imunoestimulação.

Ao fim do século passado, Elie Metchnikoff, trabalhando no Instituto Pasteur, descobriu a fagocitose. Ele estava longe de imaginar que levaríamos quase cem anos para compreender como os leucócitos passam pelo endotélio vascular para alcançar o local da inflamação (revisto por Girard & Springer, 1995). O papel do endotélio no tráfico de células entre o sangue e os tecidos começou a ser esclarecido no início dos anos 80, ficando pouco a pouco evidenciado o papel das moléculas de adesão na tarefa de capturar células circulantes nos vasos vizinhos de um foco inflamatório. Este assunto é de importância para explicar a propagação de metástases cancerosas, onde células tumorais podem ser detectadas no sangue circulante, um assunto já conhecido há mais tempo, tendo o Dr. Pimenta de Mello, do Instituto Oswaldo Cruz, sido um dos pioneiros neste assunto (Pimenta de Mello, 1963). Moléculas presentes nas

células dos vasos e dos glóbulos brancos são ativadas em determinados momentos do desenvolvimento do processo inflamatório, envolvendo pares de moléculas em missões específicas. Gallatin et al. (1983) evidenciaram a primeira destas moléculas por meio de anticorpos monoclonais (MEL -14). Após purificação, elas foram denominadas selectinas, cujo sítio ativo, a lectina, se liga aos açúcares dos polímeros nucleares e dos monócitos, que são as primeiras células atraídas para o local da inflamação (Lasky et al., 1992; Baumhueter et al., 1993).

Por outro lado, as moléculas de adesão, situadas na superfície dos leucócitos, do tipo integrinas (como a LFA-1), são ativadas por moléculas quimiotáticas como a PAF (*platelet activating fator*), a IL-8 e outras que são produzidas pelo endotélio sob influência de mediadores da inflamação (a trombina e a histamina). Essas moléculas, após serem secretadas nos vasos e antes de circularem, se associam a outras moléculas da superfície do endotélio, principalmente com a CD44 (Tanaka et al., 1993). Em uma fase subsequente, moléculas como PECAM-1 (*platelet endothelial adhesion molecule-1*) ou CD31 participam da aproximação dos leucócitos e também da ativação das integrinas.

Algumas moléculas de adesão intervêm apenas no sentido de retardar a locomoção dos leucócitos na circulação (Butcher, 1991; Lawrence & Springer, 1991). Fazendo uma análise rápida dos modelos que descrevemos nos trabalhos, vamos ver que os imunomoduladores que empregamos estão em primeiro plano modulando a entrada de células no local da inflamação e, em uma segunda etapa, ativando-as. Uma vez ativadas, as integrinas mudam de forma e podem se ligar às moléculas de adesão da superfície endotelial como ICAM-1 (*intercellular adhesion molecule-1*), VCAM-1 (*vascular cell adhesion molecule-1*) e CD31, que garantem uma forte adesão dos leucócitos ao endotélio.

Estes estudos poderão explicar porque, em casos de reativação da doença de Chagas, devido à evolução da síndrome de imunodeficiência adquirida (Aids), ocorre, preferencialmente, o comprometimento do sistema nervoso central, usualmente apresentando sintomas de meningoencefalite (Rocha et al., 1994). A reativação da doença de Chagas ocorre apenas em pacientes imunossuprimidos (Krettli, 1983), sendo nestes casos muito freqüente o comprometimento do sistema nervoso central. Este fato tem sido assinalado em casos de transplantes (Jost et al., 1977; Pizzi et al., 1982; Leiguarda et al., 1990), leucemias (França et al., 1969; Monteverde et al., 1976; Kohl et al., 1982; Corona et al., 1988), linfomas (Monteverde et al., 1976) e Aids (Meneses et al., 1992; Oddó et al., 1992; Rosemberg et al., 1992). Em pacientes imunocomprometidos, têm sido descritas lesões pseudotumorais no sistema nervoso central devidas ao *T. cruzi* (Gluckstein et al., 1988, 1992; Del Castillo et al., 1990; Ferreira et al., 1991). De maneira semelhante, a ativação de tripanosomíase, pela ação da cortisona em macacos rhesus com infecção por *Trypanosoma vickersae* na Índia, mostrou alta incidência de encefalomielite. Assim, poderíamos perguntar quais fatores da resposta imunológica estariam atuando, ou deixando de atuar, sobre a barreira hemato-encefálica favorecendo estas alterações? Seria consequência da depleção das células CD4⁺ e dos fatores por elas induzidos que deixariam de atuar na regulação do endotélio vascular?

Os estudos com pacientes aidéticos são sugestivos. A alta taxa de destruição de células T CD4⁺ é o principal fator que leva ao desencadeamento da patogênese ligada ao HIV-1 (Ho et al., 1992). Entre vários aspectos desta patogênese, destacam-se problemas ligados ao parasitismo do sistema nervoso central, com lesões envolvendo *T. gondii* e *T. cruzi*.

Por outro lado, pacientes crônicos imunocomprometidos em consequência de imunoterapia supressora devido a um transplante cardíaco apresentam lesões cutâneas nodulares (Jatene, 1987). Lesões cutâneas similares foram encontradas em camundongos atímicos (Calabrese & Gonçalves da Costa, 1992), mostrando que o modelo murino é importante neste aspecto. Quando estudamos na leishmaniose tegumentar o espectro das diferentes formas clínicas, o pólo que aparece nos pacientes com lesões localizadas e benignas, bem como o pólo anérgico com formas difusas extremamente graves, podemos analisar este espectro pelo perfil imunológico da pele.

Seria interessante lembrar que a idéia da existência de uma imunidade órgão-específica remonta ao início do século, tendo sido este assunto levantado no Instituto Pasteur de Paris por Alexandre Bessedka, colaborador de Ilya Metchnikoff (Silverstein, 1989). Fichtelius et al. (1970) publicaram um artigo no qual chegaram a sugerir que a pele seria um órgão linfóide de primeira linha, comparável até com o timo. Esta conclusão foi obtida com base nas estruturas linfoepiteliais que ocorrem na pele dos recém-nascidos e fetos humanos. Estes acúmulos linfóides podem reaparecer nos adultos, sendo então diagnosticados como linfomas cutâneos benignos. Esta proposta constitui a hipótese mais interessante para explicar a origem de certas doenças cutâneas de proliferação linfóide não maligna. Entretanto, o conceito que estabelece a pele como um órgão de primeiro nível linfóide não tem bases consistentes.

O sistema imune cutâneo (SIC) é um complexo de células que interagem com a resposta imune, envolvendo um conjunto de fatores humorais que podem estar mais relacionados com a imunidade natural (queratinócito, histiócitos, monócitos, granulócitos e mastócitos) ou com a imunidade adquirida (células de Langerhans, células T e células endoteliais). O processo imunorregulador da pele tem sido descrito como composto de três fases distintas (Nickoloff, 1988): recrutamento, retenção/proliferação, recirculação.

A fase de recrutamento envolve o extravasamento de leucócitos através da estrutura vascular e o subsequente movimento destas células para a epiderme. As fases de retenção e de proliferação compreendem a interação entre as células de Langerhans, queratinócitos, células T e citocinas, bem como a subsequente proliferação destas células T que induzirão a formação do infiltrado inflamatório que poderá evoluir para um granuloma. Finalmente a fase de recirculação é ativada após a eliminação do componente de agressão da pele e envolve processos regulatórios cujos sinais são originados das células de Langerhans e dos queratinócitos.

As lesões cutâneas decorrentes da reativação do doença de Chagas em pacientes imunocomprometidos sugerem algumas questões.

- Seriam conseqüência de uma colonização latente da derme, resultado de um estado de imunidade concomitante que foi reativada pelas alterações dos mecanismos regulatórios do SIC?
- Seriam resultado de alterações dos sistemas regulatórios das estruturas vasculares, que parecem ocorrer também no sistema nervoso central de pacientes chagásicos aidéticos?

Na leishmaniose tegumentar, os dois pólos da doença apresentam alterações marcantes tanto na derme quanto na epiderme: as formas localizadas apresentam na epiderme um número elevado de células de Langerhans e de queratinócitos expressando ICAM e MHC, ao passo que na forma difusa os queratinócitos não expressam ICAM ou MHC, ocorrendo um pequeno número de células de Langerhans. Observando-se a derme na leishmaniose cutânea, nota-se o acúmulo de células T epidermotrópicas e uma resposta imunológica do tipo Th₁, enquanto na forma difusa a resposta é do tipo Th₂ (Tapia et al., 1994).

No momento, desenvolvemos diferentes modelos experimentais, o que permite termos um espectro da doença de Chagas, cujas posições extremas são as seguintes:

- pólo constituído pelos camundongos atímicos e que, por conseguinte, apresenta uma ausência marcante de resposta T-dependente e ausência de miocardite;
- pólo constituído por camundongos resistentes pela imunopotenciação da resposta T-dependente específica, com 100% de sobrevivida à infecção aguda e insignificante miocardite nesta fase.

O estudo da imunologia órgão-específica que estamos iniciando poderá esclarecer muitos destes aspectos ainda obscuros da tripanosomíase americana (Figura 5).

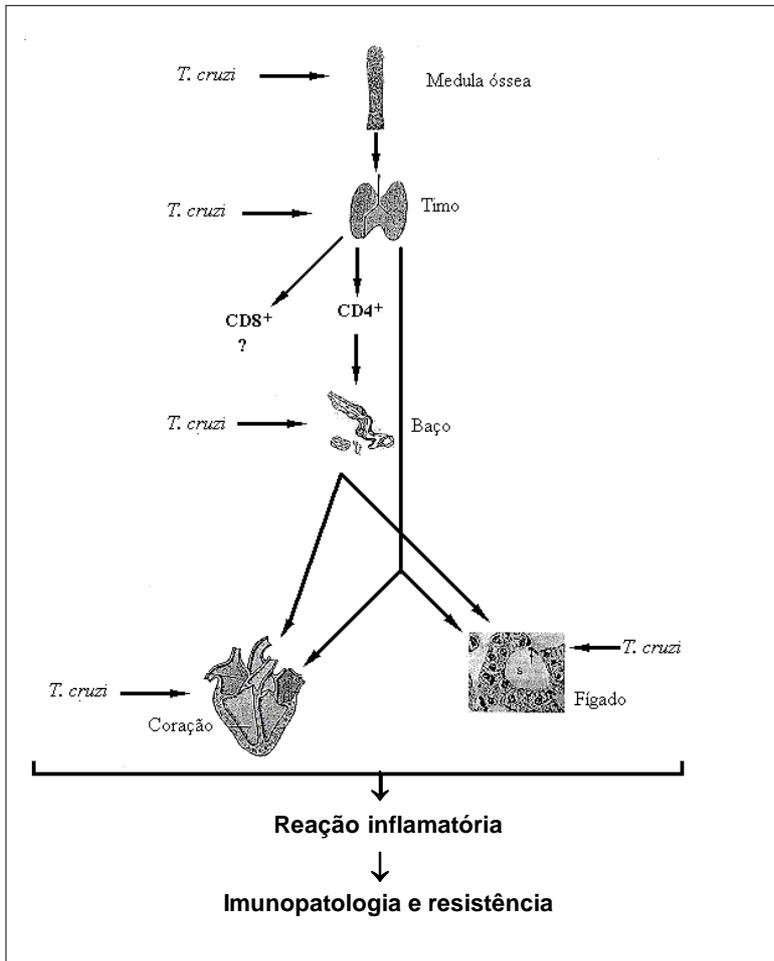


Figura 5 – Esquema mostrando a colonização do sistema linfóide pelo *Trypanosoma cruzi* e a correlação entre a invasão tissular e a reação inflamatória em diferentes órgãos, iniciando os processos imunopatológicos.

4.6.2 A Infecção pelo *T. cruzi* na Ausência de Reação Inflamatória

Camundongos atímicos OF1 (Swiss Webster, Albin) ou singênicos de linhagens sensíveis, intermediários e resistentes ao *T. cruzi* (Nude, C₃H/He, Balb/C e C57BL/6, respectivamente) infectados com 10⁴ tripomastigotas oriundos de culturas em células, ou tripomastigotas sanguíneas, apresentam uma infecção com parasitemias elevadíssimas, sem os perfis observados nos camundongos eutímicos. Apresentam, também, uma correspondente exarcebação da colonização tissular, de caráter sistêmico. As cepas Y e CL, ditas polares do *T. cruzi* pela colonização preferencial de células do sistema fagocítico mononuclear ou do músculo, respectivamente, quando inoculadas em camundongo Balb/C Nude apresentam o mesmo perfil, mostrando que a resposta T-dependente modula o chamado tropismo de cepas do *T. cruzi* (Gonçalves da Costa et al., 1984, 1986). O estudo histopatológico tem demonstrado que na ausência da resposta T-dependente não ocorre nenhum infiltrado inflamatório. A transferência de células T de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*, ou mesmo de camundongos normais, restaura o infiltrado inflamatório, ocorrendo a destruição de pseudocistos quando transferimos células T de camundongo com trinta dias de infecção (Gonçalves da Costa et al., 1984). Com o emprego de anticorpos monoclonais anti CD4⁺, ficou evidenciado que a depleção deste tipo celular favorece o aumento da parasitemia e a densidade das formas amastigotas nos tecidos, bem como a diminuição do infiltrado inflamatório numa evidência clara sobre o papel das células CD4⁺ na resistência e na patologia da doença de Chagas experimental (Russo et al., 1988). Foi demonstrado que estas células são capazes de provocar a destruição de corações singênicos de camundongos recém-nascidos

transplantados para camundongos adultos (transplante inserido na orelha de camundongos adultos) (Mengel et al., 1988). Em recente publicação, Kierszenbaum (1995) pergunta: “O que estão fazendo realmente as subpopulações de células T na doença de Chagas?” A complexidade da participação destas células requer, evidentemente, muitos estudos. Tarleton (1995) sugere que as células T têm um papel regulador na replicação dos parasitas, não apenas no início da fase aguda, mas também na fase crônica. Nos resultados obtidos por Tarleton et al. (1994), tanto a depleção de células CD8⁺ ou CD4⁺ em torno do 20^o dia e dias subsequentes, resulta numa diminuição moderada da inflamação e no aumento da colonização do coração quando avaliada no 30^o dia da infecção.

Recentemente foi demonstrado que a miocardite chagásica crônica é dependente de subpopulações CD8⁺. O número destas células aparece elevado nos pacientes portadores de lesões contendo antígenos do *T. cruzi*, enquanto as células CD4⁺ permanecem baixas. Esta última observação reforça a proposição de que ocorre uma imunodepressão seletiva na fase crônica da doença (Higuchi, 1996).

4.6.3 Imunomodulação Empregando a Fração de Flagelo Associada ao BCG

O emprego de frações subcelulares como antígenos na tripanosomíase americana determinou o desenvolvimento de métodos especiais de fracionamento visando a pureza das preparações contendo as organelas. Os trabalhos iniciais (Segura et al., 1974, 1977) não apresentavam grau de pureza apreciável, o que constituía um obstáculo sério para a análise bioquímica e imunológica das frações. Visando a obtenção de frações subcelulares com um grau elevado de pureza, foram desenvolvidos alguns métodos para obtenção de frações subcelulares de tripanosomatídeos (Pereira et al., 1978; Dwyer, 1980). Outras investigações confirmaram que o fracionamento subcelular de tripanosomatídeos é complexo e que diferentes frações subcelulares não podem ser obtidas simultaneamente nem empregando um único esquema de fracionamento (Piras et al., 1981). Frações enriquecidas de flagelo de *T. cruzi* têm se mostrado como imunógenos importantes, capazes de induzir resistência e imunidade celular (Segura et al., 1977; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981), mas apresentando uma estrutura complexa. Vários trabalhos têm sido publicados sobre a biologia celular dos flagelos e sua caracterização ultra-estrutural, onde se destaca a estrutura paraxial com vários componentes macromoleculares (Cunha et al., 1984).

No caso do *T. brucei* – causador da doença do sono e de um complexo de doenças de interesse veterinário, em grande parte da África – esses estudos estão bem avançados, tendo sido determinada a principal proteína da estrutura paraxial do flagelo e os genes que a codificam (Schlaeppli et al., 1989). A localização e isolamento de imunógenos do *T. cruzi* é de grande importância, não apenas para o desenvolvimento de métodos de diagnóstico mais sensíveis e específicos para a doença de Chagas (Patruco et al., 1978; Petry et al., 1987; Lafaille et al., 1989; Affranchino et al., 1989), como também para melhor conhecimento dos processos imunopatológicos (Carlomagno et al., 1994; Gonçalves da Costa et al., 1994; Hansen et al., 1996).

A fração purificada de flagelo (Pereira et al., 1978) e os antígenos recombinantes FRA e CRA (Lafaille et al., 1989), vêm sendo empregados no Laboratório de Imunomodulação, em estudos imunobiológicos no modelo murino, já que o flagelo se constitui na organela mais importante para a doença de Chagas, do ponto de vista antigênico. Os resultados de estudos comparando a ação imunogênica de diferentes frações subcelulares do *T. cruzi* mostraram que a fração flagelar (FF) tem maior capacidade de induzir proteção e apresenta a vantagem de induzir poucos efeitos imunopatológicos (Ruiz et al., 1985). Outros autores, entretanto, realizando estudos sobre o papel de diferentes componentes da FF têm fornecido resultados interessantes. Com o emprego de anticorpos monoclonais, vários antígenos foram identificados e purificados pela técnica

de imunoafinidade. Um destes antígenos (antígeno 123) apresentou propriedades imunossupressoras, e estudos sobre a seqüência de aminoácidos de alguns peptídeos isolados do antígeno 123 mostraram homologia com as alfa-fetoproteínas humanas e de ratos (Carlomagno et al., 1994).

A capacidade que as micobactérias têm de modificar a resposta imunológica tem sido empregada para fins práticos há longo tempo (Freund & McDermott, 1942), e se baseou na observação de Dienes (1928), que mostrou que quando se inocula um antígeno no local previamente preparado por uma injeção de bacilos da tuberculose mortos, algumas vezes obtemos hipersensibilidade retardada (HR) a estes antígenos. Assim, o adjuvante de Freund completo (AFC) tem sido usado durante muito tempo como a maneira mais efetiva de se obter HR (Lagrange & Hurrell, 1979; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1980; Gonçalves da Costa et al., 1986) e resistência, associado ou não a antígenos parasitários (Andrade & Carvalho, 1969; Hommel et al., 1982). O uso de imunostimulantes no tratamento de doenças humanas teve origem nos Estados Unidos da América, com o uso de toxinas bacterianas para o tratamento do câncer por William B. Coley. Um número limitado de agentes, entretanto, se encontra liberado para a clínica médica. Entre eles está o BCG, que é largamente empregado nos Estados Unidos e na Europa no tratamento do câncer de bexiga (ver Hadden, 1993) e do carcinoma escamoso (Bier et al., 1980). Seu emprego com interesse veterinário também ocorre, tendo sido usado no tratamento do carcinoma escamoso da vaca, por aplicação intralesional, com excelentes resultados (Bier et al., 1980). Um grande número de publicações tem mostrado uma certa ação estimulatória da imunidade natural por imunomoduladores como o BCG e o *Corynebacterium parvum*. Estes podem influenciar o curso de infecções parasitárias, como a doença de Chagas experimental (Kierszenbaum, 1975; Brener & Cardoso, 1976; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981), babesiose (Clark et al., 1977), malária (Clark et al., 1976) e leishmaniose (Fortier et al., 1987; Gonçalves da Costa et al., 1988), ou controlar o desenvolvimento de tumores (Bast & Bast, 1976). Injeções intralesionais produzem uma reação inflamatória local capaz de provocar a cicatrização de lesões por *L. braziliensis* (Gonçalves, A. P., comunicação pessoal) e provocar a regressão de tumores (Salomon & Cream-Goldberg, 1980).

Resultados muito interessantes foram observados quando pacientes com câncer de pele, sensibilizados com compostos orgânicos de baixo peso molecular, como o 2,4-dinitrochlorobenzeno, receberam uma segunda dose do produto no local do tumor, ocorrendo a erradicação da lesão (Klein, 1968). A exploração da reação inflamatória como um elemento de controle da propagação de tumores e de infecções, entretanto, tem seus resultados mais importantes quando se baseia no fenômeno de Dienes & Schoenheit (1930): “antígenos comuns como albumina do ovo, proteínas séricas e pólen, induzem uma HR do tipo tuberculínico quando introduzidos no local de uma infecção pelo bacilo tuberculínico”. A exploração que se tem deste fenômeno se deve, em grande parte, aos trabalhos desenvolvidos por George Mackaness e Phillipe Lagrange no Trudeau Institute, Saranac Lake, em Nova Iorque, tendo esta linha de pesquisa mais tarde prosseguido no Instituto Pasteur de Paris. Foi demonstrado que a imunopotenciação exercida pelo BCG sobre o antígeno superposto se estende tanto à imunidade humoral quanto à celular. A resposta imunológica é efetiva quando o BCG e o outro antígeno são introduzidos de forma a serem drenados num linfonodo comum (Miller et al., 1973). A HR induzida pelo eritrócito de carneiro (EC), sem ou com modulação por diferentes agentes (BCG, ciclofosfamida -CY-, AFC, etc.), fornece diferentes tipos de HR (Ohmichi et al., 1976). Desta forma, têm-se desenvolvido estudos em que tumores e diferentes microorganismos são inoculados junto com a dose de revelação do EC nestes diferentes modelos de HR e o crescimento tumoral ou o curso das infecções são acompanhados (Lagrange et al., 1978; Lagrange & Trickston, 1979; Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981). Estes diferentes tipos de HR são mediados por diferentes subpopulações de linfócitos T, como foi sugerido inicialmente por Lagrange & Mackaness (1975), Hahn et al. (1979) e mais tarde confirmado.

No caso do *T. cruzi*, o mais primitivo dos processos inflamatórios, um granuloma de corpo estranho, é capaz de promover um certo nível de resistência (De Mesquita, 1979). Um nível maior de resistência é alcançado quando a dose desafio de tripomastigotas é aplicada juntamente com a dose de revelação de HR em camundongos previamente sensibilizados (Gonçalves da Costa & Lagrange, 1980). Em infecções por *L. amazonensis*, entretanto, experimentos similares conduzem a um estado de facilitação (Calabrese & Gonçalves da Costa, 1992) ao passo que uma reação de HR inespecífica, de tipo tuberculínico, confere proteção contra *L. enrietti* (Behin et al., 1977).

Um nível muito mais elevado de resistência tem sido obtido quando se substitui o EC pela fração purificada de flagelo (FPF) (Gonçalves da Costa & Lagrange, 1980, 1981). A substituição da FPF por tripomastigotas viáveis em camundongos previamente tratados pelo BCG e FPF é capaz de revelar uma HR. Esta HR é amplificada pela CY injetada dois dias antes da dose de sensibilização com FPF (Gonçalves da Costa & Lagrange, 1981; Abrahamsohn et al., 1981). A análise histopatológica mostrou um intenso processo inflamatório no local da inoculação da dose de infecção no camundongo tratado pelo BCG e muito mais intensa ainda quando ambos os imunomoduladores são usados.

A CY provoca alterações importantes no fluxo de células leucocitárias (Calabrese et al., 1996) e deve influir no teor de linfocinas que têm um papel crítico no curso de infecções. Após uma fase de depressão, em virtude da ação tóxica da CY, ocorre uma explosão de PMN e monócitos no sangue circulante, em estrita correlação com um aumento da miocardite (Calabrese et al., 1996). Embora estas células monocitárias sejam células hospedeiras de alta afinidade para a multiplicação do *T. cruzi*, os macrófagos têm sido considerados um elemento-chave no controle do parasito, desde que ativados (Hoff, 1975). Assim, a atividade tripanosomicida depende da ativação de células T CD4 pela produção de g-interferon cuja produção vai mediar a ativação macrofágica (McCabe et al., 1991; Vandekerckhove et al., 1994). É interessante assinalar que estas reações de HR são T-dependentes (Lagrange & Trickston, 1979).

Como demonstrou Mackaness (1964), no caso de microorganismos que colonizam macrófagos, o controle da infecção depende essencialmente da imunidade celular, sendo a imunidade humoral insignificante. Um começo efetivo e posterior propagação da resposta imunológica requer a produção de um perfil de linfocinas apropriado que vai influenciar o curso da infecção, como veremos mais adiante.

A resistência à infecção pelo *T. cruzi*, induzida por várias formas de HR no camundongo, de certa forma pode explicar os resultados pouco claros sobre o papel de subpopulações de células T auxiliares no controle desta infecção. O conhecimento que se tem sobre o papel de subpopulações Th na doença de Chagas é menos claro que aquele já estabelecido na leishmaniose tegumentar. A função de células auxiliares e o estudo de secreções de linfocinas vêm sendo desenvolvidos em linhagem de células T, denominada G-05, derivada de linfonodo de camundongo cronicamente infectado (Spinella et al., 1990). Estas células têm o perfil de células Th₂, secretando IL-4 mas não IL-2 ou γ -IFN e induzindo células B a produzir anticorpos, produção esta mediada por linfocinas liberadas em cultura, principalmente IL-4, IL-5 e IL-6. Esta linhagem de células T induz, *in vivo*, a ativação de células B, que produzem principalmente IgG2a e IgG2b (Spinella et al., 1990), de forma semelhante ao que se observa em infecções murinas pelo *T. cruzi*. Esta expressão da célula B é considerada, por muitos autores, como resultado de uma ativação policlonal e a ela tem se dado muita atenção recentemente (Ortiz-Ortiz et al., 1980; D'Imperio Lima et al., 1986; Minoprio et al., 1986a,b; Hontebeyrie-Joskowicz, 1991). É interessante analisar neste aspecto o papel dos anticorpos naturais anti Gal identificados inicialmente por Muniz & Santos (1950), que mostraram que anticorpos com propriedades aglutinantes anti *T. cruzi* se ligam em uma fração polissacarídica presente na superfície deste parasito. Como estes anticorpos são absorvidos dos soros de pacientes chagásicos por eritrócito de carneiro, foram chamados de anticorpos heterófilos. Os aspectos da imunidade humoral na doença de Chagas foram discutidos no Capítulo 4.3.

Agradecimentos: a Luciana Freitas Pereira pelo trabalho de preparação do manuscrito, bem como pela organização de um banco de dados em doença de Chagas e a Marlene Lopes Lucena pela elaboração da Figura 5.

Referências Bibliográficas

- ABRAHAMSOHN, I. A. & COFFMAN R. L. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 155:3955-3963, 1995.
- ABRAHAMSOHN, I. A. & COFFMAN, R. L. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ , e IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology*, 84:231-239, 1996.
- ABRAHAMSOHN, I. A.; BLOTTA, M. H. S. L. & CURROTTO, M. A. Enhancement of delayed-type hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice treated with *Mycobacterium bovis* BCG and cyclophosphamide. *Infection and Immunity*, 31: 1145-1151, 1981.
- AFFRANCHINO, J. L.; IBANEZ, C. F.; LUQUETTI, A. O.; RASSI, A.; REYES, M. B.; MACINA, R. A.; ASLUND, L.; PETERSSON, U. & FRASH, A. C. C. Identification of a *Trypanosoma cruzi* antigen that is shed during acute phase of Chagas' disease. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 34:221-228, 1989.
- AGUILAR, L. K.; AGUILAR-CORDOVA, E.; CARTWRIGHT, J. R. J. & BELMONT, J. W. Thymic nurse cells are sites of thymocyte apoptosis. *Journal of Immunology*, 152:2645-2651, 1994.
- ALBINA, D. J.; HARMON, B. V. & ROBERTS, S. A. Nitric oxide-mediated apoptosis in murine peritoneal macrophages. *Journal of Immunology*, 150:5080-5085, 1993.
- ALIBERTI, J. C. S.; CARDOSO, M. G. A.; MARTINS, G. A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L. Q. & SILVA, J. S. IL-12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. *Infection & Immunity*, 64:1961-1967, 1996.
- ALIBERTI, J. C. S.; MACHADO, F. S.; GAZZINELLI, R. T.; TEIXEIRA, M. M. & SILVA, J. S. Platelet-activating factor induces nitric oxide synthesis in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages and mediates resistance to parasite infection in mice. *Infection & Immunity*, 67:810-814, 1999b.
- ALIBERTI, J. C. S.; MACHADO, F. S.; SOUTO, J. T.; CAMPANELLI, A. P.; TEIXEIRA, M. M.; GAZZINELLI, R. T. & SILVA, J. S. β -Chemokines enhance parasite uptake and promote nitric oxide-dependent microbistatic activity in murine inflammatory macrophages infected with *Trypanosoma cruzi*. *Infection & Immunity*, 67:4819-4826, 1999.
- ALMEIDA, I. C.; MILANI, S. R.; GORIN, P. A. & TRAVASSOS, L. R. Complement-mediated lysis of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes by human anti- α -galactosyl antibodies. *Journal of Immunology* 146:2394-2400, 1991.
- ANDERSON, G.; MOORE, N. C.; OWEN, J. J. T. & JENKINSON, E. J. Cellular interactions in thymocyte development. *Annual Review Immunology*, 14:73-99, 1996.
- ANDRADE, S. G. & CARVALHO, M. L. Efeito da excitação do sistema reticulo-endotelial pelo adjuvante de Freund, na doença de Chagas experimental. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 11:229-235, 1969.
- ANDRADE, V.; BARRAL-NETTO, M. & ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18:499-506, 1985.
- ANDREWS, P. & BOYD, R. L. The murine thymic nurse cell: an isolated thymic microenvironment. *European Journal of Immunology*, 15:36-42, 1985.
- ANTAS, P. R. Z. *Quantificação de proteínas de fase aguda em crianças chagásicas buscando, identificar marcadores da evolução da infecção pelo Trypanosoma cruzi*, 1996. Tese de Mestrado em Biologia Parasitária, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- ANTAS, P. R. Z.; MEDRANO-MERCADO, N.; TORRICO, F.; UGARTE-FERNANDEZ, R.; GÓMEZ F.; OLIVEIRA, R. C.; CHAVES A.; ROMANHA A. J. & ARAÚJO-JORGE T. C. Early, intermediate, and late acute stages in Chagas' disease: a study combining anti-galactose IgG, specific serodiagnosis, and polymerase chain reaction analysis. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 61:308-314, 1999.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; BARBOSA, H. S. & MEIRELLES, M. N. L. *Trypanosoma cruzi*: recognition by macrophages and muscle cells: opening perspectives after a 15-years study. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl.V):43-56, 1992a.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; EL BOUHDIDI, A.; RIVERA, M. T.; DAERON, M. & CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infections in mice enhances the membrane expression of low affinity Fc receptors for IgG and the release of their soluble forms. *Parasite Immunology*, 15:539-546, 1993.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; LAGE, M. J. F.; RIVERA, M. T.; CARLIER, Y. & VAN LEUVEN, F. *Trypanosoma cruzi*: enhanced α -macroglobulin levels correlate to resistance of BALB/CJ mice to acute infection. *Parasitology Research*, 78:215-221, 1992b.

- AZNAR, C.; LOPEZ-BERGAMI, P.; BRANDARIZ, S.; MARIETTE, C.; LIEGEARD, P.; ALVES, M. D.; BARREIRO, E. L.; CARRASCO, R.; LAFON, S. & KAPLAN, D. Prevalence of anti-R-13 antibodies in human *Trypanosoma cruzi* infection. *FEMS Immunol Med Microbiol*, 12:231-238, 1995.
- BAST, R. C. & BAST, B. S. Critical review of previously reported animal studies of tumor immunotherapy with non specific immuno-stimulants. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 277:60-93, 1976.
- BAUMHUETER, S.; SINGER, M. S.; HENZEL, W.; HEMMERICH, S.; RENZ, M.; ROSEN, S. D. & LASKY, L. A. Binding of L-selectin to the vascular sialomucin CD34. *Science*, 262:436-438, 1993.
- BEHBEHANI, K.; PAN, S. C. & UNANUE, E. R. Marked increase in Ia-bearing macrophages during *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical Immunology and Immunopathology*, 19:90-195, 1981.
- BEHIN, R.; MAUEL, J. & ROWE, D. S. Mechanisms of protective immunity in experimental cutaneous leishmaniasis of the guinea pig. III. Inhibition of leishmania lesion the guinea pig delayed-hypersensitivity reaction to unrelated antigens. *Clinical & Experimental Immunology*, 29:320-325, 1977.
- BEVAN, M. J. In a radiation chimaera, host H-2 antigens determine immune responsiveness of donor cytotoxic cells. *Nature*, 269:417-418, 1977.
- BIER, J.; PICKARTZ, H.; SCHLESINGER, S.; ZBAR, B.; RAPP, H.; BORSOS, T.; KLEINSCHUSTER, S.; RÖLLINGHOFF, M. & WAGNER, H. Intralesional injection of emulsified BCG-cell walls in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region. *Cancer Immunology and Parasite Immunology*, 97:187-198, 1980.
- BONIFACINO, J. S.; MCCARTHY, S. A.; MAGUIRE, J. E.; NAKAYAMA, T.; SINGER, D. S.; KLAUSNER, R. D. & SINGER, A. Novel post-translational regulation of TCR expression in CD4⁺CD8⁺ thymocytes influenced by CD4. *Nature*, 344: 247-251, 1990.
- BORTH W. A2-macroglobulin, a multifunctional binding protein with targeting characteristics. *FASEB Journal*, 6:3345-3353, 1992.
- BOYD, R. L.; TUCEK, C. L.; GODFREY, D. I.; IZON, D. J.; WILSON, T. J.; DAVIDSON, N. J.; BEAN, A. G. D.; LADYMAN, H. M.; RITTER, M. A. & HUGO, P. The thymic microenvironment. *Immunology Today*, 14:445-459, 1993.
- BRENER, Z. Why vaccines do not work in Chagas' disease. *Parasitology Today*, 2: 196-199, 1986.
- BRENER, Z. The pathogenesis of Chagas' disease: an overview of current theories. In: Chagas' disease and the nervous system. *PAHO Scientific Publication*, 547: 30-46, 1994.
- BRENER, Z. & CARDOSO, J. E. Non-specific resistance against *Trypanosoma cruzi* enhanced by *Corynebacterium parvum*. *Journal of Parasitology*, 62:645-646, 1976.
- BRENER, Z & KRETTLI, A. U. Immunology of Chagas' disease. In: *Modern parasite biology: cellular, immunological and molecular aspects*. New York: Wyllier DJ, Freeman WH & Co, 1990. p. 247-261.
- BRENIERE, F. S.; CARLIER, Y.; CARRASCO, R.; MOLINEDO, S.; LEMESRE, J. L.; DESJEUX, P.; DESJEUX, P. & AFCHAIN, D. Specific immunodiagnosis of Chagas disease: immunodiffusion test using a specific serum anti-*Trypanosoma cruzi* component 5. *Tropical and Geographical Medicine* 39: 281-286, 1987.
- BRENIERE, S. F.; CARRASCO, R.; MIGUEZ, H.; LEMESRE, J. L. & CARLIER, Y. Comparisons of immunological test for serodiagnosis of Chagas' disease in Bolivian patients. *Tropical and Geographical Medicine*, 37:231-238, 1985.
- BRODSKYN, C. I.; SILVA, A. M. M.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. Characterization of antibody isotype responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology Letters*, 18:255-258, 1988.
- BRODSKYN, C. I.; SILVA, A. M. M.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. IgG subclasses responsible for immune clearance in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Immunology and Cellular Biology*, 67:343-341, 1989.
- BRUMPT, E. Pénétration du *Schizotrypanum cruzi* à travers la muqueuse oculaire saine. *Bulletin de la Société de Pathologie Expérimentale*, 5:723, 1912.
- BURLEIGH, B. A. & ANDREWS, N. W. The mechanism of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, 49:175-200, 1995.
- BUTCHER, E. C. Leukocyte-endothelial cell recognition: three or more steps to specificity and diversity. *Cell*, 67:1033-1036, 1991.
- CALABRESE, K. S. & GONÇALVES DA COSTA, S. C. Enhancement of *Leishmania amazonensis* infection in BCG non-responder mice by BCG-antigen specific vaccine. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl. I):49-56, 1992.
- CALABRESE, K. S.; LAGRANGE, P. H. & GONÇALVES DA COSTA, S. C. Chagas' disease: Enhancement of systemic inflammatory reaction in cyclophosphamide treated mice. *International Journal of Immunopharmacology*, 18:505-514, 1996.

- CANDOLFI, E.; HUNTER, C. A. & REMINGTON, J. S. Roles of IFN- γ and other cytokines in suppression of the spleen cell proliferative response to concanavalin A and toxoplasma antigen during acute toxoplasmosis. *Infection & Immunity*, 63:751-756, 1995.
- CARDILLO, F., FALCÃO, R. P., ROSSI, M. A. & MENGEL, J. An age-related T cell suppressor activity correlates with the outcome of autoimmunity in experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *European Journal of Immunology*, 23:597-2605, 1993.
- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J. C.; REED, S. G. & SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by IFN- γ and IL-10: Role of NK cells. *Infection & Immunity*, 64:128-134, 1996.
- CARDING, S. R.; HAYDAY, A. & BOTTOMLY, K. Cytokines in T-cell development. *Immunology Today*, 12:239-245, 1991.
- CARLIER, Y.; BRENIERE, F. S.; LEMESRE, J. L.; CARRASCO, R.; DESJEUX, P. & AFCHAIN, D. The interest of immunoprecipitation test in the immunological diagnosis of Chagas' disease. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 65:85-94, 1985.
- CARLOMAGNO, M. A.; HANSEN, D.; VILLACRÉS-ERIKSSON, M.; AKERBLUM, L.; HELLMAN, V.; SEGURA, E. L. & MOREIN, B. Immune suppression by *Trypanosoma cruzi* antigens identified by monoclonal antibodies prepared with *Trypanosoma cruzi* ISCOMS. *International Congress of Parasitology*, Izmir, Turquia, 1994. Abstracts, p. 81.
- CHER, D. J. & MOSMANN, T. R. Two types of murine "helper" T cell clone. II. Delayed-type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. *Journal of Immunology*, 138:3688-3692, 1987.
- CHIQUET-EHRISMANN, R. Tenascins, a growing family of extracellular matrix proteins. *Experientia*, 51:853-862, 1995.
- CLARK, I. A.; ALLISON, A. C. & COX, F. E. Protection of mice against *Babesia* and *Plasmodium* with BCG. *Nature*, 259: 309-311, 1976.
- CLARK, I. A.; WILLS, E. J.; RICHMOND, J. E. & ALLISON, A. C. Suppression of babesiosis in BCG-Infected mice and its correlation with tumor inhibition. *Infection & Immunity*, 17:430-438, 1977.
- COFFMANN, R. L.; SEYMOUR, B.; LEBMAN, D.; HIRAKI, D.; CHRISTIANSEN, J. SHRADER, B. CHERWINSKI, H.; SAVELKOUL, H.; FILKENMAN, F.; BOND, M. & MOSMANN, T. M. The role of "helper" T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. *Immunological Reviews*, 102:5-28, 1988.
- CORONA, S. S.; AMANALES, C.; AVARIA, M. B. & DE LOS, A. Granuloma chagásico del cerebro en un paciente con leucemia linfoblástica. *Revista Médica do Chile*, 116:676-680, 1988.
- COTTA-DE-ALMEIDA, V. *O timo na imunopatologia da doença de Chagas experimental. Estudos sobre as alterações fenotípicas e funcionais na diferenciação e migração intratímicas de células T*, 1996. Tese de Doutorado, Programa de Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- COTTA-DE-ALMEIDA, V.; BERTHO, A. L.; VILLA-VERDE, D. M. S. & SAVINO, W. Phenotypic and functional alterations of thymic nurse cells following acute *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical Immunology Immunopathology*, 82:125-132, 1997.
- COUTINHO, C. M. L. M., CAVALCANTI, G. H., BONALDO, M. C., MORTENSEN, R. F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. *Trypanosoma cruzi*: detection of a surface antigen cross-reactive to human C-reactive protein. *Experimental Parasitology*, 90:43-153, 1998.
- CUNHA, N. L.; SOUZA, W. & HASSÓN-VOLOCH, A. Isolation of the flagellum and characterization of the paraxial structure of *Herpetomonas megasaliae*. *Journal of Submicroscopic Cytology*, 16:705-713, 1984.
- CUNHA-NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M. E.; PILLEGGI, F. & KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 92: 3541-3545, 1995.
- DALMASSO, A. P. & JARVINEN, J. A. Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. *Infection & Immunity* 28:434-440, 1980.
- D'AVILA REIS, D.; GAZINELLI, R. T.; GAZINELLI, G. & COLLEY, D. G. Antibodies to *Trypanosoma cruzi* express idiotypic patterns that can differentiate between patients with asymptomatic or severe Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 150: 1611-1618, 1993b.
- D'AVILA REIS, D.; JONES, E. M.; TOSTES, S.; LOPES, E. R.; GAZINELLI, G.; COLLEY, D. G. & CURLEY, M. C. Characterization of inflammatory in chronic Chagas myocardial lesions: Presence of a few TNF- α cells, and a predominance of granzyme A⁺ CD8⁺ lymphocytes. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 48:637-644, 1993a.

- DEL CASTILLO, M.; MENDONZA, G.; OVIEDO, J.; BIANCO, R. P. P.; ANSELMO, A. E. & SILVA, M. AIDS and Chagas' disease with central nervous system tumor-like lesion. *American Journal of Medicine*, 88:693-694, 1990.
- DE MESQUITA, R. P. The protective effect of non-immunologic granulomatous inflammation in *Trypanosoma cruzi* infection of mice. *Revista Brasileira de Biologia*, 39:99-102, 1979.
- DE TITTO, E. H.; CATTERALL, J. R. & REMINGTON, J. S. Activity of recombinant tumor necrosis factor on *Toxoplasma gondii* and *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 137:1342-1345, 1986.
- DEUTSCHLÄNDER, N.; VOLLERTHUN, R. & HUNGERER, K-D. Histopathology of experimental Chagas disease in NMRI-mice: a long term study following paw infection. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 29:323-329, 1978.
- DE WAAL MALEFIJT, R.; LEENE, W.; ROHOLL, P. J. M.; WORMMEESTER, J. & HOEBEN, K. A. T cell differentiation within thymic nurse cells. *Laboratory Investigation*, 55:25-34, 1986.
- DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 27:1-110, 1934.
- DIENES, L. Further observations concerning the sensitization of tuberculous guinea pigs. *Journal of Immunology*, 15:153-174, 1928.
- DIENES, L. & SCHOENHEIT, E. W. Certain characteristics of the infections process in connection with the influence exerted on the immunity response. *Journal of Immunology*, 19:44-61, 1930.
- D'IMPERIO LIMA, M. R.; EISEN, H.; MINOPRIO, P.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 137:353-356, 1986.
- D'IMPERIO LIMA, M. R.; JOSKOWICZ, M.; COUTINHO, A.; KIPNIS, T. & EISEN, H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque forming cell responses in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Immunology*, 15:201-203, 1985.
- DING, A.; NATHAN, C. F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D. J. & SRIMAL S. Macrophages deactivating factor and transforming growth factors-1, 2, 3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by IFN- γ . *Journal of Immunology*, 145:940-944, 1990.
- DOS REIS, G. & LOPES, M. F. A resposta imune à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em modelos experimentais: Vias de acesso a mecanismos de imunoproteção e de patogênese na doença de Chagas. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1999, Capítulo 9, p.153-169.
- DRAGON, E. A.; BROTHERS, V. M.; WRIGHTSMAN, R. A. & MANNING, J. A Mr. 90000 surface polypeptide of *Trypanosoma cruzi* as a candidate for a Chagas' disease diagnostic antigen. *Molecular Biochemical Parasitology*, 16:213-219, 1985.
- DUTRA, W. O.; LUZ, Z. M.; CANÇADO, J. R.; PEREIRA, M. E.; BRIGIDO-NUNES, R. M.; GALVAO, L. M.; COLLEY, D. G.; BRENER, Z.; GAZZINELLI, G. & CARVALHO-PARRA, J. F. Influence of parasite presence on the immunologic profile of peripheral blood mononuclear cells from chagasic patients after specific drug therapy. *Parasite Immunology*, 18:579-585, 1996.
- DUTRA, W. O.; MARTINS-FILHO, O. A.; CANÇADO, J. R.; PINTO-DIAS, J. C.; BRENER, Z.; FREEMAN JUNIOR, G. L.; COLLEY, D. G.; GAZZINELLI, G. & PARRA, J. C. Activated T and B lymphocytes in peripheral blood of patients with Chagas'disease. *International Immunology*, 6:499-506, 1994.
- DWYER, D. M. Isolation and partial characterization of surface membranes from *Leishmania donovani* promastigotes. *Journal of Protozoology*, 27:176-182, 1980.
- EL BOUHDIDI, A.; TRUYENS, C.; RIVERA, M. T.; BAZIN, H. & CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic both hypergammaglobulinemia and parasite-specific response involving high levels of IgG2a and highly avid IgG1 antibodies. *Parasite Immunology*, 16:69-76, 1994.
- FEARON, D. & LOCKSLEY, R. M. The instructive role of innate immunity in the acquired immune response. *Science*, 272:50-54, 1996.
- FEHSEL, K.; KRÖNCKE, K. D.; MEYER, K. L.; HUBER, H.; WAHN, V. & KOLB-BACHOFEN, V. Nitric oxide induces apoptosis in mouse thymocytes. *Journal of Immunology*, 155:2858-2865, 1995.
- FERREIRA, A. W. Tests for Chagas disease serodiagnosis: a review. In: *Chagas' Disease (American Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. São Paulo: ISBT-Brazil, 1992. p. 179-193.
- FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; ROCHA, A.; SILVA, A. M.; FERREIRA, R. G.; OLIVIER, W. & TOSTES Jr, S. Acute fatal *Trypanosoma cruzi* meningoencephalitis in a human immunodeficiency virus-positive hemophiliac patient. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 45:723-727, 1991.

- FICHTELIUS, K. E.; GROTH, O. & LIDÉN, S. The skin, a first level lymphoid organ? *International Archives of Allergy*, 37:607-620, 1970.
- FIorentino, D. F.; Bond M. A. & Mosmann, T. R. Two types of mouse helper T cell. IV. Th2 secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *Journal of Experimental Medicine*, 179:2081-2095, 1989.
- FORTIER, A. H.; MACK, B. A.; MELTZER, M. S. & NACY, C. A. *Mycobacterium bovis* BCG-induced protection against cutaneous and systemic *Leishmania major* infections of mice. *Infection & Immunity*, 55:1707-1714, 1987.
- FOWLKES, B. J. & PARDOLL, D. M. Molecular and cellular events of T cell development. *Advances in Immunology*, 44:207-264, 1989.
- FRANÇA, L. C. M.; FLEURY, R. N.; RAMOS Jr., H. A.; LEMOS, S.; MELARAGNO FILHO, R. & PASTERNAK, J. Moléstia de Chagas crônica associada a leucemia linfática. Ocorrência de encefalite aguda como alteração do estado imunitário. *Arquivos de Neuropsiquiatria*, 27:59-66, 1969.
- FREUND, J. & MCDERMOTT, K. Sensitization to horse serum by means of adjuvants. *Proceedings of Society Experimental Biology and Medicine*, 49:548-553, 1942.
- GAJEWSKI, T. F. & FITCH, F. W. Anti-proliferative effect of IFN- γ in immune regulation. I. IFN- γ inhibits the proliferation of Th2 but not Th1 murine helper T lymphocyte clone. *Journal of Immunology*, 140:4245-4252, 1988.
- GALLATIN, W. M.; WEISSMAN, I. L. & BUTCHER, E. C. A cell-surface molecule involved in organ-specific homing of lymphocytes. *Nature*, 304:30-34, 1983.
- GALLIARD, H. Envahissement précoce et intense de la cavité abdominale chez la souris au cours des infections a *Trypanosoma cruzi*. *Annales de Parasitologie*, 7:377-380, 1929.
- GAZINELLI, R. T. Natural anti-Gal antibodies prevent, rather than cause autoimmunity in human Chagas' disease. *Research in Immunology*, 42:164-167, 1992.
- GAZZINELLI, G. & BRENER, Z. Immune response in Chagas' disease. *Research in Immunology*, 142:180-182, 1991.
- GAZZINELLI, R. T.; GALVÃO, L. M.; CARDOSO, J. E.; CANÇADO, J. R.; KRETTLI, A. U.; BRENER, Z. & GAZZINELLI, G. Anti-*Trypanosoma cruzi* and anti-laminin antibodies in chagasic patients after specific treatment. *Journal of Clinical Microbiology* 26:1795-1800, 1988.
- GAZZINELLI, R. T.; OSWALD, I. P.; HIENY, S.; JAMES, S. L. & SHER, A. The microbicidal activity of IFN- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by IL-10 and TGF- β . *European Journal of Immunology*, 22:2501-2506, 1992.
- GAZINELLI, R. T.; PEREIRA, M. E. S.; ROMANHA, A.; GAZINELLI, G. & BRENER, Z. Direct lysis of *Trypanosoma cruzi*: A novel effector mechanism of protection mediated by human anti-gal antibodies. *Parasite Immunology*, 13:345-356, 1991.
- GIRARD, J. P. & SPRINGER, T. A. High endothelial venules HEVS: Specialized endothelium for lymphocyte migration. *Immunology Today*, 16:449-457, 1995.
- GLUCKSTEIN, D.; CIFERRI, F. & RUSKIN, J. Chagas' disease: another cause of cerebral mass in the acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Medicine*, 92:429-432, 1992.
- GLUCKSTEIN, D.; RUSKIN, J.; CIFERRI, F.; WEICHL, W. D. & GROGL, M. Chagas' disease: A new case of cerebral mass in AIDS. In: *Interscience conference on antimicrobial agents and chemotherapy*, 28, Los Angeles, American Society for Microbiology, 1988. abstr, nº 1230.
- GODFREY, D. I. & ZLOTNIK, A. Control points in early T-cell development. *Immunology Today*, 14:547-553, 1993.
- GOLDEN, J. M. & TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Experimental Parasitology*, 72: 391-402, 1991.
- GOMES, N. A.; PREVIATO, J. O.; ZINGALES, B.; MENDONÇA-PREVIATO, L. & DOS REIS, G. A. Down regulation of T-lymphocyte activation in vitro and in vivo induced by glycoinositolphospholipids from *Trypanosoma cruzi*: assignment of the T-cell suppressive determinant to ceramine domain. *Journal of Immunology*, 156:628-635, 1996.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C. & LAGRANGE, P. H. Immune modulation which increases resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Cancer Immunology and Parasite Immunology* INSERM, 97:383-405, 1980.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C. & LAGRANGE, P. H. Development of cell mediated immunity to flagellar antigens and acquired resistance to infection by *Trypanosoma cruzi* in mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76:367-381, 1981.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; BARBOSA SANTOS, E. & LAGRANGE, P. H. Vaccination of mice against *Leishmania mexicana amazonensis* with microsomal fraction associated with BCG. *Annales de l'Institut Pasteur Immunologie*, 139:143-156, 1988.

- GONÇALVES-DA-COSTA, S. C.; CALABRESE, K. S.; BAUER, P. G.; SAVINO, W. & LAGRANGE, P. H. Studies on the thymus in Chagas' disease. III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs of adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. *Pathology Biology*, 39:91-97, 1991.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; CALABRESE, K. S.; OLEMANN, W. & LAGRANGE, P. H. , 1994. Immunopotentialization of protective antigens in experimental Chagas' disease. *International Congress of Parasitology*, Izmir, Turquia: Abstracts, p. 82.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; HURTREL, B. & LAGRANGE, P. H. Non specific resistance of mice to *Trypanosoma cruzi* strain CL induced by delayed type hypersensitivity to unrelated antigen. *Atas da Sociedade de Biologia do Rio de Janeiro*, 26:15-24, 1986.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; LAGRANGE, P. H.; HURTREL, B.; KERR, I. & ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. *Annales d'Immunologie Institut Pasteur*, 135:317-332, 1984.
- GRANGER, D. & LEHNINGER, A. L. Sites of inhibition of mitochondrial electron transport in macrophage-injured neoplastic cells. *Journal of Cell Biology*, 95: 527-35, 1982.
- GRAUERT, M. R.; HOUSSAYER, M. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactivity antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clinical and Experimental Immunology* 93:85-92, 1983.
- GREGORY, S. H.; WING, E. J.; HOFFMAN, R. A. & SIMMONS, R. L. Reactive nitrogen intermediates suppress the primary immunologic response to *Listeria*. *Journal of Immunology*, 150:2901-2909, 1993.
- GUIDOS, C.; DANSKA, J. S.; FATHMAN, C. G. & WEISSMAN, I. L. T cell receptor-mediated negative selection of autoreactive T lymphocyte precursors occurs after commitment to the CD4 or CD8 lineages. *Journal Experimental Medicine*, 172:835-845. 1990.
- HADDEN, J. W. Immunostimulants. *Immunoogy Today* 14:275-280, 1993.
- HAHN, H.; KAUFMANN, S. H. E.; MILLER, T. E. & MACKANESS, G. B. Peritoneal exudate T-lymphocytes with specificity to sheep red blood cells: I. Production and characterization as to function and phenotype. *Immunology*, 36:691-696, 1979.
- HANSEN, D. S.; ALIEVI, G.; SEGURA, E. L.; CARLOMAGNO, M.; MOREIN, B.; VILLACRES-ERIKSSON, M. The flagellar fraction of *Trypanosoma cruzi* depleted of an immunosuppressive antigen enhances protection to infection and elicits spontaneous T cell responses. *Parasite Immunology* 18:607-615, 1996.
- HARDY, R. R.; CARMACK, C. E.; SHENG, Y. & HAYAKAWA, K. Distinctive developmental origins and specificities of murine CD5+ B cells. *Immunological Reviews*, 137:90-118, 1994.
- HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D. & HEISEN, H. Modification of T-cell proliferation and interleukin 2 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 80:3466-3469, 1983.
- HAREL-BELLAN, A.; JOSKOWICZ, M.; FRADELIZI, D. & EISEN, H. T lymphocyte function during experimental Chagas' disease: Production of and response to interleukin 2. *European Journal of Immunology*, 15:438-442, 1985.
- HATCHER, F.M. & KUHN, R.E. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. *Science* 218:295-296, 1982.
- HATCHER, F.M.; KUHN, R. E.; CERRONE, M. C. & BURTON, R. C. Increased natural killer cell activity in American trypanosomiasis. *Journal of Immunology* 127: 1126-1128, 1981.
- HIGUCHI, M. L. Chronic chagasic myocarditis is *Trypanosoma cruzi* antigen and CD8⁺ T cell-dependent. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91 (Suppl.): 42, 1996.
- HO, J. L.; REED, S. G.; SOBEL, J.; ARRUDA, S.; HE, S. H.; WICK, E. A. & GRABSTEIN, K. H. Interleukin-3 induces antimicrobial activity against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi* and tumoricidal activity in human peripheral blood-derived macrophages. *Infection & Immunity*, 60:1984-1993, 1992.
- HOFF, R. Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *Trypanosoma cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. *Journal of Experimental Medicine*, 142:299-311, 1975.
- HOFFLIN, J. M.; SADLER, R. H.; ARAUJO, F.G.; PAGE, W. E. & REMINGTON, J. S. Laboratory-acquired Chagas disease. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene* 81:437-440, 1987.
- HOMMEL, M.; DAVID, P. H.; GURLOTTE, M. & PEREIRA DA SILVA, L. Protection against *Plasmodium chabaudi* malaria. I - Vaccination of mice with merozoites and Freund's adjuvants. *Annales d'Immunologie Inst. Pasteur*, 133C:57-67, 1982.
- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Murine *Trypanosoma cruzi* infection: a role for Th2 cells in the immunopathology of chronic infection. *Research Immunology*, 142: 141-143, 1991.

- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Humoral and cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* infection and disease. In: *Chagas' disease and the nervous system*. Washington DC: PAHO, 1994. Sci. Publi. no 547, p. 273-283.
- HOUBEN-DEFRESNE, M. P.; VARLET, A.; GOFFINET, G. & BONIVER, J. Thymic nurse cells are the first site of virus replication after inoculation of the radiation leukemia virus. *Leukemia Research*, 2:231-241, 1982.
- HUNTER, C. A. & ARAUJO, F. IL-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on TNF- α and IFN- γ . *Infection & Immunity*, 64:2381-2386, 1996.
- HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D.; ARAUJO, F.G. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology* 158:3311-3316, 1997.
- JAMES, S. L.; KIPNIS, T.; SHER, A. & HOFF, R. Enhanced resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. *Infection & Immunity* 35:588-591, 1982.
- JATENE, A. D. Transplante de coração em pacientes com miocardiopatia chagásica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 20 (Supl. II):C5-C6, 1987.
- JOINER, K. A.; DA SILVA, W. D.; RIMOLDI, M. T.; HAMMER, C. H.; SHER, A. & KIPNIS, T. L. Biochemical characterization of a factor produced by trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that accelerates the decay of complement C3 convertase. *Journal of Biological Chemistry*, 263:11327-11335, 1988.
- JOST, L.; TURIN, M.; ETCHEGOYEN, P.; LEIGUARDA, R.; TARATUTO, A. L. & TOFFI, R. Meningoencefalitis chagásica em paciente com tratamento immunosupresor por transplante renal. *Revista Neurologica Argentina*, 3:425-428, 1977.
- KAGAN, I. G. & NORMAN, L. Immunological studies of *Trypanosoma cruzi*. III. Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infections Diseases* 108:213-217, 1961.
- KAHN, S.; WLEKLINSKI, M.; ARUFFO, A.; FARR, A.; CODER, D. & KAHN, M. *Trypanosoma cruzi* amastigote adhesion to macrophages is facilitated by the mannose receptor. *Journal of Experimental Medicine* 182:1243-1258, 1995.
- KAHN, S. J.; WLEKLINSKI, M.; EZEKOWITZ, R.A.; CODER, D.; ARUFFO, A. & FARR, A. The major surface glycoprotein of *Trypanosoma cruzi* amastigotes are ligands of the human serum mannose-binding protein. *Infection & Immunity* 64:2649-2656, 1996.
- KANETO, H.; FUJII, J.; SEO, H. G.; KEIICHIRO, S.; MATSUOKA, T.; NAKAMURA, M.; TATSUMI, H.; YAMASAKI, Y.; KAMADA, T. & TANIGUCHI, N. Apoptotic cell death triggered by nitric oxide in pancreatic-cells. *Diabetes*, 44:733-734, 1995.
- KAPPLER, J. W.; ROEHM, N. & MARRACK, P. T cell tolerance by clonal elimination in the thymus. *Cell*, 49:273-280, 1987.
- KIERSZENBAUM, F. Enhancement of resistance and suppression of immunization against experimental *Trypanosoma cruzi* infection by *Corynebacterium parvum*. *Infection & Immunity*, 12:1227-1229, 1975.
- KIERSZENBAUM, F. On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. *Immunology*, 44:641-648, 1981.
- KIERSZENBAUM, F. What are T-cell subpopulations really doing in Chagas' disease? *Parasitology Today*, 11:6-7, 1995.
- KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J. G. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody forming in the Biozzi high and low responder mice. *Journal of Immunology*, 116:1208-1211, 1976.
- KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKY, M. M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Infection & Immunity*, 24:117-120, 1979.
- KIERSZENBAUM, F. & SZTEIN, M. B. Chagas' disease American Trypanosomiasis. In: *Parasitic infections and the immune system*. Academic Press Inc., 1994. p.53-85.
- KIERSZENBAUM, F.; SZTEIN, M. B. & BELTZ, L. A. Decreased human IL-2 receptor expression due to a protozoan pathogen. *Immunology Today*, 10:129-131, 1989.
- KILBOURN, R. G.; KLOSTERGAARD J. & LOPEZ-BERESTEIN, G. Activated macrophages secrete a soluble factor that inhibits mitochondrial respiration of tumor cells. *Journal of Immunology*, 133:2577-2581, 1984.
- KIM, Y. M.; BOMBECK, C. A. & BILLIAR, T. R. Nitric oxide as a bifunctional regulator of apoptosis. *Circulation Research* 84 253-256, 1998.
- KIPNIS, T. L.; JAMES, S. L.; SHER, A. & DAVID, J. R. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. II. Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 30: 47-53, 1981.
- KLEIN, E. Tumors of skin. X-Immunotherapy of cutaneous and mucosal neoplasms. *Journal of Medicine*, 68:900-911, 1968.

- KOHL, S.; PICKENING, L. K.; FRANKEL, L. S. & YAEGER, R. G. Reactivation of Chagas' disease during therapy of acute lymphocytic leukemia. *Cancer*, 50: 827-828, 1982.
- KOJ, A. Definition and classification of acute phase proteins. In: *The acute phase response to injury and infection*. Amsterdam, New York, Oxford: Elsevier, 1984. p.139-144.
- KRAUTZ, G. M.; COUTINHO, M. G.; GALVÃO, L. M.; CANÇADO, J. R. & KRETTTLI, A. U. Soluble antigens released by *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes used in ELISA to detect cure in chagasic patients following specific treatment. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 27:199-207, 1994.
- KRETTTLI, A. U. Resposta imune humoral na doença de Chagas. *Interciência*, 8:374-382, 1983.
- KRETTTLI, A. U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology*, 116:755-760, 1976.
- KRETTTLI, A. U. & BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. *Journal of Immunology*, 128:2009-2012, 1982.
- KRETTTLI, A. U.; WEISZ-CARPINGTON, P. & NUSSENSZWEIG, R. S. Membrane bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice. Strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clinical and Experimental Immunology*, 37:416-423, 1979.
- KYEWski, B. A. Thymic nurse cells: possible sites of T-cell selection. *Immunology Today*, 12:374-379, 1986.
- KYEWski, B. S. & KAPLAN, H. S. Lymphoepithelial interactions in the mouse thymus: phenotypic and kinetic studies on thymic nurse cells. *Journal of Immunology*, 128:2287-2294, 1982.
- LAFAILLE, J. J.; LINSS, J.; KRIEGER, M. A.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. & GOLDENBERG, S. Structure and expression of two *Trypanosoma cruzi* genes encoding antigenic proteins bearing repetitive epitopes. *Molecular & Biochemical Parasitology*, 35:127-136, 1989.
- LAGRANGE, P. H. & HURTEL, B. The influence of BCG vaccination on murine leprosy in C57 BL/6 and C3H mice. *Annales d'Immunologie Institute Pasteur*, 130C: 687-709, 1979.
- LAGRANGE, P. H. & MACKANESS, G. B. A stable form of delayed-type hypersensitivity. *Journal of Experimental Medicine*, 141:82-96, 1975.
- LAGRANGE, P. H. & TRICKSTON, P. M. *In vivo* antitumor activity of various forms of delayed-type hypersensitivity in mice. *Journal of the National Cancer Institute*, 62:429-436, 1979.
- LAGRANGE, P. H.; TSIANG, H.; HURTREL, B. & RAVISSE, P. Delayed-type hypersensitivity to rabies virus in mice: Assay of active or passive sensitization by the footpad test. *Infection & Immunity*, 21:931-939, 1978.
- LASKY, L. A.; SINGER, M. S.; DOWBENKO, D.; IMAI, Y.; HENZEL, W.J.; GRIMLEY, C.; FENNIE, C.; GILLET, N.; WATSON, S. R. & ROSEN, S. D. An endothelial ligand for L-selectin is a novel mucin-like molecule. *Cell*, 69:927-938, 1992.
- LAUCELLA, S.; SALCEBO, R.; CASTAÑOS-VELEZ, E.; RIARTE, A.; DE TITTO, E.H.; PATARROYO, M.; ORN, A. & ROTTENBERG, M.E. Increased expression and secretion of ICAM-1 during experimental infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 18:227-239, 1996.
- LAWRENCE, M. B. & SPRINGER, T. A. Leukocytes roll on a selectin at physiologic flow rates: Distinction from and prerequisite for adhesion through integrins. *Cell*, 65:859-873, 1991.
- LEENE, W.; DE WAAL MALEFIJT, R.; ROHOLL, P. J. M. & HOEBEN, K. A. Lymphocyte depletion in thymic nurse cells: A tool to identify in situ lympho-epithelial complexes having thymic nurse cells characteristics. *Cell Tissue Research*, 253:61-68, 1988.
- LEGRÈS, L. G.; POCHON, F.; BARRAY, M.; HEINRICH, P.C.; DELAIN, E. Human α 2-macroglobulin as a cytokine-binding plasma protein. *Annals New York Academy of Sciences*, 737:439-443, 1994.
- LEGUIZAMON, M. S.; CAMPETELLA, O.; RUSSOMANDO, G.; ALMIRON, M.; GUILLEN, I.; GONZALEZ CAPPA, S. M. & FRASCH, A. C. C. Antibodies inhibiting *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase activity in sera from human infections. *Journal of Infectious Diseases*, 170:1570-1574, 1994.
- LEIGUARDA, R.; RONCORONI, A.; TARATUTO, A.L.; JOST, L.; BERTHIER, M.; NOGUES, M. & FREILIG, H. Acute CNS infection by *Trypanosoma cruzi* Chagas' disease in immunosuppressed patients. *Neurology*, 40:850-851, 1990.
- LEITE-DE-MORAES, M. C. *Étude des alterations thymiques et du répertoire des cellules T chez les souris infectées par le Trypanosoma cruzi*, 1993. Ph.D. Thesis. Paris: Université Paris V.
- LEITE-DE-MORAES, C.; HONTEBEYRE-JOSKOWICZ, M.; LÉBOULENGER, F.; SAVINO, W.; DARDENNE, M. & LEPAULT, F. Studies on the thymus in Chagas' disease. II. Thymocyte subset fluctuations in *Trypanosoma cruzi*-infected mice: relationship to stress. *Scandinavian Journal Immunology*, 33: 267-275, 1991.

- LEITE-DE-MORAES, M. C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; DARDENNE, M. & SAVINO, W. Modulation of thymocyte subsets during acute and chronic phases of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 77:95-98, 1992.
- LEITE-DE-MORAES, M. C.; MINOPRIO, P.; DY, M.; DARDENNE, M.; SAVINO, W. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Endogenous IL-10 and IFN- γ production controls thymic cell proliferation in mice acutely infected by *Trypanosoma cruzi*. *Scandinavian Journal Immunology*, 39:51-58, 1994.
- LEMESRE, J. L.; AFCHAIN, D.; OROZCO, O.; LOYENS, M.; BRENIERE, F. S.; DESJEUX, P.; CARLIER, Y.; MARTIN, U.; NOGUEIRA-QUEIROZ, A.; LE RAY, D. & CAPRON, A. Specific and sensitive immunological diagnosis of Chagas' disease by competitive antibody enzyme immunoassay using a *Trypanosoma cruzi*-specific monoclonal antibody. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 35:86-93, 1986.
- LEPOIVRE, M.; CHENAIS, B.; YAPO, A.; LEMAIRE, G.; THELANDER, L. & TENU, J. P. Alterations of ribonucleotide reductase activity following induction of nitrite-generation pathway in adenocarcinoma cells. *Journal of Biological Chemistry*, 265:14143-14149, 1990.
- LES, W. C. & VAN VOORHIS, W. C. Review: nomenclature and biologic significance of cytokines involved in inflammation and the host immune response. *Journal of Infectious Diseases*, 172:1573-1580, 1995.
- LI, Y.; PEZZANO, M.; PHILIP, D.; REID, V. & GUYDEN, J. Thymic nurse cells exclusively bind and internalize CD4⁺CD8⁺ thymocytes. *Cellular Immunology*, 140:495-506, 1992.
- LOPES, M. F. & DOS REIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: Blockade of costimulatory T cell responses in infected hosts due to defective T cell receptor-CD3 functioning. *Infection & Immunity*, 62:1484-1488, 1994.
- LOPES, M. F. & DOS REIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*-induced immunosuppression: selective triggering of CD4⁺ T-cell death by the T-cell receptor CD3 pathway and not by the CD69 or Ly-6 activation pathway. *Infection & Immunity*, 64: 1559-1564, 1996.
- LOPES, M. F.; DA VEIGA, V. F.; SANTOS, A. R.; FONSECA, M. E. F. & DOS REIS, G. A. Activation-induced CD4⁺ T cell death by apoptosis in experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 154:744-752, 1995.
- LUZ, M. R. P.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Heterogeneity on the plasma levels of two acute phase proteins in mice from inbred strains during *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Research*, 80:439-441, 1994.
- LUZ, M. R. M. P.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Heterogeneity on the synthesis of alpha-macroglobulins in outbred Swiss albino mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 81:662-667, 1995.
- McHARDY, N. Passive immunization of mice against *Trypanosoma cruzi* using convalescent mouse serum. *Tropenmedizin Parasitologie*, 28:195-201, 1977.
- MACKANESS, G. B. The immunological basis of acquired cellular resistance. *Journal of Experimental Medicine*, 120:105-120, 1964.
- MAJUMDER, S. & KIERSZENBAUM, F. Mechanisms of *Trypanosoma cruzi*-induced down-regulation of lymphocyte function. Inhibition of transcription and expression of IL-2 receptor γ (p64IL-2R) and β (p70IL-2R) chain molecules in activated normal human lymphocytes. *Journal of Immunology*, 156:3866-3874, 1996.
- MARINHO, C. R.; D'IMPERIO-LIMA, M. R.; GRISOTTO, M. G. & ALVAREZ, J. M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infection & Immunity* 67:308-318, 1999.
- MARTIN, U. O.; TAIBL, A.; LOYENS, M.; MAIDANA, C.; CORNETTE, J.; CANDOITI, C.; MARTELEUR, A.; AFCHAIN, D.; MARTY, B.; VELGE, P.; OAISSI, M. A. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: IgM antibodies to 84 kDa polypeptide epitope as a possible marker of the acute phase of human Chagas' disease. *Medical Science Research*, 18:725-726, 1990.
- MARTINEZ, O. M.; GIBBONS, R. S.; GAROVOY, M. R. & ARONSON, F. R. IL-4 inhibits IL-2 receptor expression and IL-2-dependent proliferation of human cells. *Journal of Immunology*, 144:2211-2215, 1990.
- MARTINS, G. A.; CARDOSO, M. G. A.; ALIBERTI, J. C. S. & SILVA, J. S. Nitric oxide-induced apoptotic cells death in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Immunology Letters* 63:113-120, 1998.
- MARTINS, G. A.; VIEIRA, L. Q.; CUNHA, F. Q. & SILVA, J. S. Gamma interferon modulates CD95 (Fas) and CD95 ligand (Fas-L) expression and nitric oxide-induced apoptosis during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection: a possible role in immune response control. *Infection & Immunity* 67:3864-3871, 1999.
- MARTINS, M. S.; HUDSON, L.; KRETTLI, A. U.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. Human and mouse sera recognize the same polypeptide associated with immunological resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Clinical and Experimental Immunology* 61:343-350, 1985.

- MARTINS-FILHO, O. A.; PEREIRA, M. E.; CARVALHO, J. F.; CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. Flow cytometry, a new approach to detect anti-live trypomastigote antibodies and monitor the efficacy of specific treatment in human Chagas' disease. *Clinical Diagnostic for Laboratory Immunology* 2:569-573, 1995.
- MCCABE, R. E.; MEAGHER, S. G. & MULLINS, B. T. Endogenous interferon, macrophage activation, and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infectious Diseases*, 163:912-915, 1991.
- MEDRANO-MERCATO, N.; LUZ, M. R. M. P.; CABELLO, P.; TAPIA, G. T.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Acute Chagas' disease: plasma levels of α -2-macroglobulin and C-reactive protein in children under 13 years in a high endemic area of Bolivia. *Journal of Tropical Pediatrics*, 42:68-74, 1996a.
- MEDRANO-MERCATO, N.; LUZ, M. R. M. P.; TORRICO, F. T.; TAPIA, G. T.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Acute phase proteins and serological profiles of chagasic children from an endemic area in Bolivia. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 54:154-161, 1996b.
- MENESES, A. C. O.; ROCHA, A.; FERREIRA, M. S.; NETO, A. N.; TORQUATO Jr., G.; ALMEIDA, E. A.; METZE, K.; MACIEL Jr., J. A. & LOPES, E. R. AIDS and Chagas' disease. In: *Neuropathology International Scientific Exchange*, Niteroi, 1992. p. 2.
- MENGEL, J. O.; LANS, J. L.; ROSSI, M. M. O.; ROSSI, M. A.; SAVINO, W. & RIBEIRO DOS SANTOS, R. Anticardiac muscle autoreactive lymphocytes in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* bear the CD4 phenotype. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83 (Suppl. I):167, 1988.
- MEYER ZUM BUSCHENFELDE, C.; CRAMER, S.; FLEISCHER, B.; FROSCH, S. Resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice does not necessarily correlate with production of interferon-gamma *in vivo*. *Medical and Microbiological Immunology (Berl)* 187:107-113, 1998.
- MILANI, S. R. & TRAVASSOS, L. R. Anti- α -galactosyl antibodies in chagasic patients. Possible biological significance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21:1275-1278, 1988.
- MILLER, T. E.; MACKANESS, G. B. & LAGRANGE, P. H. Immunopotentiality with BCG. II. Modulation of the response to sheep red blood cells. *Journal of the National Cancer Institute*, 51:1669-1676, 1973.
- MINOPRIO, P.; CURY-EL-CHEIKH, M.; ROSS, D.; COUTINHO, A.; EISEN, H. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICS, M. Chagas' disease: consequence of unbalanced immune system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86 (Suppl. I):39-40, 1991.
- MINOPRIO, P.; CURY-EL-CHEIKH, M.; MURPHY, E.; HONTEBERYE-JOSKOWICS, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A. & O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease in IFN- γ -dependent. *Journal of Immunology*, 151:4200-4208, 1993.
- MINOPRIO, P.; EISEN, H.; JOSKOWICZ, M.; PEREIRA, P. & COUTINHO, A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. *Journal of Immunology*, 139:545-550, 1987.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEUSSER, C.; TONEGAWA, S. & COUTINHO, A. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: the predominance of parasite-nonspecific responses and the activation of TCRI T cells. *Immunological Reviews*, 112:183-207, 1989.
- MINOPRIO, P.M.; COUTINHO, A.; JOSKOWICZ, M.; D'IMPERIO LIMA, M.R. & EISEN, H. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. II. Cytotoxic T lymphocytes. *Scandinavian Journal of Immunology*, 24: 669-679, 1986b.
- MINOPRIO, P.M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T- and B-cell responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, 24:661-668, 1986a.
- MONTÉON, V.; FURUZAWA-CARBALLEDA, J.; ALEJANDRE-AGUILAR, R.; ARANDA-FRAUSTRO, A.; ROSALES-ENCINA, J.L. & REYES, P. A. American trypanosomiasis: *in situ* and generalized features of parasitism and inflammation kinetics in a murine model. *Experimental Parasitology*, 83:267-274, 1996.
- MONTEVERDE, D.A.; TARATUTO, A.L. & LUCATELLI, N. Meningoencefalite chagásica aguda en pacientes inmunossuprimidos. *Revista Neurológica Argentina*, 2:260-266, 1976.
- MOSMANN, T. R. & SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more. *Immunology Today*, 17:138-146, 1996.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *Journal of Immunology*, 136: 2348-2355, 1986.
- MUNIZ, J. & SANTOS, M. C. F. Heterophile antibodies in American trypanosomiasis. *O Hospital*, 38:601-610, 1950.

- NABORS, G. S. & TARLETON, R. L. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 146:3591-3598, 1991.
- NGUYEN, T.; BRUNSON, D.; CRESPI, C. L.; PENMAN, B. W.; WISHNOK, J. S. & TANNENBAUM, S. R. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide *in vitro*. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89: 3030-3034, 1992.
- NICKOLOFF, B. J. Role of Interferon- γ in cutaneous trafficking of lymphocytes with emphasis on molecular and cellular adhesion events. *Archives of Dermatology*, 124:1835-1843, 1988.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z.A. *Trypanosoma cruzi*: *in vitro* induction of macrophage microbicidal activity. *Journal of Experimental Medicine*, 148:288-300, 1978.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S. & COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: the immunological induction of macrophage plasminogen activator requires thymus-derived lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine*, 146:172-183, 1977a.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S. & COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *Journal of Experimental Medicine*, 146: 157-171, 1977b.
- NOGUEIRA, N.; ELLIS, J.; CHAPLAN, S. & COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: *in vivo* and *in vitro* correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. *Experimental Parasitology*, 51:325-334, 1981.
- NORRIS, K. A.; BRADT, B.; COOPER, N. R. & SO, M. Characterization of a *Trypanosoma cruzi* C3 binding protein with functional and genetic similarities to the human complement regulatory protein, decay-accelerating factor. *Journal of Immunology* 147:2240-2247, 1991.
- NORRIS, K. A.; GALVÃO, L. M. C.; SCHRIMPF, J. E.; CANÇADO, J. R. & KRETTLI, A. U. Humoral immune response to the *Trypanosoma cruzi* complement regulatory protein as an indicator of parasitologic clearance in human Chagas' disease. *Infection & Immunity*, 62:4072-4074, 1994.
- ODDÓ, D.; CASANOVA, M.; ACUNA, G.; BALESTEROS, J. & MORALES, B. Acute Chagas' disease, trypanosomíasis americana, in acquired immunodeficiency syndrome: report of two cases. *Human Pathology*, 23:41-44, 1992.
- OHMACHI, Y.; NOMOTO, K.; YAMADA, H. & TAKEYA, K. Relationship among differentiated T-cell sub-populations. I - Dissociated development of tuberculin-type hypersensitivity, Jones-Mote hypersensitivity and activation of helper function. *Immunology*, 31:101-110, 1976.
- OKABE, K.; KIPNIS, T. L.; CALICH, V. L. G. & DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigotes bloodstream forms. *Clinical Immunology & Immunopathology*, 46:344-353, 1980.
- OLIVEIRA-DOS-SANTOS, A. J. *Interações celulares heterotípicas durante a diferenciação intratímica de linfócitos T: estudo em camundongos nocautes*, 1997. Tese de Doutorado. Programa de Biologia Celular e Molecular, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKS, D. E.; RODRIGUEZ, M. & WEIGLE, W. O. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 124:121-126, 1980.
- OUAISSI, M. A. Role of RDG sequence in parasite adhesion to host cells. *Parasitology Today*, 4:169-173, 1988.
- OUAISSI, M. A.; CORNETTE, J.; AFCHAIN, D.; CAPRON, A.; GRAS-MASSE, H. & TARTAR, A. *Trypanosoma cruzi* infection inhibited by peptides modeled from a fibronectin cell attachment domain. *Science*, 234:603-306, 1986.
- PARANHOS-BACALLA, G. S.; SANTOS, M. R. M.; COTRIM, P. C.; RASSI, A.; JOLIVET, M.; CAMARGO, M. E. & DA SILVEIRA, J. F. Detection of antibodies in sera from Chagas' disease patients using a *Trypanosoma cruzi* immunodominant recombinant antigen. *Parasite Immunology*, 16:165-169, 1994.
- PATRUÇO, A.; CERISOLA, J. A.; MICHEL, M.; CHIALE, P.; ALVAREZ, M. & SEGURA, E. L. Flagellar antigens and the leucocyte migration-inhibition test in Chagas patients. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 72:425-426, 1978.
- PELEMAM, R.; WU, J.; FARGEAS, C. & DELESPESE, G. Recombinant IL-4 suppresses the production of IFN- γ by human mononuclear cells. *Journal of Experimental Medicine*, 170:1751-1756, 1989.
- PENNINGER, J. & WICK, G. Thymic nurse cell lymphocytes react against self major histocompatibility complex. *European Journal of Immunology*, 22:79-83, 1992.
- PEREIRA, N. M.; TIMM, S. L.; GONÇALVES DA COSTA, S. C.; REBELLO, M. & DE SOUZA, W. *Trypanosoma cruzi*: isolation and flagellar fractions. *Experimental Parasitology*, 46:225-234, 1978.
- PETRY, K.; SCHOTTELIUS, J. & BALTZ, T. H. Characterization of a 19.000 mol. wt. flagellum-specific protein of *Trypanosoma cruzi*, *Trypanosoma dionisii* and *Trypanosoma vesperilionis* by monoclonal antibody. *Parasitology Research*, 73:180-181, 1987.

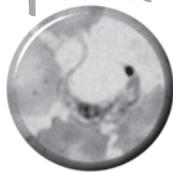
- PHILIP, D.; PEZZANO, M.; LI, Y.; OMENE, C.; BOTO, W. & GUYDEN, J. The binding, internalization, and release of thymocytes by thymic nurse cells. *Cellular Immunology*, 148:301-315, 1993.
- PIMENTA DE MELLO, R. A new method for detection of cancer cells in peripheral blood using the Bertalanffy's fluorochrome method. *Acta Cytologica*, 7:62-65, 1963.
- PIRAS, M. P.; DE RODRIGUEZ, O. O. & PIRAS, R. *Trypanosoma cruzi* antigenic composition of axonemes and flagellar membranes of epimastigotes culture *in vitro*. *Experimental Parasitology*, 51:59-73, 1981.
- PIZZI, T.; CROIZET, V. A.; SMOK, G. & DIAS, M. Enfermedad de Chagas en un paciente con transplante renal y tratamiento inmunosupresor. *Revista Medica do Chile*, 110:1207-1211, 1982.
- POWELL, M. R.; MORGAN, J.; GUARNER, J. & COLLEY, D.G. Cytokine mRNA levels in the hearts of inbred mice that develop different degrees of cardiomyopathy during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology* 20:463-471, 1998.
- REED, S. G. *In vivo* administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal of Immunology*, 140: 4342-4347, 1988.
- REED, S.G. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. *Chemical Immunology* 70:124-143, 1998.
- REED, S. G.; BROWNELL, C. E.; RUSSO, D. M.; SILVA, J. S.; GRABSTEIN, K. H. & MORRISSEY P. J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Immunology*, 153:3135-3140, 1994.
- REED, S. G.; NATHAN, C. F.; PIHL, D. L.; RODRICK, S. P.; SHANEBECK, K.; CONLON, P. J. & GRABSTEIN, K. H. Recombinant granulocyte/macrophage colony-stimulating factor activates macrophages to inhibit *Trypanosoma cruzi* and release hydrogen peroxide. *Journal of Experimental Medicine*, 166:1734-1746, 1987.
- REED, S. G.; PIHL, D. L. & GRABSTEIN, K. H. Immune deficiency in chronic *Trypanosoma cruzi* infection. Recombinant IL-1 restores Th function for antibody production. *Journal of Immunology*, 142:2067-2071, 1989.
- REVELLI, S.; GOMEZ, L.; WIETZERBIN, J.; BOTTASSO, O. & BASOMBRIO, M. A. Levels of tumor necrosis factor alpha, gamma interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent or attenuated strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research* 85:147-150, 1999.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; ROSSI, M. A.; LAUS, J. L.; SANTANA-SILVA, J.; SAVINO, W. & MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal Experimental Medicine*, 175:29-39, 1992.
- ROCHA, A.; MENEZES, A. C.O.; SILVA, A. M.; FERREIRA, M. S.; NISHIOKA, S. A.; BURGARELLI, M. K. N.; ALMEIDA, E.; TURCATO Jr, G.; METZE, K. & LOPES, E. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 50:261-268, 1994.
- ROCKETT, K. A.; AWBURN, M. M.; ROCKETT, E. J.; COWDEN, W. B. & CLARK, I.A. Possible role of nitric oxide in malarial immunosuppression. *Parasite Immunology*, 16:243-249, 1994.
- ROMAÑA, C. Contribuição ao conhecimento da patogenia da tripanosomose americana: período inicial de infecção. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 39:253-264, 1943.
- ROSEMBERG, S.; CHAVES, C. J.; HIGUSHI, M. L.; LOPES, M. B. S.; CASTRO, L. H. M. & MACHADO, L. R. Fatal meningoencephalitis caused by reactivation of *Trypanosoma cruzi* infection in a patient with AIDS. *Neurology*, 42:640-642, 1992.
- ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H. & ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Infection & Immunity*, 61:5129-5133, 1993.
- RUIZ, A. M.; ESTEVA, M.; CABEZA MECKERT, P. & LAGUENS, M. Protective immunity and pathology induced by inoculation of mice with different subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, 42:299-309, 1985.
- RUSSO, M. & STAROBINAS, N. Macrophage activation and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Research on Immunology*, 142:144-146, 1991.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; MINOPRIO, P.; COUTINHO, A. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi* infected mice after inactivation of helper T cells. *Annales d' Immunologie Institute Pasteur*, 139:225-236, 1988.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MINOPRIO, P.; EISEN, H. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 11:385-395, 1989.
- SALOMON, J. C. & CREAM-GOLDBERG, N. Treatment of primary methylcholanthrene induced tumors by intramural BCG. In: Israel, Lagrange & Salomon, *Cancer Immunology and Parasite Immunology*, INSERM, 97:255-265, 1980.

- SANDERSON, C. J.; LOPEZ, A. F. & BUNN MORENO, M. M. Eosinophils and not lymphoid K cells kill *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Nature*, 268: 340-341.
- SANTOS-LIMA, E. C. & MINOPRIO, P. Chagas' disease is attenuated in mice lacking gamma delta T cells. *Infection & Immunity* 64:215-221, 1996.
- SARIH, M.; SOUVANNAVONG, V. & ADAM, A. Nitric oxide synthase induces macrophage death by apoptosis. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 191:503-508, 1993.
- SAVINO, W. The thymic microenvironment in infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:255-260, 1990.
- SAVINO, W.; LEITE DE MORAES, M. C.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. & DARDENNE, M. Studies on the thymus in Chagas' disease. I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *European Journal of Immunology*, 19:1727-1733, 1989.
- SAVINO, W.; LEITE DE MORAES, M. C.; SILVA BARBOSA, S. D.; FONSECA, E. C.; COTTA DE ALMEIDA, V. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Is the thymus a target organ in infectious diseases. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87 (Suppl. V):73-78, 1992.
- SAVINO, W.; VILLA VERDE, D. M. S. & LANNES VIEIRA, J. Extracellular matrix proteins in intrathymic T cell migration and differentiation? *Immunology Today*, 14:158-161, 1993.
- SCHARFSTEIN, J.; BARCINSKI, M. A. & LEON, L. L. Indication of the acute-phase protein serum amyloid P in experimental Chagas' disease. *Infection & Immunity*, 35:46-51, 1982.
- SCHLAEPPI, K.; DEFLOIRIN, J. & SEEBECK, T. The major component of the paraflagellar rod of *Trypanosoma brucei* is a helical protein that is encoded by two identical, tandemly linked genes. *Journal of Cell Biology* 109(4 Pt 1):1695-1709, 1989.
- SCHLEIFER, K. W. & MANSFIELD, J. M. Suppressor macrophages in African trypanosomiasis inhibit T cell proliferative responses by nitric oxide and prostaglandins. *Journal of Immunology*, 151:5492-5503, 1993.
- SCHMUNIS, G. A.; CAPP, S. M. G.; TRAVERSA, O. C. & JANOVSKY, K. The effects of immuno-depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 65:89-94, 1971.
- SCOTT, M. T. Delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* in mice: specific suppressor cells in chronic infection. *Immunology* 44:409-417, 1981.
- SCOTT, M. T. & GOSS-SAMPSON, M. Restricted IgG isotype profiles in *Trypanosoma cruzi* infected mice and Chagas' disease patients. *Clinical Experimental Immunology*, 58:372-379, 1984.
- SEGURA, E. L.; CURA, E. N.; PAULONE, L.; VAZQUEZ, C. & CERISOLA, J. A. Antigenic makeup of subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Protozoology*, 21:571-574, 1974.
- SEGURA, E. L.; VAZQUEZ, C.; BRONZINA, A.; CAMPOS, J. M.; CERISOLA, J. A. & GONZALEZ CAPP, S. M. Antigens of the subcellular fractions of *Trypanosoma cruzi*. II - Flagellar and membrane fraction. *Journal of Protozoology*, 24:540-543, 1977.
- SICHER, C. S.; VAZQUEZ, M. A. & LU, C. Y. Inhibition of macrophage Ia expression by nitric oxide. *Journal of Immunology*, 153:1293-1300, 1994.
- SILVA, A. C.; ESPINOZA, A. G.; TAIBI, A.; OUAISSI, A.; MINOPRIO, P. A 24,000 MW *Trypanosoma cruzi* antigen is a B-cell activator. *Immunology* 94:189-196, 1998.
- SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D. & REED, S. G. IL-10 and IFN- γ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 175:169-174, 1992.
- SILVA, J. S.; TWARDZIK, D. R. & REED, S. G. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by TGF- β . *Journal of Experimental Medicine*, 174: 539-545, 1991.
- SILVA, J. S.; VESPA, G. N.; CARDOSO, M. A.; ALIBERTI, J. C. & CUNHA, F. Q. TNF- α mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected IFN- γ -activated macrophages. *Infection & Immunity*, 63:4862-4867, 1995.
- SILVERSTEIN, A. M. *A history of immunology*. New York: Acad. Press, 1989. p. 269.
- SNAPPER, C. M. & MOND, J. J. A model for induction of T-cell independent humoral immunity in response to polysaccharide antigens. *Journal of Immunology*, 157: 2229-2233, 1996.
- SPINELLA, S.; LIEGEARD, P. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Predominance of IgG2a in nonspecific humoral response during experimental Chagas' disease. *Experimental Parasitology*, 74:6-56, 1992.

- SPINELLA, S.; MILON, G. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. A CD4⁺ Th2 cell line isolated from mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi* induces IgG2 polyclonal response *in vivo*. *European Journal of Immunology*, 20:1045-1051, 1990.
- SPRENT, J.; LO, D.; GAO, E.-K. & RON, Y. T cell selection in the thymus. *Immunological Reviews*, 101:73-190, 1988.
- STADNYK, A. & GAULDIE, J. The acute phase protein response during parasitic infection. *Immunology Today* 12:A7-A12, 1991.
- STAROBINAS, N.; RUSSO, M.; MINOPRIO, P. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Is TNF- α involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Research in Immunology*, 142:177-122, 1991.
- STEEL, D. M. & WHITEHEAD, A. S. The major acute phase reactants: C-Reactive protein, serum amyloid P component and serum amyloid A protein. *Immunology Today*, 15:81-87, 1994.
- STEFANI, M. M. A.; MÜLLER, I. & LOUIS, J. *Leishmania major*-specific CD8⁺ T cells are inducers and targets of nitric oxide produced by parasitized macrophages. *European Journal of Immunology*, 24:746-752, 1994.
- STERNBERG, J. & MCGUIDAN, F. Nitric oxide mediates suppression of T cell responses in murine *Trypanosoma brucei* infection. *European Journal of Immunology*, 22:2741-2744, 1992.
- STOUT, R. D. & BOTTOMLY, K. D. Antigen specific activation of effector macrophages by IFN- γ producing Th1. T cell clones. Failure of IL-4-producing Th2. T cell clones to activate effector function in macrophages. *Journal of Immunology*, 142:760-765, 1989.
- SZARFMAN, A., TERRANOVA, V. P., RENNARD, S. I., FOIDART, J.-M., LIMA, M. F., SCHEINMAN, J. ., MARTIN, G. R. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *Journal of Experimental Medicine* 155:1161-1171, 1982.
- TAIBI, A.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; SCHONECK, R.; YAHIAOUI, B. & OUAISSI, A. Improved specificity of *Trypanosoma cruzi* identification by polymerase chain reaction using an oligonucleotide derived from the amino-terminal sequence of a Tc24 protein. *Parasitology* 111:581-590, 1995.; errata em *Parasitology*, 112:437, 1996.
- TAKEHARA, H. A.; PERINI, A.; DA SILVA, M. H. & MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. *Journal of Experimental Medicine*, 52:137-146, 1981.
- TAKLE, G. B. & HUDSON, L. Autoimmunity and Chagas' disease. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 145:79-92, 1988.
- TAMBOURGI, D. V.; KIPNIS, T. L. & DIAS DA SILVA, W. *Trypanosoma cruzi*: antibody-dependent killing of bloodstream trypomastigotes by mouse bone marrow-derived mast cell and by mastocytoma cells. *Experimental Parasitology*, 68:192-201, 1989.
- TANAKA, Y.; ADAMS, D. H. & SHAW, S. Proteoglycans on endothelial cells present adhesion-inducing cytokines to leukocytes. *Immunology Today*, 14: 111-115, 1993.
- TANOWITZ, H. B.; KIRCHHOFF, L. V.; SIMON, D.; MORRIS, S. A.; WEISS, L. M. & WITTNER, M. Chagas' disease. *Clinical Microbiology Review*, 5: 400-419.
- TAPIA, F. J., CÁCERES-DIFFMAR, G. & SÁNCHEZ, M. A. 1994. Inadequate epidermal homing leads to tissue damage in human cutaneous leishmaniasis. *Immunology Today*, 15:160-165, 1992.
- TARLETON, R. L. Tumor necrosis factor cachectin. Production during experimental Chagas' disease. *Clinical Experimental Immunology*, 73:186-190, 1988.
- TARLETON, R.L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 144:717-724, 1990.
- TARLETON, R.L. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. *Experimental Parasitology*, 73:106-109, 1991.
- TARLETON, R.L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Today*, 1:7-9, 1995.
- TARLETON, R. L.; KOHLER, B. H.; LATOUR, A. & POSTAN, M. Susceptibility of β_2 -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*, 356:338-340, 1992.
- TARLETON, R. L.; SUN, J.; ZHANG, L. & POSTAN, M. Depletion of T-cell subpopulations results in exacerbation of myocarditis and parasitism in experimental Chagas' disease. *Infection & Immunity*, 62:1820-1829, 1994.
- TRUYENS, C.; ANGELO-BARRIOS, A.; TORRICO, F.; VAN DAMME, J.; HEREMANS, H. & CARLIER, Y. Interleukin-6 production in mice infected with *Trypanosoma cruzi*: effect of its paradoxical increase by anti-IL-6 monoclonal antibody treatment on infection and acute-phase and humoral response. *Infection & Immunity*, 62:692-696, 1994.
- TRUYENS, C.; RIVERA, M. T.; OUAISSI, A. & CARLIER, Y. High circulating levels of fibronectin and antibodies against its RDG adhesion site during mouse *Trypanosoma cruzi* infection: relation to survival. *Experimental Parasitology*, 80 499-506, 1995.

- UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. *Immunological Letters*, 17:85-89, 1988.
- VANDEKERCKHOVE, F.; DARJI, A.; RIVERA, M. T.; CARLIER, Y.; VRAY, B.; BILLIAU, A. & DE BAETSELIER, P. Modulation of T-cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection: analysis in different lymphoid compartments. *Parasite Immunology*, 16:77-85, 1994.
- VAN DE WIJNGAERT, F. P.; KENDALL, M. D.; SCHUURMAN, H.-J.; RADEMAKERS, L. H. P. M. & KATER, L. Heterogeneity of epithelial cells in the human thymus. An ultrastructural study. *Cell Tissue Research*, 237:227-237, 1984.
- VAN VLIET, E.; MELIS, M. & EWIJK, W. V. Immunohistology of thymic nurse cells. *Cellular Immunology*, 87:101-109, 1984.
- VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. Q. & SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite *in vitro*. *Infection & Immunity*, 62:5177-5182, 1994.
- VILALTA, E.; ZHANG, Y.; BIBB, K. E.; KAPPES, J. C. & LIMA, M. F. The cysteine-cysteine family of chemokines RANTES, MIP-1 α and MIP-1 β induce trypanocidal activity in human macrophages via nitric oxide. *Infection & Immunity* 66:4690-4695, 1998.
- VILLA-VERDE, D. M. S.; MELLO COELHO, V.; LAGROTA-CANDIDO, J.; CHAMMAS, R. & SAVINO, W. The thymic nurse cell complex: an *in vitro* model for extracellular matrix-mediated intrathymic T cell migration. *Brazilian Journal of Medical Biology Research*, 28:2259, 1995.
- VON BOEHMER, H. & KISIELOW, P. Lymphocyte lineage commitment: instruction *versus* selection. *Cell*, 73:207-208, 1993.
- VON BOEHMER, H.; SWAT, W. & KISIELOW, P. Positive selection of immature T cells. *Immunological Reviews*, 135:67-79, 1993.
- WEKERLE, H. & KETELSEN, U-P. Thymic nurse cells-Ia-bearing epithelium involved in T-lymphocyte differentiation? *Nature*, 283:402-404, 1980.
- WICK, G. & OBERHUBER, G. Thymic nurse cells: a school for alloreactive and autoreactive cortical thymocytes? *European Journal of Immunology*, 16:855-858, 1986.
- WICK, G.; RIEKER, T. & PENNINGER, J. Thymic nurse cells: a site for positive selection and differentiation of T cells. *Current Topics in Microbiology & Immunology*, 173:99-105, 1991.
- WIRTH, J. J. & KIERSZENBAUM, F. Fibronectin enhances macrophage association with invasive forms of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 133:460-464, 1984.
- WIRTH, J. J. & KIERSZENBAUM, F. Recombinant tumor necrosis factor enhances macrophage destruction of *Trypanosoma cruzi* in the presence of bacterial endotoxin. *Journal of Immunology*, 141:286-288, 1988.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing the parasitemia and survival. *Infection & Immunity*, 36:637-644, 1982.
- WU, L.; SCOLLAY, R.; EGERTON, M.; PEARSE, M.; SPANGRUDE, G. J. & SHORTMAN, K. CD4 expressed on earliest T-lineage precursor cells in the adult murine thymus. *Nature*, 349:71-74, 1991.
- ZHANG, L. & TARLETON, R. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by *in situ* immunohistochemistry: lack of dissociation between susceptibility and type 2 cytokine production. *European Journal of Immunology*, 26:102-109, 1996.

Capítulo 5



Hormônios na Doença de Chagas

5.1

Sistema Adrenérgico

Mecia M. Oliveira

Neste capítulo iremos discutir o conhecimento atual, que resulta de estudos em pacientes e em modelos experimentais, sobre a participação do sistema adrenérgico na etiopatogenia da doença de Chagas. Este é um tópico controverso, que vem se desenvolvendo desde o reconhecimento desta doença como uma entidade nosológica diversa de outras síndromes. A literatura especializada neste assunto é muito vasta, sendo impossível mencioná-la em sua totalidade. Sugerimos para consulta duas excelentes revisões (PAHO, 1994; Rassi, 1995). O consenso atual sobre a etiopatogenia desta doença é que esta é o resultado multifatorial da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* e da reação do paciente afetado.

O sistema adrenérgico (simpático) e o sistema colinérgico (parassimpático), formam o sistema nervoso autônomo, também chamado sistema nervoso visceral, vegetativo ou involuntário. Sua representação anatômica consiste de gânglios e plexos que provêm a inervação do coração, vasos sanguíneos, glândulas, outras vísceras e músculo liso. Os dois sistemas, através de seus mediadores químicos exercem funções opostas, regulando as atividades de estruturas que não estão sob controle voluntário, funcionando abaixo do nível da consciência, como respiração, circulação, digestão, temperatura corporal, metabolismo, etc. Como Claude Bernard enfatizou, a constância do meio interno, a homeostase de um organismo é principalmente controlada pelo sistema nervoso autônomo (Mello-Aires, 1991).

Além dos efeitos farmacodinâmicos, a adrenalina (mediador químico adrenérgico) e seus congêneres produzem uma gama de efeitos metabólicos. Para que a adrenalina exerça suas funções, existe uma bem orquestrada série de reações em que, primeiramente, este neurotransmissor é reconhecido pelo seu receptor específico ao nível da membrana da célula-alvo, iniciando uma cascata de eventos em que o sinal químico extracelular é transduzido para o interior da célula numa complexa cascata de reações. Os receptores para a adrenalina são diversos em sua estrutura e conferem especificidade funcional à cascata de sinalização, utilizando diferentes segundos-mensageiros celulares. Por exemplo, os receptores do tipo β -adrenérgicos têm o AMP cíclico (cAMP) como segundo mensageiro celular (Sutherland, 1972). Esta função, nos receptores α -adrenérgicos, é exercida por inositol-trifosfato e diacilglicerol (Nishizuka, 1992; Berridge, 1993). Em todos os casos, estes compostos estimulam proteíno-quinases, que ao fosforilar proteínas do acervo de cada célula, provocam os efeitos metabólicos e farmacodinâmicos das catecolaminas (Pelech, 1993).

5.1.1 Alterações do Sistema Adrenérgico em Pacientes Chagásicos

Chagas & Vilella (1922) observaram alterações nos batimentos cardíacos de pacientes chagásicos; talvez este tenha sido o começo da teoria do comprometimento do sistema nervoso autônomo na doença da Chagas. O comprometimento adrenérgico na cardiopatia chagásica foi postulado a partir do reconhecimento da desnervação dos gânglios colinérgicos cardíacos. Com esta destruição haveria um desequilíbrio do sistema nervoso autônomo cardíaco, com predominância relativa do sistema simpático, que atuando sem o necessário antagonismo do sistema parassimpático, submeteria a fisiologia cardíaca a um ritmo de trabalho antieconômico. Este postulado é parte da “teoria da desnervação” desenvolvida por Köberle (1958, 1968, 1970), a partir de achados anátomo-patológicos, que explicariam: as várias manifestações clínicas da doença, a cardiopatia, o megasôfago e o megacólon. Outra interpretação do aumento dos níveis plasmáticos de substâncias adrenérgicas em pacientes chagásicos (Iosa et al., 1989) seria a de que na doença de Chagas haveria um bloqueio dos receptores adrenérgicos, resultando em elevação das concentrações plasmáticas neurotransmissoras, produzindo desnervação autonômica (Iosa et al., 1990).

A patologia da cardiopatia chagásica mostra, no estágio inicial, alterações eletrocardiográficas representadas por graus discretos de retardo da condição átrio-ventricular ou no ramo direito, anormalidades da repolarização ventricular e ocorrência de extra-sístoles ventriculares unifocais, que se desenvolvem, na cardiopatia crônica, para graves e complexas alterações no eletrocardiograma. Esta fase se encontra associada com a grande deteriorização do miocárdio, geralmente progressiva, com redução importante de células cardíacas e diminuição progressiva da função contrátil, por excessiva distensão das células remanescentes. Finalmente a contração do miocárdio se vê limitada por extensas áreas de fibrose (Laranja et al., 1956; Dias, 1989; Andrade & Andrade, 1993). Contudo, o mecanismo preciso que produz essa destruição está ainda sujeito a controvérsias.

Outros estudos sugerem a presença de mecanismos imunológicos que também produziriam lesões no sistema nervoso autônomo (Teixeira et al., 1975; Ribeiro dos Santos & Hudson, 1981; Petry & Van Voorhis, 1991). Uma interessante revisão sobre este assunto foi escrita por Brener & Krettli (1990). Dentro deste contexto, Borda et al. (1984) isolaram um anticorpo específico contra receptores β -adrenérgicos de soro de pacientes chagásicos. O mesmo grupo mostrou que este anticorpo pode se ligar especificamente a receptores β -adrenérgicos no coração de cobaias. Além do mais, pode interagir com o complexo receptor-adenilato ciclase, induzindo a atividade desta enzima e então simulando os efeitos biológicos das catecolaminas. Posteriormente, o mesmo grupo (Pascual et al., 1987) mostrou que esta imunoglobulina produz um aumento na contratilidade do miocárdio, com um aumento paralelo ao nível de cAMP e modulação das proteínas transportadoras de íons. Eles também mostraram que os efeitos são inibidos por bloqueadores de receptores β -adrenérgicos. Os autores deste estudo propõem que a patogênese da cardiomiopatia chagásica se deve a alterações da função cardíaca normal pela interação dos anticorpos com receptores para neurotransmissores no coração. Esta proposta é interessante e outros estudos são necessários para sua confirmação.

5.1.2 Alterações no Sistema Adrenérgico em Doença de Chagas Experimental

O uso de modelos animais em que a doença é reproduzida tem trazido importantes subsídios para o conhecimento da etiopatogenia chagásica e o surpreendente reconhecimento das variadas reações que dependem do acervo genético do hospedeiro e também da cepa de *T. cruzi* utilizada. Um fato comum em todos os casos é que a severidade das lesões ganglionares do sistema nervoso vegetativo se correlaciona com a intensidade do processo inflamatório e do parasitismo. As lesões observadas em camundongos (Tafari, 1970), cães (Andrade et al., 1984),

macacos (Falasca et al., 1990), ratos (Chapadeiro et al., 1988), coelhos (Teixeira et al., 1983) etc., são similares às encontradas em humanos (Andrade, 1994) (ver Capítulo 9). Embora muito trabalho tenha sido investido nesta questão, ainda é difícil determinar se é o sistema nervoso autônomo ou a fibra miocárdica que é primariamente afetada, e qual dentre estas duas alterações é a causa primária de insuficiência cardíaca.

Outro enfoque experimental foi utilizado para responder à questão se as cardiopatias chagásicas se devem a um *overdrive* do sistema nervoso simpático. Foram realizados experimentos de administração crônica de substâncias adrenérgicas em animais de laboratório, com acompanhamento da evolução por anatomia patológica. Os resultados mostraram extraordinárias semelhanças entre as alterações morfológicas macro e microscópicas, particularmente na presença de “aneurisma de ponta” da cardiopatia chagásica crônica e da cardiopatia experimental por administração de drogas simpaticomiméticas (estimulantes dos β -receptores adrenérgicos), sugerindo fortemente que ambas pudessem ter a mesma patogenia (Oliveira, 1969). Estes dados são muito interessantes e deveriam ser mais estudados, podendo levar a uma estratégia terapêutica, visando a uma melhoria do estado físico de pacientes com doença de Chagas.

5.1.3 Sistema Adrenérgico em *T. cruzi*

Um conceito já bem estabelecido na biologia moderna é o de que sistemas de modulação e controle de metabolismo podem ser detectados nos estágios iniciais da evolução. O cAMP, segundo mensageiro celular do sistema adrenérgico, além de suas funções bem conhecidas em eucariontes superiores, tem também um papel regulatório em organismos unicelulares, inclusive em protozoários parasitas. Uma excelente revisão sobre este assunto foi feita por De Castro & Luz (1993).

Todos os componentes da transdução de sinal do sistema adrenérgico já foram descritos em *T. cruzi*. Primeiramente a adenilciclase foi descrita pelo grupo de W. Colli (Da Silveira et al., 1977) em frações de membrana, seguido pelo grupo de Torres (Torruella et al., 1986). Ainda o primeiro grupo demonstrou flutuações no nível de cAMP e de cAMP-fosfodiesterase (Gonçalves et al., 1980) durante a fase de cultura de epimastigotas.

O acoplamento funcional do estímulo adrenérgico com uma resposta no protozoário foi primeiramente descrito por Oliveira et al. (1984), quando demonstramos uma inibição de proliferação de epimastigotas quando os níveis intracelulares de cAMP estavam aumentados, quer por estímulo por isoproterenol (ligante adrenérgico), por administração do análogo permeante do cAMP ou por inibição da enzima cAMP-fosfodiesterase. Essencialmente os mesmos resultados foram obtidos com amastigotas *in vitro*. O efeito do isoproterenol era revertido por propanolol e alprenolol, sugerindo um efeito mediado por receptores β -adrenérgico (De Castro et al., 1987). Efetivamente, estes receptores foram identificados utilizando-se o método de ligação específica (De Castro & Oliveira, 1987). Recentemente o receptor adrenérgico de *T. cruzi* foi clonado e expresso num sistema heterólogo (Krieger et al., 1995).

Esses resultados, em conjunto, apontam para um controle inibitório da proliferação de *T. cruzi* exercido por um sistema adenilciclase/cAMP, mediado por ligantes adrenérgicos. O controle positivo de proliferação é exercido pelo outro sistema sinalizador, ocorrendo uma interação dos dois sistemas (Oliveira et al., 1993).

Além da proliferação, o cAMP também modula a diferenciação celular de *T. cruzi*. Este fato foi observado na transformação de amastigotas para epimastigotas (De Castro et al., 1987) e de epimastigotas para tripomastigotas (Rangel-Aldao et al., 1983, 1987; Gonzales-Perdomo et al., 1988). É importante notar que a forma tripomastigota (não-replicativa) apresenta níveis maiores de adenilciclase que as outras, resultados revelados por citoquímica ultra-estrutural (De Castro et al., 1991).

Presentemente não se conhece qual seria a eventual contribuição deste controle adrenérgico da biologia de *T. cruzi* para o desenvolvimento da patologia encontrada na doença de Chagas.

5.1.4 Sistema Adrenérgico na Interação *T. cruzi*-Hospedeiro

Neste item, a maioria dos trabalhos vem do laboratório de Kierszenbaum, que essencialmente demonstrou que níveis aumentados de cAMP inibem a interação parasita-macrófago. A bibliografia é extensa e apenas citaremos dois trabalhos (Wirth & Kierszenbaum, 1982; Ayala & Kierszenbaum, 1990) publicados por este grupo. Outro grupo que vem se dedicando a este assunto é o de Morris et al. (1988, 1992) cujos esforços são concentrados em seguir alterações do sistema adenilciclase no hospedeiro. Devido à sua grande importância, este assunto certamente necessita de mais pesquisa.



5.2

Hormônios Sexuais

Solange Lisboa de Castro & Elen Mello de Souza

O dimorfismo sexual na resistência ou susceptibilidade a várias infecções foi relatado por diferentes grupos de pesquisa. Apesar de mecanismos sociais e epidemiológicos serem responsáveis por algumas dessas diferenças associadas ao sexo, tem sido evidenciada a interação entre o ambiente hormonal do hospedeiro modulando o sistema imunológico (Bundy, 1988; Roberts et al., 1996).

A incidência e a gravidade de infecções em mulheres é menor que em homens no caso dos seguintes patógenos: *Nocardia brasiliensis* (Hernández-Hernández et al., 1995), *Leishmania* (Lynch et al., 1982), *Paracoccidoides brasiliensis* (Restrepo et al., 1984), *Coccidioides immitis* (Drutz & Catanzaro, 1978; Barbee et al., 1991) e *Tricophyton mentagrophytes* (Jones, 1983). Em animais de experimentação, fêmeas têm tendência a uma maior resistência a infecções causadas por *Trypanosoma rhodesiense* (Greenblatt & Rosentreich, 1984), *Giardia lamblia*, e maior susceptibilidade a *Plasmodium* (Goble & Knopka, 1973), *Toxoplasma gondii* (Kitta et al., 1984; Roberts et al., 1995) e *Schistosoma mansoni* (Eloi-Santos et al., 1992). Diferentes situações fisiológicas nas quais ocorrem alterações nos níveis de hormônios sexuais – gravidez, suplementação com estrogênio e etapas do ciclo menstrual – podem também afetar tanto a aquisição como o curso de infecções bacterianas (Kass, 1960), fúngicas (Vaughan & Ramirez 1951) e virais. De um modo geral, ocorre predisposição a uma maior susceptibilidade a infecções em situações de alto teor endógeno de estrogênio (revisado por Styrt & Sugarman, 1991).

Vários trabalhos mostraram também que a administração exógena de hormônio altera a resistência de animais de experimentação. Foi relatada queda na resistência após tratamento de camundongos infectados com *T. gondii* (Pung & Luster, 1986), *Listeria monocytogenes* (Pung et al., 1984, 1985), *Trichinola spiralis* (Luebke et al., 1984), *Chlamydia trachomatis* (Rank et al., 1982), *Staphylococcus* (Toivanen 1967), *Tritrichomonas foetus* (St.Claire et al., 1994; Van Ando et al., 1996), *T. danilewsky* (Wang & Boosevic, 1994), *Gonococcus* (Kitta et al., 1985), *Mycoplasma hominis* (Furr & Robinson, 1989) e *Trichomonas vaginalis* (El-Boulaqi et al., 1984). Por outro lado,

tratamento com estradiol aumentou a resistência de infecções causadas por *P. yoeli* e *P. vinckei* (Cottrel et al., 1977), *Babesia microti* (Benten et al., 1992), *T. lewisi* (Maukau 1975), *Pneumococcus*, *Pausterela* spp. e *Salmonela* spp. (Nicol et al., 1964).

O ambiente hormonal do hospedeiro pode também influir no curso de diferentes infecções por uma ação direta sobre o agente infectante (revisto por De Castro & Luz, 1993), uma vez que já foi apontada a possibilidade de interação entre *receptor-like* em patógenos com hormônios sexuais de mamíferos.

As evidências clínicas de interação entre o sistema imune e o eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal estão baseadas no dimorfismo sexual que existe na resposta imune, na prevalência de diversas doenças auto-imunes em mulheres e na alteração desta resposta durante a gravidez. Altos níveis de estrogênios causam aumento da secreção de hormônio do crescimento, da liberação de prolactina e de timosina – envolvidas no desenvolvimento de linfócitos – e estimulam funções T e B. É sugerido que o aumento da resposta imune em mulheres permite compensar o aumento de estresse fisiológico que acompanha a reprodução (revisto por Grossman, 1989). O estradiol provavelmente altera a resposta imune durante a gravidez devido a ações sobre diferentes populações celulares de órgãos linfóides (Shinomiya et al., 1991).

De um modo geral, fêmeas têm resposta imune humoral superior a machos, resultando em altos níveis de imunoglobulinas (Butterworth et al., 1967; Rowe et al., 1968; Buckley & Dorsey, 1971; Eidinger & Garrett, 1972). Também a resposta celular é maior em fêmeas, como pode ser observado pela rejeição mais rápida de enxertos, maior capacidade de regressão e menor incidência de certos tipos de tumores (Brent & Medawar, 1966). Por outro lado, o mesmo mecanismo que reduz o risco de infecção em mulheres pode também trazer maior susceptibilidade a várias doenças auto-imunes, como lupus eritematoso sistêmico, diabetes insulina-dependente e artrite reumatóide (Ahmed et al., 1985; Homo-Delarche et al., 1991).

5.2.1 Doença de Chagas e Relatos sobre Diferenças entre Sexos

Devido à sua heterogeneidade, a doença de Chagas se apresenta como um bom modelo de estudo para os fenômenos de resistência natural e influência do sexo. Variações na susceptibilidade do hospedeiro ante diferentes cepas do parasita, bem como a influência da constituição genética, idade, sexo, gravidade da fase aguda e estado imunológico do paciente, influenciam no curso da infecção (revisto por Dias, 1992).

Existem na literatura vários relatos de diferenças no curso da infecção chagásica entre homens e mulheres:

- Puffer & Griffith (1968), em área endêmica de Brasília, acompanharam a mortalidade específica por doença de Chagas em 10.000 indivíduos, encontrando os valores de 101,3 para mulheres e 234,0 para homens;
- Widmer & Azevedo (1972), analisando cortes histológicos do coração de 346 chagásicos, observaram que em mulheres ninhos de amastigotas são encontrados em menor número;
- Oliveira et al. (1981), estudando populações selecionadas, verificaram que algumas lesões, como, por exemplo, aneurisma apical, associado com doença de Chagas crônica, ocorrem menos freqüentemente em mulheres (339 (f) x 739 (m));
- analisando resultados de eletrocardiogramas anormais de pacientes chagásicos, em Castro Alves (Bahia), Maguire et al. (1983) observaram uma menor freqüência de alterações em mulheres (15,3%; 29/189) do que em homens (26,1%; 41/157); em trabalho posterior, na mesma área, Mota et al. (1990), expressando em taxa de 1.000 pessoas/ano, encontraram os valores de 21,1 para mulheres e 32,3 para homens;
- vários autores verificaram, em diferentes regiões no Brasil, menor freqüência de mega síndromes em mulheres quando comparadas a homens não sendo, porém, a diferença estatisticamente significativa (Barbosa et al., 1970; Rezende, 1975; Mota et al., 1984);

- Brabin (1992) divulgou que patologia cardíaca e mortalidade associadas são menos frequentes em mulheres, apesar do fato de a gravidez poder disparar uma alteração na resposta imune a *T. cruzi* e exacerbar a doença;
- estudo radiológico em Mambá (Goiás) mostrou que a progressão da esofagopatia foi observada em 21,7% dos homens, e apenas em 16,6% das mulheres (Castro et al., 1994). De um modo geral, estes relatos sugerem uma maior resistência das mulheres em relação ao homens no curso da infecção chagásica, porém não são frequentes o suficiente para que se afirme a existência de tal diferença.

Por outro lado, estudos com animais experimentais mostraram mais claramente esta diferença associada ao sexo.

- O dimorfismo sexual em animais infectados experimentalmente pelo *T. cruzi* foi relatado pela primeira vez por Hauschka (1947) que, realizando estudo quantitativo do sexo do hospedeiro como um fator de influência na doença, utilizou várias linhagens de camundongos e cepas de parasita e demonstrou diferenças na parasitemia, no grau de infecção tissular, na perda de peso e na sobrevivência dos animais, sendo os machos consistentemente mais susceptíveis a *T. cruzi* que as fêmeas;
- Goble (1951), em estudos experimentais com camundongos albinos, fêmeas e machos, administrou hormônio característico do sexo oposto e não observou diferença significativa na mortalidade entre controle e tratados, porém o início da mortalidade foi mais precoce e a média do tempo de sobrevida foi menor em animais machos;
- Kierszenbaum et al. (1974), investigando a interação parasita-macrófago *in vivo* e *in vitro*, observaram que a administração de dietilestilbestrol reduzia a taxa de mortalidade e os níveis de parasitemia e associaram essa redução da resistência à infecção mediada por macrófagos;
- a influência de hormônios esteróides foi demonstrada em experimentos de retirada de ovários de camundongos, sendo observado aumento na susceptibilidade no curso da infecção por *T. cruzi* (Chapman et al., 1975);
- Postan et al. (1983), utilizando camundongos da cepa C3H e parasita clone Sylvio-X 10/7, também observaram menor percentagem de mortalidade cumulativa em fêmeas e aumento no tempo de sobrevida;
- em ratos infectados com *T. cruzi* também foi observado que fêmeas são mais resistentes que machos (Rivera-Vanderpas et al., 1983);
- em Balb/c infectado com cepa Tehuantepec, o percentual da mortalidade foi de 15% para fêmeas e 88% para machos (Araújo-Jorge et al., 1992);
- em estudos com *Calomys callosus*, roedor silvestre descrito como modelo resistente para *T. cruzi* (Mello et al., 1979, Borges et al., 1982), foi observado que a retirada das gônadas tanto em fêmeas quanto em machos, levava a um aumento na parasitemia, revertido com a reposição do hormônio correspondente (Prado Jr. et al., 1998, 1999).

Em nosso laboratório foi recentemente descrito que doses consideradas farmacológicas de estradiol susceptibilizam os camundongos C57BL/6, tanto fêmeas quanto machos, à morte na fase aguda da infecção, enquanto doses baixas do hormônio podem aumentar a resistência dos animais à mortalidade na fase aguda (Souza, 1999). Dentro deste estudo também não observamos alterações nos níveis plasmáticos de IgG anti *T. cruzi* e a susceptibilização induzida por estradiol. Estudos preliminares mostraram uma maior produção de óxido nítrico em animais tratados com estradiol, porém tal efeito foi observado tanto com a administração de doses altas como de doses baixas do hormônio. Realizamos também estudos analisando o curso da infecção por *T. cruzi* em fêmeas em diferentes etapas do ciclo ovulatório que sugeriram que o fato de fêmeas serem mais resistentes que machos pode, ao menos em parte, estar associado com níveis baixos de estradiol, compatíveis com níveis de anestro ou de fase descendente de estrogênio no ciclo estral.



5.3 Prolactina

Maria Teresa Rivera

A prolactina (PRL) é um hormônio polipeptídico, com peso molecular próximo de 23.000 daltons, constituída de uma cadeia linear de 198 aminoácidos. A PRL circulante se apresenta em três formas: monomérica, a “prolactina pequena” (80% da PRL total circulante), polimérica, com peso molecular elevado, a “prolactina grande, grande” e polimérica, de peso molecular intermediário, a “prolactina grande”. Estas duas últimas formas têm fraca afinidade pelos receptores de PRL (Niall, 1981). É um hormônio “lactogênico”, sintetizado pelas células lactótropicas do lóbulo anterior da hipófise e que se encontra nos vertebrados; ela é secretada de uma maneira pulsátil (a cada 20 minutos) e sua vida média é, aproximadamente, de 20 minutos (Dewailly et al., 1984).

A PRL atua diretamente sobre seus receptores presentes em tecidos periféricos, sem a intervenção ou ação de outras glândulas endócrinas. Estes receptores encontram-se na glândula mamária, fígado, ovário, testículo, próstata e rim. Na mulher, as células do endométrio, no final do ciclo menstrual, e as células teciduais placentárias, no início da gravidez, seriam capazes de produzir a PRL extra-hipofisária (Smith, 1980; Talamantes et al., 1980). Os mecanismos reguladores desse hormônio são múltiplos e complexos: ao nível hipotalâmico, dopamina, GABA (ácido γ -amino butírico) e sistemas colinérgicos exercem um efeito inibitório; a TRH e o VIP (peptídeo intestinal vasoativo), estimulam a síntese e secreção da PRL que pode auto-regular-se e ser controlada por ação de outros hormônios como progesterona, estrogênios, glucocorticóides, andrógenos, GH, LH-RH e ACTH (Clemens & Shaar 1980; Dewailly et al., 1984).

As variações fisiológicas da PRL plasmática estão associadas com a idade e o sexo: (a) no feto, aparece na hipófise fetal a partir a quinta semana e no soro a partir da décima semana, apresentando uma grande elevação do nível plasmático no final da gravidez e ao nascimento (200 ng/ml) (Aubert et al., 1975); (b) na infância, a PRL plasmática diminui progressivamente (de 50 a 80 ng/ml) até o início da puberdade, quando de novo aumenta moderadamente, principalmente na mulher; (c) nos adultos, o nível sérico da PRL é mais elevado na mulher que tem atividade genital (2-20 ng/ml) que na mulher em menopausa (2-12 ng/ml) e no homem (2-13 ng/ml) (Jaffe et al., 1973).

Durante o dia, os níveis de PRL plasmática apresentam uma curva oscilatória com poucas variações, simultânea a de LH e de FSH, mostrando que estas oscilações são moduladas pelo mesmo mecanismo neuroendócrino (Cetel & Yen, 1983). Como no caso de outros hormônios hipofisários, a PRL tem um ritmo bem particular nas 24 horas do dia: detecta-se um pico noturno durante o sono que ocorre entre 1 e 5 horas da manhã nas pessoas que têm um ritmo de vigília-sono clássico; a seguir os valores plasmáticos diminuem, voltando aos níveis basais 1 ou 2 horas após o despertar (Nokin et al., 1972).

A principal função fisiológica da PRL é a indução e manutenção da lactação na mulher. Durante esta fase, a amamentação mantém uma hiperprolactinemia fisiológica, que é máxima no início da lactação, depois do parto, e que diminui progressivamente com a evolução da amamentação; durante este período ocorre uma redução da atividade ovariana acompanhada por amenorréia na mulher. Por outro lado, apresenta, também, uma ação sobre a

reprodução, uma vez que vários resultados experimentais mostram uma ação direta da mesma sobre o ovário; o líquido folicular também contém PRL, já que sua concentração aumenta durante a maturação folicular e diminui no momento da ovulação (Dewailly et al., 1984; Meites, 1988).

Outros fatores exógenos podem provocar a liberação da PRL: estresse, exercício com esforço prolongado, durante a alimentação, hipoglicemia e estímulo táctil do mamilo do seio (Baker et al., 1982). A PRL pode ser encontrada no líquido amniótico, no líquido céfalo-raquídeo, no líquido seminal e no leite materno humano e de outros vertebrados (Gala et al., 1975; Bartke, 1980). Suas concentrações nestes líquidos biológicos nem sempre guardam correlação com os valores plasmáticos.

5.3.1 Prolactina e Imunidade

A interação entre o sistema neuroendócrino e o sistema imune é cada vez mais evidente, sendo objeto de numerosas investigações (Blalock, 1989). A hipófise secreta hormônios imunoestimulantes (PRL e hormônio de crescimento) e hormônios imunossupressores (ACTH) que estão implicados no controle das funções imunes (Dewailly et al., 1984). Neste contexto, uma série de estudos indicam que a PRL pode ser considerada como um agente essencial da regulação da resposta imune. Enquanto exerce, principalmente, uma ação sobre a lactação e a reprodução, o que tem sido bem demonstrado na literatura, tem havido também investigações sobre o papel desse hormônio na função de células imunocompetentes (Berczi et al., 1981; Haddock Rusell, 1988; Yu & Lee 1988; Murphy et al., 1995).

Foi claramente estabelecido que a PRL pode ativar a proliferação linfocitária e aumentar a atividade das células NK e LAK *in vitro* (Bernton et al., 1988; Yu & Lee, 1988; Haddock Rusell, 1988; Murphy et al., 1995). Este hormônio contribui também para a ontogenia do sistema imunitário tímico e a administração neonatal de anticorpos anti PRL em camundongos, pode alterar o desenvolvimento e a maturação linfócitos T e B do baço e do timo (Haddock Rusell et al., 1988). Além disso, receptores de PRL foram identificados em linfócitos T (células CD4⁺ e CD8⁺), linfócitos B e em células NK humanas (Murphy et al., 1995). Os linfócitos apresentam mRNA que pode hibridizar com o cDNA da PRL e assim levam a formação deste hormônio, quando são estimulados por mitógenos ou por antígenos (Haddock Rusell, 1988). Macrófagos apresentam também receptores de PRL e, como os linfócitos, são capazes de produzir uma substância semelhante a ela. Estes resultados sugerem um efeito adjuvante da PRL, que pode ser associado à estimulação da atividade macrófágica (direta ou indireta por via do IFN- γ produzido por linfócitos T) (Bernton et al., 1988; Murphy et al., 1995). Por outro lado, a ciclosporina A, agente imunodepressor, se fixa sobre os mesmos receptores que a PRL, impedindo desta maneira a ação da mesma (Hiestand et al., 1986).

A PRL também foi associada com a auto-imunidade. Dados recentes demonstraram que a administração *in vivo* de PRL ou transplantes singênicos da parte anterior da hipófise, aceleram fenômenos auto-imunes em cepas de camundongos predispostos a desenvolver processos auto-imunes; a administração de bromocriptina, um inibidor da síntese de PRL, pode retardar o aparecimento desta patologia. Os camundongos NZB auto-imunes apresentam receptores de PRL, que não estão presentes em linfócitos de camundongos controles normais (Murphy et al., 1995).

5.3.2 Prolactina e a Infecção Experimental por *T. cruzi*

O papel da PRL sobre a regulação das respostas imunes parasitárias não tem sido estudado. Na infecção experimental por *T. cruzi*, os mecanismos de proteção e de resistência dependem, essencialmente, de fenômenos como fagocitose e citotoxicidade celular dependente dos anticorpos (ADCC), principalmente devido a macrófagos e a polimorfonucleares (Okabe et al., 1980; Nogueira, 1986). A função primordial de células NK, células CD4⁺

e CD8⁺ tem sido demonstrada no controle da parasitemia e no aparecimento de fenômenos patológicos de autoimunidade na infecção experimental por *T. cruzi* (ver Capítulo 4). Estes elementos da resposta imunitária podem ser assim um alvo preferencial direto ou indireto da ação da PRL.

Por outro lado, alguns resultados obtidos durante a infecção experimental por *T. cruzi* em camundongos (fêmeas grávidas e lactantes) (Rivera et al., 1991) permitem considerar, ainda, a ação modulatória da PRL sobre a infecção. Estes resultados indicam uma ação benéfica da lactação, aumentando a resistência dos animais infectados e confirmando estudos prévios usando outras cepas de camundongos e de *T. cruzi* (Krampitz & Disko, 1966).

A lactação reduz a mortalidade durante a fase aguda da infecção, mas os camundongos infectados foram incapazes de controlar sua parasitemia. Esta incapacidade de reduzir a população parasitária em uma infecção adquirida durante o período de lactação foi também observada em outras infecções parasitárias de animais domésticos e de laboratório e poderia estar relacionada com a imunossupressão das células T observada durante a gravidez e a lactação (Lloyd, 1983).

Na infecção por *T. cruzi*, os trabalhos de Trischmann (1983) demonstram que no início da fase aguda, quando a parasitemia aumenta, o controle da infecção está associado, essencialmente, a linfócitos T, sendo independente dos anticorpos. Os linfócitos CD4 Th₁ e Th₂ produzem linfocinas capazes de ativar as células efetoras, participando, dessa maneira, da eliminação dos parasitas (Golden & Tarleton, 1991; Tarleton, 1991) e contribuindo para a síntese de anticorpos; estes últimos seriam responsáveis pela eliminação dos parasitas e pela manutenção da imunidade durante a fase crônica. A capacidade do camundongo lactante de retardar ou evitar as consequências letais de uma parasitemia elevada poderia estar relacionada com as alterações induzidas pela interação da rede de hormônios e citocinas. Assim, o grande aumento de PRL endógena, observado durante a lactação, poderia estar relacionado com o estímulo das respostas imunes antiparasitárias e participar no controle da infecção de camundongos lactantes. Evidentemente esta hipótese necessita de mais investigações.

Finalmente, uma diferença sexual importante tem sido demonstrada na resistência à infecção por *T. cruzi* entre camundongos machos e fêmeas (Hauschka, 1947; Souza, 1999): os primeiros são mais sensíveis. Assim, a prolactinemia e os níveis de fixação de PRL sobre seus receptores são menores em machos que em fêmeas como assinalado no caso de algumas cepas de camundongos (Kelly et al., 1974). Este nível baixo poderia contribuir para explicar a diferença sexual observada na resistência à infecção.

Referências Bibliográficas

- AHMED, S.A.; PENHALE, W.J. & TALAL, N. Sex hormones, immune responses, and autoimmune diseases. Mechanism of sex hormone action. *American Journal of Pathology*, 121:531-551, 1985.
- ANDRADE, Z. A. Pathology of the autonomic nervous system in Chagas' cardiopathy. Chagas' disease and the nervous system. *PAHO Scientific Publication* 5471:212-221, 1994.
- ANDRADE, Z. & ANDRADE S. Pathological findings in Chagas' disease. In: *Actualizaciones en la Enfermedad de Chagas*, 1993. Córdoba: Congreso Nacional de Medicina, p. 79-94.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. & SADIGURSKY, M. Damage and healing in the conducting tissue of the heart an experimental study in dogs infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Pathology*, 143:93-101, 1984.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; LAGE, M. J. F.; RIVERA, M. T.; CARLIER, Y. & VAN LEUVEN, F. *Trypanosoma cruzi*: Enhanced α -macroglobulin levels correlate to resistance of BALBc/J mice to a cute infection. *Parasitology Research*, 78:215-221, 1992.
- AUBERT, M. L.; GRUMBACH, M. M. & KAPLAN, S. L. The ontogenesis on human fetal hormones. III. Prolactin. *Journal of Clinical Investigation*, 56:155-164, 1975.
- AYALA, J. & KIERSZENBAUM, F. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infectivity by α - and β -adrenergic agonists: Desensitization produced by prolonged treatments of increasing agonist concentration. *Parasitology*, 100:429-434, 1990.
- BAKER, E. R.; MATHUR, R. S.; LANDGREBE, S. C.; MOODY, L. O. & WILLIAMSON, H. O. Plasma gonadotropins, prolactin and steroid hormone concentrations in female runners immediately after a long-distance run. *Sterility*, 38:38-41, 1982.

- BARBEE, R. A.; HICKS, M. J.; GROSSEL D. & SANDO C. The maternal immune response in coccidioidomycosis. Is pregnancy a risk factor for serious infection? *Chest*, 100:709-715, 1991.
- BARBOSA, A. J. A.; PITOLA, J. E. H. & TAFURI W. L. Incidência da cardiopatia chagásica em 15.000 necrópsias consecutivas e sua associação com os “megás”. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 4:219-223, 1970.
- BARTKE, A. Role of prolactin in reproduction in male mammals. *Federation Proceedings*, 39:2577-2581, 1980.
- BENTEN, W. P.; WUNDERLICH F. & MOSSMANN H. *Plasmodium chabaudi*: Estradiol suppresses acquiring, but not once-acquired immunity. *Experimental Parasitology*, 75:240-247, 1992.
- BERCZI, I.; NAGY, E.; KOVACS, K. & HOVATH, E. Regulation of humoral immunity in rats by pituitary hormones. *Acta Endocrinologica*, 98: 506-513, 1981.
- BERNTON, E. W., MELTZER, M. S. & HOLADAY, J. Suppression of macrophages activation and T-lymphocyte function in hypoprolactinemic mice. *Science*, 239: 401-404, 1988.
- BERRIDGE, M. J. Inositol trisphosphate and calcium signalling. *Nature*, 361:315-325, 1993.
- BLALOCK, J. E. A molecular basis for bidirectional communication between the immune and neuroendocrine systems. *Physiological Reviews*, 69:32, 1989.
- BORDA, E. S.; PASCUAL, J.; COSSIO, P. M.; VEGA, M.; ARANA, R. & STERIN-BORDA, L. A circulating IgG in Chagas disease which binds to β -adrenoreceptor of myocardium and modulates its activity. *Clinical Experimental Immunology*, 57:679-682, 1984.
- BORGES, M. M.; MOLO D. A. & TEIXEIRA M. L. Infecção experimental do *Calomys callosus* Rodentia Cricetidae com *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 16:233-242, 1982.
- BRABIN, L. The epidemiological significance of Chagas' disease in women. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87:73-79, 1992.
- BRENER, Z. & KRETTLI, A. U. Immunology of Chagas' disease. In: *Modern Parasite Biology: Cellular, Immunological and Molecular Aspects*. 1990. Cap. 13, p. 247-361.
- BRENT, L. & MEDAWAR, P. Quantitative studies on tissue transplantation immunity. VII. The normal lymphocyte transfer reaction. *Proceedings of Royal Society London Biological Science* 165:281-307, 1966.
- BUCKLEY, C. E. & DORSEY, F. C. Serum immunoglobulin levels throughout the life-span of healthy man. *Annals Internal Medicine*, 75:673-682, 1971.
- BUNDY, D. A. P. Sexual effects on parasite infection. *Parasitology Today*, 4:186-189, 1988.
- BUTTERWORTH, M.; MCCLOLAN, B. & ALLANSMITH, M. Influence of sex in immunoglobulin levels. *Nature*, 214:1224-1225, 1967.
- CASTRO, C.; MACEDO, V.; REZENDE, J. M. & PRATA, A. Longitudinal radiologic study of the esophagus, in an endemic area of Chagas disease, in a period of 13 years. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27:227-233, 1994.
- CETEL, N. S. & YEN, S. S. Concomitant pulsatile release of prolactin and LH in hypogonadal women. *Journal of Clinical and Endocrinologic Metabolism*, 56:1313-1315, 1983.
- CHAGAS, C. & VILLELA, E. Forma cardíaca de trypanosomiase americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 14:5-61, 1922.
- CHAPADEIRO, E.; BERALDO, P. S. S.; JESUS, P. C.; OLIVEIRA, W. P. & JUNQUEIRA, L. F.. Lesões em ratos Wistar inoculados com diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 21:95-103, 1988.
- CHAPMAN JR, W. L.; HANSON, W. L. & WAITS, V. B. The influence of gonadectomy of host on parasitemia and mortality of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology*, 61:213-216, 1975.
- CLEMENS, J. A. & SHAAR, J. Control of prolactin secretion in mammals. *Federation Proceedings*, 39:2588-2592, 1980.
- COTTREL, B. J.; PLAYFAIR, J. H. L. & DE SOUSA B. The effect nonspecific immunostimulation on murine malaria. *Experimental Parasitology*, 43:45-53, 1977.
- DA SILVEIRA, J. F.; ZINGALES, B. & COLLI, W. Characterization of an adenyl cyclase activity in particulate preparations of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*. *Biochimica Biophysica Acta*, 481:722-733, 1977.
- DE CASTRO, S. L. & LUZ, M. R. M. P. The second messenger cyclic 3';5'-adenosine monophosphate in pathogenic microorganisms with special reference to protozoa. *Canadian Journal of Microbiology*, 39:473-479, 1993.
- DE CASTRO, S. L. & OLIVEIRA, M. M. Radioligand binding characterization of β -adrenergic receptors in the protozoa *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 87C:5-8, 1987.
- DE CASTRO, S. L.; MEIRELLES, M. N. L. & OLIVEIRA, M. M. *Trypanosoma cruzi*: Adrenergic modulation of cyclic AMP role in proliferation and differentiation of amastigotes in vitro. *Experimental Parasitology*, 64:368-273, 1987.
- DE CASTRO, S. L.; SOUZA, W. & MEIRELLES, M. N. L. Cytochemical localization of adenylate cyclase in the three developmental forms of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Protozoology*, 38:580-583, 1991.

- DEWAILLY, D.; BUVAT, J. & FOSSATI, P. Physiologie de la prolactine. *Encyclopaedia Médicale et Chirurgique*. Paris, France: Glandes-Nutrition, 1984. 10017 M, 1-14
- DIAS, J. C. P. The indeterminate form of human chronic Chagas' disease. A clinical-epidemiological review. *Revista da Sociedade Brasileira Tropical*, 22:147-156, 1989.
- DIAS, J. C. P. Epidemiology of Chagas disease In: *Chagas' disease (American trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*, 1992. São Paulo: ISBT, p. 49-80.
- DRUTZ, D. J. & CATANZARO, A. Coccidioidomycosis. State of the art. *American Review of Respiratory Diseases*, 117:559-585, 1978.
- EIDINGER D. & GARRETT T. J. Studies of the regulatory effects of the sex hormones on antibody formation and stem cell differentiation. *Journal of Experimental Medicine*, 136:1098-1116, 1972.
- EL-BOULAQI, H. A.; EL-REFAIE, S. A.; BASSIOUNY, G. A. & AMIN, F. M. A. The relation between *Trichomonas vaginalis* and contraceptive measures. *Journal of Egyptian Society of Parasitology*, 14:495-499, 1984.
- ELOI-SANTOS, S.; OLSEN, N. J.; CORREA-OLIVEIRA, R. & COLLEY, D. G. *Schistosoma mansoni*: Mortality, pathophysiology, and susceptibility differences in male and female mice. *Experimental Parasitology*, 75:168-175, 1992.
- FALASCA, C. A.; GILI, M.; GRANA, D.; GÓMEZ, E.; ZOPPI, J. & MARESO, E. Chronic myocardial damage in experimental *Trypanosoma cruzi* infection of a new world primate, *Cebus* sp. monkey. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32:151-161, 1990.
- FURR, P. M. & ROBINSON, D., 1989. Oestradiol-induced infection of the genital tract of female mice by *Mycoplasma hominis*. *Journal of General Microbiology*, 135: 2743-2749.
- GALA, R. R.; SINGHAKOWINTA, A. & BRENNAN, M. J. Studies on prolactin in human serum, urine and milk. *Hormone Research*, 6:310-320, 1975.
- GOBLE, F. C. Studies on experimental Chagas' disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. *Journal of Parasitology*, 37:408-414, 1951.
- GOBLE, F. C. & KNOPKA, K. Sex as a factor in infections disease. *Science*, 35:325-346, 1973.
- GOLDEN, J. M. & TARLETON, R. L. *Trypanosoma cruzi*: Cytokine effects on macrophage trypanocidal activity. *Experimental Parasitology*, 72:391, 1991.
- GONÇALVES, M. F.; ZINGALES, B. & COLLI, W. cAMP phosphodiesterase and activator protein of mammalian cAMP phosphodiesterase from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 1:107-118, 1980.
- GONZALES-PERDOMO, M.; ROMERO, P. & GOLDENBERG, S. cAMP and adenylate cyclase activators stimulate *Trypanosoma cruzi* differentiation. *Experimental Parasitology*, 66:205-212, 1988.
- GREENBLATT, H. C. & ROSENSTREICH, D. L. *Trypanosoma rhodesiense* infection in mice: Sex dependence of resistance. *Infection & Immunity*, 43:337-340, 1984.
- GROSSMAN, C. Possible underlying mechanisms of sexual dimorphism in the immune response, fact and hypothesis. *Journal of Steroid Biochemistry*, 34: 241-251, 1989.
- HADDOCK RUSELL, D. Prolactin and immunomodulation. In: *Prolactin gene family and its receptor*, 1988. Elsevier Science Publishers BV (Biomedical division), p. 155-165.
- HADDOCK RUSELL, D.; MILLS, K. D.; TALAMANTES, F. J. & HOWARD, A. B. Neonatal administration of prolactin antiserum alters the developmental pattern of T and B lymphocytes in the thymus and spleen of Balb/C female mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 85:7404-7407, 1988.
- HAUSCHKA, T. S. Sex of host as a factor in Chagas' disease. *Journal of Parasitology*, 33: 399-404, 1947.
- HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, F.; LÓPEZ-MARTÍNEZ, R.; MÉNDEZ-TOVAR, L. J. & MANZANO-GAYOSSO, P. *Nocardia brasiliensis*: *In vitro* and *in vivo* growth response to steroid sex hormones. *Mycopatologia*, 132: 79-85, 1995.
- HIESTAND, P. E.; MAKLER, P.; NORDMANN, R.; GRIEDER, A. & PERMMONGKOL, C. Prolactin as a modulator of lymphocyte responsiveness provides a possible mechanism of action for cyclosporin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*, 83:2599-2603, 1986.
- HOMO-DELARCHE, F.; FITZPATRICK, F.; CHRISTEFF, N.; NUNEZ, E. A.; BACH, J. F. & DARDENNE, M. Sex steroids, glucocorticoids, stress and autoimmunity. *Journal Steroid Biochemistry Molecular Biology*, 40:619-637, 1991.
- IOSA, D.; DEQUATTRO, V.; LEE, D. D.; ELKAYAM, U. & PALMERO, H. Plasma norepinephrine in Chagas cardioneuromyopathy: A marker of progressive dysautonomia. *American Heart Journal*, 117:882-887, 1989.
- IOSA, D.; DEQUATTRO, V.; LEE, D. D.; ELKAYAM, U.; CAEIRO, T. & PALMERO, H. Pathogenesis of cardiac neuromyopathy in Chagas disease and the role of the autonomic nervous system. *Journal of Autonomic Nervous System*, 30: 583-588, 1990.

- JAFFE, R. B.; YUEN, B. H.; KEYE JR, W. R. & MIDGLEY JR, A. R. Physiologic and pathologic profiles of circulating human prolactin. *American Journal of Obstetrics & Gynecology*, 117:757-773, 1973.
- JONES H. E. Superficial fungus infections of skin. In: *Infections diseases*, 3rd ed., 1983. Philadelphia: Harper & Row Publishers Inc., p. 966-978.
- KASS, E. H. Bacterium and pyelonephritis of pregnancy. *Archives Internal Medicine*, 105:196-198, 1960.
- KELLY, P. A.; POSNER, B. I.; TSUSHIMA, T. & FRIESEN, H. G. Studies of insulin, growth hormone and prolactin binding: Ontogenesis, effects of sex and pregnancy. *Endocrinology*, 95:532-539, 1974.
- KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D. B. & PIZZIMENTI, M. C. Phagocytosis: A defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 112:1839-1844, 1974.
- KITTA, E.; TAKAHASHI, S.; YASUI, K. & KASHIBA, S. Effect of estrogen (17 β estradiol) on the susceptibility of mice to disseminated gonococcal infection. *Infection & Immunity*, 49:238-243, 1985.
- KITTA, S.; KITTA, C.; PAIZI-BIZA, P. & HENRY, L. A histological and immunohistochemical study of the changes induced in the brains of white mice by infection with *Toxoplasma gondii*. *British Journal of Experimental Pathology*, 65:67-74, 1984.
- KÖBERLE, F. Cardiopatia chagásica. *Hospital*, 53:311-346, 1958.
- KÖBERLE, F. Chagas heart disease. *Cardiology*, 52:82-90, 1968.
- KÖBERLE, F. The cause and the importance of nervous lesions in American trypanosomiasis. *Bulletin WHO*, 42:739-743, 1970.
- KRAMPITZ, H. E. & DISKO, R. Retardation of parasitemia, prolongation of life or survival of lactating mice in infections with *Trypanosoma cruzi*. *Nature*, 209:526, 1966.
- KRIEGER, M. A.; D'ESCOFFIER, L. N. & GOLDENBERG, S. Signal transduction and role of G-proteins coupled receptors in *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis: Use of functional expression in *Escherichia coli* for the cloning *Trypanosoma cruzi*-adrenergic receptor. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90 (Suppl.):109, 1995.
- LARANJA, F. S.; DIAS, E.; NÓBREGA, G. & MIRANDA, A. Chagas' disease: A clinical, epidemiologic, and pathologic study. *Circulation*, 14:1035-1060, 1956.
- LLOYD, S. Effect of pregnancy and lactation upon infection. *Veterinary Immunology & Immunopathology*, 4:153-176, 1983.
- LUEBKE, R. W.; LUSTER, M. I.; DEAN, J. H. & HAYES, H. T. Altered host resistance to *Trichinella spiralis* infection following subchronic exposure to diethylstilbestrol. *International Journal of Immunopharmacology*, 6:609-617, 1984.
- LYNCH, N. R.; YARZABAL, L.; VERDE, O.; AVILA, J. L.; MONZON, H. & CONVIT, J. Delayed-type hypersensitivity and immunoglobulin E in American cutaneous leishmaniasis. *Infection & Immunity*, 38:877-881, 1982.
- MAGUIRE, J. H.; MOTT, K. E.; LEHMAN, J. S.; HOFF, R.; MUNIZ, M.; GUIMARÃES, A. C.; SHERLOCK, I. & MORROW, R. H. Relationship of electrocardiograph abnormalities and seropositivity to *Trypanosoma cruzi* within a rural community in Northeast Brazil. *American Heart Journal*, 105:287-294, 1983.
- MAUKAU, S. K. Host sex and sex hormones as a factor affecting *Trypanosoma lewisi* population in white rats. *Japanese Journal of Parasitology*, 24:379-385, 1975.
- MEITES, Y. Biologicals functions of prolactin in mammals. In: *Prolactin gene family and its receptor*, 1988. Amsterdam: Elsevier Science, p. 123-130.
- MELLO-AIRES, M. *Fisiologia*. 1991. Rio de Janeiro: Guanabara/Koogan S.A.
- MELLO, D. A.; VALIIN, E. & TEIXEIRA, M. L. Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres do *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys callosus callosus* Rodentia. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 13:314-332, 1979.
- MORRIS, S. A.; TANOWITZ, H. B.; FACTOR, S. A.; BILEZIKIAN, J. P. & WITTNER, M. Myocardial adrenergic adenylate cyclase activity in acute murine Chagas' disease. *Circulation Research*, 62:800-810, 1988.
- MORRIS, S. A.; TANOWITZ, H. B.; MAKMAN, M.; HATCHER, V.; BILEZIKIAN, J. P. & WITTNER, M. *Trypanosoma cruzi*: Infection of human umbilical vein endothelial cells alters cAMP metabolism. *Experimental Parasitology*, 74:69-76, 1992.
- MOTA, E. A.; GUIMARÃES, A. C.; SANTANA, O.; SHERLOCK, I.; HOFF, R.; WOLER, T. H. A nine-year prospective study of Chagas' disease in a well-defined rural population in Northeast Brasil. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 42:429-440, 1990.
- MOTA, E.; TODD, C. W.; MAGUIRE, J. H.; PORTUGAL, S. D.; SANTANA, O.; RIBEIRO FILHO, R. & SHERLOCK, I. A. Megaesophagus and seroreactivity to *Trypanosoma cruzi* in a rural community in Northeast Brazil. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 33:8220-8226, 1984.
- MURPHY, W. J.; HALLGER, R. & LONGO, D. L. Effects of growth hormone and prolactin immune development and function. *Life Sciences*, 57:1-14, 1995.

- NIALL, H. D. The chemistry of prolactin. In: *Prolactin*. 1981. NY: Elsevier p. 1-17.
- NICOL, T.; BILBEY, D. L. J.; CHARLES, L. M.; CORDINGLEY, J. L. & VERNON-ROBERTS, B. Oestrogen: The natural stimulant of body defence. *Journal of Endocrinology*, 30:277-291, 1964.
- NISHIZUKA, Y. Intracellular signaling by hydrolysis of phospholipids and activation of protein kinase C. *Science*, 258:607-614, 1992.
- NOGUEIRA, N. American trypanosomiasis, antigens and host parasite interactions. In: *Parasite antigens: Toward new strategies for vaccines*. 1986. p. 91-110.
- NOKIN, J.; VEKEMANS, M.; L'HERMITE, M. & ROBYN, C. Circadian periodicity of serum prolactin concentration in man. *British Medical Journal*, 3:561-562, 1972.
- OKABE, K.; KIPNIS, T. L.; CALICH, V. L. G. & DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigotes bloodstream forms. *Clinical Immunology & Immunopathology*, 46:344, 1980.
- OLIVEIRA, J. S. M. Cardiopatia chagásica experimental. *Revista Goiana de Medicina*, 15:77-133, 1969.
- OLIVEIRA, J. S. M.; MELLO DE OLIVEIRA, J. A. & LIMA FILHO, E. C. Apical aneurism of Chagas' heart disease. *British Heart Journal*, 46:432-437, 1981.
- OLIVEIRA, M. M.; ANTUNES, A. & DE MELLO, F. G. Growth of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes controlled by shifts in cAMP mediated by adrenergic ligands. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 11:283-292, 1984.
- OLIVEIRA, M. M., ROCHA, E. D., RONDINELLI, E., ARNHOLDT, V. & SCHARFSTEIN, J. Signal transduction in *Trypanosoma cruzi*: Opposite effects of adenylcyclase and phospholipase C systems in growth control. *Molecular Cellular Biochemistry*, 124:91-99, 1993.
- PAHO. Chagas' disease and the nervous system. *Scientific Publication* no. 547, 1994.
- PASCUAL, J.; BORDA, E. & STERIN-BORDA, L. Chagasic IgG modifies the activity of sarcolemmal ATPases through a β -adrenergic mechanism. *Life Science*, 40: 313-319, 1987.
- PELECH, S.L. Networking with protein kinases. *Current Biology*, 3:513-515, 1993.
- PETRY, K. & VAN VOORHIS, W. C. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: Investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas disease. *Research Immunology*, 142:151-156, 1991.
- POSTAN, M.; DVORAK, J. A. & MCDANIO, J. P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN⁻ mice with two clones isolated from a common source. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 32:497-506, 1983.
- PRADO JR, J. C.; LEAL, M. P.; ANSOMO-FRANCI, J. A.; DE ANDRADE JR, H. F. & KLOETZEL, J. K. Influence of female gonadal hormones on the parasitemia of female *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 84:100-105, 1998.
- PRADO JR, J. C.; LEVY, A. M.; LEAL, M. P.; BERNARD, E. & KLOETZEL, J. K. Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 85:826-829, 1999.
- PUFFER, R. R. & GRIFFITH, G. H. Características de la mortalidad urbana. Washington DC. *PAHO Scientific Publication*, 151, 1968.
- PUNG, O. J. & LUSTER, M. I. *Toxoplasma gondii*: Decreased resistance to infection in mice due to estrogen. *Experimental Parasitology*, 61:48-56, 1986.
- PUNG, O. J.; LUSTER, M. I.; HAYES, H. T. & RADER, J. Influence of steroid and nonsteroid sex hormones on host resistance in mice: Increased susceptibility to *Listeria monocytogenes* after exposure to estrogenic hormones. *Infection & Immunity*, 46:301-307, 1984.
- PUNG, O. J.; TUCKER, A. N.; VORE, S. J. & LUSTER, M. I. Influence of estrogen on host resistance: Increased susceptibility of mice to *Listeria monocytogenes* correlates with depressed production of interleukin 2. *Infection & Immunity*, 50:91-96, 1985.
- RANGEL-ALDAO, R.; ALLENDE, O.; TRIANA, F.; PIRAS, R.; HENRIQUEZ, D. & PIRAS, M. Possible role of cAMP in the differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 22:39-43, 1987.
- RANGEL-ALDAO, R.; TOVAR, G. & DE RUIZ, M.L., 1983. The cAMP receptor protein of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Biological Chemistry*, 258: 6979-6983.
- RANK, R. G.; WHITE, H. J.; HOUGH, A. J.; PASLEY, J. N. & BARRELA, A. L. Effect of estradiol on chlamydial genital infection in female guinea pigs. *Infection & Immunity*, 38:699-705, 1982.
- RASSI JR, A. Simpósio "ABC" Doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 65: 4, 1995.

- RESTREPO, A.; SALAZAR, M. E.; CANO, L. E.; STOVER, E.P.; FELDMAN, D. & STEVENS, D. A. Estrogens inhibit mycelium-to-yeast transformation in the fungus *Paracoccidioides brasiliensis*: Implications for resistance of females to paracoccidioidomycosis. *Infection & Immunity*, 46: 346-353, 1984.
- REZENDE, J. M. Chagasic mega syndromes and regional differences, New Approaches in American Trypanosomiasis Research. *PAHO Scientific Publication* 318:195-205, 1975.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L. Denervation and the immune response in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Clinical Experimental Immunology*, 44: 349-354, 1981.
- RIVERA, M. T.; THIBAUT, G. & CARLIER, Y. Lactation reduces mortality but not parasitaemia during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 85:603-604, 1991.
- RIVERA-VANDERPAS, M. T.; RODRIGUEZ, A. M.; AFCHAIN, D.; BAZIN, H. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: Variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta tropica*, 40:5-10, 1983.
- ROBERTS, C. W.; CRUICKSHANK, S. M. & ALEXANDER, J. Sex-determined resistance to *Toxoplasma gondii* is associated with temporal differences in cytokine production. *Infection & Immunity*, 63:2549-2555, 1995.
- ROBERTS, C. W.; FERGUSON, D. J.; JEBBARI, H.; SATOSKAR, A.; BLUETHMANN, H. & ALEXANDER, J. Different roles for interleukin-4 during the course of *Toxoplasma gondii* infection. *Infection & Immunity*, 64:897-904, 1996.
- ROWE, D. S. Quantitative estimation of immunoglobulins and other serum proteins by immunological methods. *Clinical Chimica Acta*, 22:43, 1968.
- SHINOMIYA, N.; TSURU, S.; TSUGITA, M.; KATSURA, Y.; TAKEMURA, T.; ROKUTANDA, M. & NOMOTO, K. Thymic depletion in pregnancy: Kinetics of thymocytes and immunologic capacities of the hosts. *Journal Clinical Laboratory Immunology*, 34:11-22, 1991.
- SMITH, S. M. Role de a prolactin in regulating gonadotropin secretion and gonad function in female rats. *Federation Proceedings*, 39:2571-2576, 1980.
- SOUZA, E. M. *Modulação induzida por estradiol na fase aguda da infecção por Trypanosoma cruzi em camundongos*, 1999. Tese de mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- ST CLAIR, M. C.; RILEY, L. K.; FRANKLIN, C. L.; BESCH-WILLIFORD, C. L. & HOOK JR, R. R. Experimentally induced intravaginal *Tritrichomonas foetus* infection in the estrogenized mouse. *Laboratory Animal Science*, 44:430-435, 1994.
- STYRT, B. & SUGARMAN, B. Estrogens and infection. *Reviews Infectious Diseases*, 13:1139-1150, 1991.
- SUTHERLAND, E. W. Studies on the mechanism of hormone action. *Science*, 177:401-408, 1972.
- TAFURI, W. L. Pathogenesis of lesions of the autonomic nervous system of the mouse in experimental acute Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 19:405-417, 1970.
- TALAMANTES, F.; ELGREN, L.; MARKOFF, E.; WOODARD, S. & MADRID, J. Phylogenetic distribution, regulation of secretion, and prolactin-like effects of placental lactogens. *Federation Proceedings*, 39:2582-2585, 1980.
- TARLETON, R. L. The role of T-cell subpopulation in experimental Chagas' disease. *Research in Immunology*, 142:130-133, 1991.
- TEIXEIRA, A. R. L.; FIGUEIREDO, F.; REZENDE, F. J. & MACEDO, V. Chagas' disease: A clinical, parasitological, immunological and pathological study in rabbits. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 32:258-272, 1983.
- TEIXEIRA, A. R. L.; TEIXEIRA, M. L. & SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas disease. IV. Production of lesions in rabbit similar to those of chronic Chagas disease in man. *American Journal of Pathology*, 80:163-180, 1975.
- TOIVANEN, P. Enhancement of staphylococcal infection in mice by estrogens. *Annals Medical Experimental Biology*, 45:138-146, 1967.
- TORRUELLA, M.; FLAWIÁ, M. M.; EISENSCHLOS, C.; MOLINA E VEDIA, L.; RUBINSTEIN, C. P. & TORRES, H. N. *Trypanosoma cruzi* adenylate cyclase activity. Purification and characterization. *Biochemical Journal*, 234:145-150, 1986.
- TRISCHMANN, T. M. Non-antibody mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 130:1953-1957, 1983.
- VAN ANDO, R. A.; FRANKLIN, C. L.; ST CLAIR, M. C.; RILEY, L. K.; BESCH-WILLIFORD, C. L. & HOOK JR, R. R. Lesions of experimental genital *Tritrichomonas foetus* infections in estrogenized BALB/C mice. *Veterinary Pathology*, 33:407-411, 1996.
- VAUGHAN, J. E. & RAMIREZ, H. Coccidioidomycosis as a complication of pregnancy. *Cal. Medicine*, 74:121-125, 1951.
- WANG, R. & BOOSEVIC, M. Estradiol increases susceptibility of goldfish to *Trypanosoma danilewskyi*. *Development Comparative Immunology*, 18:377-387, 1994.
- WIDMER, C. G. & AZEVEDO, E. S. Sexo do hospedeiro humano e o desenvolvimento de formas parasitárias do *Trypanosoma cruzi* no miocárdio. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14:109-113, 1972.

- WIRTH, J. J. & KIERSZENBAUM, F. Inhibitory action of elevated levels of adenosine-3':5' cyclic monophosphate on phagocytosis: Effects of macrophage-*Trypanosoma cruzi* interaction. *Journal of Immunology*, 129:2759-2762, 1982.
- YU LEE, L. Y. Prolactin: Role in T-cell proliferation. Molecular basis of the immune response, Bona (ed). *Annals of the New York Academy of Sciences*, 546:245-247, 1988.

Capítulo 6



Relação Materno-Fetal na Infecção Chagásica Experimental

Maria Teresa Rivera & Silvana Marques de Araújo

A prevalência da infecção por *Trypanosoma cruzi* em mulheres grávidas varia de 2% a 51% em centros urbanos e de 23% a 81% em zonas endêmicas da América Latina (Bittencourt, 1992). Na primeira parte deste capítulo, analisaremos os dados da literatura relacionados às conseqüências da gravidez sobre a infecção da mãe, a infecção congênita e a transmissão de anticorpos maternos.

6.1 A Relação Materno-fetal e Mãe-filho

6.1.1 Conseqüências da Gravidez sobre a Infecção da Mãe

A literatura relata somente sete casos de infecção aguda durante a gestação (Bittencourt, 1988). Quatro destas mulheres tiveram crianças prematuras e as outras três tiveram crianças a termo, sem complicações. A maioria dos casos, apresentados pela literatura, tratava de pacientes infectadas mas assintomáticas (Howard, 1976; Bittencourt, 1976). Duas publicações salientam a ausência de alterações patológicas em mulheres grávidas que apresentavam forma cardíaca crônica da doença de Chagas (Oliveira et al., 1968) e mais recentemente, outra publicação (Gilson et al., 1995) confirma este dado em uma mulher grávida que apresentava problemas cardíacos e gastrointestinais relacionados com a fase crônica da doença de Chagas. Um caso de morte materna no início da gravidez, diretamente associada com a doença de Chagas, foi relatado por Freitas & Pinto Lima, em 1950. Dois falecimentos fora da gravidez foram observados no estudo de Oliveira et al. (1968), onde foram seguidas 106 mulheres grávidas e infectadas por *T. cruzi*. Até o momento não existem dados precisos com relação à exacerbação da parasitemia durante a gravidez, nem foram estudadas as interações entre a infecção por *T. cruzi*, a capacidade de reprodução e o controle da infecção durante a gestação (Bittencourt, 1992).

6.1.2 Doença de Chagas Congênita

Como a infecção por *T. cruzi* pode ser transmitida ao feto por via transplacentária, a relação mãe-filho na doença de Chagas tem sido estudada sobretudo neste contexto. A transmissão pode acontecer tanto durante a fase aguda, quanto

durante a fase crônica da infecção materna (Howard, 1976; Bittencourt, 1976; Azogue & Darras, 1991).

Em regiões endêmicas a transmissão congênita do *T. cruzi* é um evento freqüente. Sua prevalência é mais elevada na Bolívia, chegando a 14,8% em Santa Cruz de la Sierra (Azogue et al., 1985). Segundo Bittencourt et al. (1985), é de 10,5% na Bahia, Brasil, e de 10% na Argentina (Votta et al., 1983).

A transmissão para o concepto pode se dar de três formas distintas:

- por via hematogênica (pré-natal), que é a mais freqüente; os tripomastigotas provenientes da mãe invadem ativamente o trofoblasto, sem lesão prévia ou necrose das células trofoblásticas, penetrando, assim, nas diferentes células placentárias (Dvorak & Schmunis, 1972; Bittencourt, 1988). Os parasitas transformam-se em amastigotas, multiplicam-se e são liberados na corrente circulatória fetal após transformarem-se, novamente, em tripomastigotas e romperem as células hospedeiras (Bittencourt, 1988; Azogue & Darras, 1991);
- através do líquido amniótico os parasitas podem contaminar o feto quando ele o aspira (Bittencourt et al., 1981);
- por via oral, através do leite materno (pós-natal) (Mazza et al., 1936; Medina-Lopez, 1983). Segundo Bittencourt (1992), esta forma de transmissão é rara.

A doença de Chagas congênita é grave e provoca freqüentemente aborto, fetos prematuros e morte perinatal (Bittencourt, 1976). Um recém-nascido de mãe chagásica pode nascer assintomático e os sintomas de fase aguda aparecerem alguns dias ou meses mais tarde (Howard, 1976; Azogue & Darras, 1991), com mortalidade de 49% durante o primeiro ano de vida (Bittencourt, 1988, 1992).

A metodologia utilizada no diagnóstico da infecção chagásica em recém-nascidos é:

- exame parasitológico direto (método de Strout) em sangue do cordão umbilical e do recém-nascido (Azogue & Darras, 1991);
- estudo patológico de placentas e seus anexos (Azogue & Darras, 1991; Bittencourt, 1992);
- xenodiagnóstico (Azogue & Darras, 1991; Bittencourt, 1992);
- estudo sorológico de anticorpos IgM e IgG do recém-nascido, com especificidade para o antígeno SAPA (Reyes et al., 1990; Bittencourt, 1992).

6.1.3 Transmissão de Anticorpos da Mãe ao Feto

No homem, os anticorpos maternos anti *T. cruzi* foram evidenciados no sangue do cordão umbilical, indicando assim uma clássica transmissão transplacentária (Miles, 1972; Brenière et al., 1983). No entanto, nenhum dado existe sobre os isotipos de imunoglobulinas da classe G (IgG) transmitidos, nem sobre a proteção que eles possam eventualmente exercer.

A transmissão de anticorpos maternos e de seus idiotipos pode também induzir *in utero* uma sensibilização antiidiotípica de linfócitos T do feto. Este fenômeno poderia influenciar o desenvolvimento da futura resposta imune neste feto e a mortalidade de recém-nascidos à uma infecção por *T. cruzi* adquirida após o nascimento em zona endêmica para a doença de Chagas (Eloi-Santos et al., 1989).

As transmissões pré-natal e pós-natal de anticorpos maternos têm sido demonstradas em camundongos e ratos (Kolodny, 1939; Miles, 1972; Baitner, 1986; Marques de Araújo et al., 1996). A imunidade assim adquirida não impede a infecção, mas diminui a mortalidade e a gravidade de uma infecção adquirida após o nascimento, se esta acontece até dez dias depois do desmame dos animais (Kolodny 1939; Marques de Araújo & Chiari, 1996). Por outro lado, não se pode deixar de mencionar o papel prejudicial que anticorpos maternos anti *T. cruzi* podem desenvolver em camundongos descendentes de mães chagásicas (Marques de Araújo et al., 1996) que analisaremos mais adiante. Os isotipos de anticorpos preferencialmente transmitidos pelos animais infectados por *T. cruzi* não têm sido estudados. De maneira geral sabe-se que as imunoglobulinas IgG2a estão presentes em maior quantidade no leite dos camundongos que em outros isotipos. A passagem de imunoglobulinas por via digestiva limita-se às IgG que se fixam a receptores Fc da superfície dos enterócitos do jejuno (Simister, 1990)

6.2 A Relação Materno-Fetal na Infecção Experimental por *T. cruzi*

Como já comentado, a relação mãe-filho na doença de Chagas tem sido estudada sobretudo no contexto da transmissão congênita no homem e no animal, dispondo-se de poucos dados sobre outros aspectos importantes desta relação. As conseqüências da infecção da mãe sobre o crescimento e o desenvolvimento imunitário do feto e do recém-nascido, além da avaliação da suscetibilidade da prole à infecção pelo *T. cruzi* sem transmissão congênita do parasito, não haviam sido estudadas.

O Laboratório de Parasitologia da Universidade Livre de Bruxelas dedicou-se ao estudo da relação materno-fetal e da relação mãe-filho, abordando estas perguntas em um modelo experimental sem a transmissão congênita do *T. cruzi*. Foi escolhido o camundongo Balb/C que, quando infectado pelo parasita, apresenta suscetibilidade intermediária à infecção e desenvolve a doença de Chagas crônica de maneira semelhante à do homem, permitindo, assim, abordar também outros aspectos da interação entre a infecção, a gravidez e a imunidade materna.

6.2.1 Interações entre a Infecção Crônica por *T. cruzi* do Camundongo com a Gestaçào

Estudaram-se as conseqüências da infecção crônica por *T. cruzi* sobre a capacidade de reprodução de camundongos e sobre o crescimento fetal. Também analisaram-se uma eventual transmissão congênita e a influência da gestaçào sobre a infecção da mãe. As principais conclusões deste trabalho (Carlier et al., 1987) foram:

- a infecção por *T. cruzi* não modifica nem a fecundidade nem a reprodução no camundongo. Estes resultados foram evidenciados pela comparação das taxas de acasalamento, gravidez e de implantações e reabsorções fetais nos cornos uterinos, observadas entre fêmeas grávidas, infectadas cronicamente, e seus controles, fêmeas grávidas não infectadas;
- a infecção por *T. cruzi* altera o peso dos camundongos antes da gestaçào mas não altera o peso das placentas;
- a infecção crônica da mãe neste modelo não leva à infecção congênita mas provoca um retardo do crescimento fetal.

Estes resultados mostraram que a gestaçào não modifica a infecção da mãe nem a sua capacidade de reprodução, mas leva a um retardo do crescimento intra-uterino, sem transmissão do parasito.

6.2.2 A Lactação Diminui a Mortalidade mas não a Parasitemia Durante a Fase Aguda da Infecção por *T. cruzi* em Camundongos

Analisou-se a influência da lactação sobre o desenvolvimento da infecção aguda por *T. cruzi* e deste estudo concluiu-se que a mortalidade de fêmeas de camundongos em lactação infectadas é inferior à de fêmeas infectadas fora do período de lactação (após um a dez dias de lactação) (Rivera et al., 1991). Por outro lado, fêmeas de camundongos infectadas em período de lactação suportaram parasitemia superior (4,5 vezes maior) e tiveram o período de vida mais longo que seus controles, fêmeas infectadas fora do período de lactação. Estas observações indicam claramente o efeito benéfico da lactação sobre a fase aguda da infecção por *T. cruzi* em camundongos, diminuindo as conseqüências letais de uma parasitemia muito elevada.

6.2.3 A Resposta Imune Humoral e Celular em Fêmea de Camundongo Grávida e Cronicamente Infectada por *T. cruzi*

De acordo com os dados obtidos anteriormente, que não evidenciaram influência da gravidez sobre o nível da infecção de fêmeas de camundongos infectados, e sabendo que a gravidez pouco altera o estado imunitário de um animal não infectado, pretendeu-se com este estudo esclarecer se a resposta imune, profundamente modificada em camundongos infectados por *T. cruzi*, era ou não modificada pela gravidez. Os resultados obtidos foram os seguintes, considerando a imunidade humoral (Carlier et al., 1987):

- a gravidez modifica sensivelmente a hipergamaglobulinemia associada à infecção por *T. cruzi*. Os níveis de IgG, sobretudo os de IgG2a e de IgG3, são particularmente baixos; os de IgM são pouco afetados e os de IgA não são afetados de forma alguma. Os níveis de complexos imunes circulantes, o fator reumatóide e os anticorpos anti DNA estão igualmente reduzidos de maneira significativa. Estes dados indicam uma diminuição sensível no nível de ativação policlonal B, que tem lugar durante a infecção crônica pelo parasita;
- a gravidez diminui a taxa de anticorpos anti *T. cruzi* (-37%), mas não modifica a de IgM, nem a dos anticorpos líticos;
- a gravidez não modifica, sensivelmente, o reconhecimento dos antígenos de *T. cruzi* pelos anticorpos destes camundongos.

Estes resultados permitiram afirmar que a gravidez, durante a infecção crônica pelo *T. cruzi*, está associada a uma diminuição de certos parâmetros imunológicos humorais, os quais, no entanto, são insuficientes para modificar o curso da infecção.

O papel da gestação sobre a imunidade celular em camundongos foi estudado utilizando-se o teste de proliferação celular com células de baço de camundongo, obtidas no 17^o dia de gestação, ante a Con A e ante uma preparação antigênica de *T. cruzi* (Rivera et al., dados não publicados). Estudou-se também a produção de duas citocinas multifuncionais importantes, IFN- γ e TNF- α , que podem intervir durante a gestação (Chen et al., 1991; Shirahata et al., 1992) e que também estão implicadas durante a infecção pelo *T. cruzi* (Tarleton & Nabors, 1991; Torrico et al., 1991). A detecção destas citocinas foi feita em sobrenadantes celulares e no soro dos camundongos estudados.

Os resultados mostraram claramente que a gravidez não afeta nem a resposta proliferativa específica nem a inespecífica. No entanto, a infecção por si mesma deprime a resposta celular à Con A em fêmeas de camundongos grávidas ou não. Isto confirmou, mais uma vez, o efeito imunossupressor da infecção por *T. cruzi* em camundongos e evidenciou o papel considerável da infecção da mãe sobre seu estado imunológico e de suas eventuais repercussões sobre o feto.

A produção das citocinas estudadas nos sobrenadantes de células esplênicas não se modifica com a gravidez. Ao contrário, a produção sérica de TNF- α mostrou-se aumentada em fêmeas de camundongos infectadas e grávidas. Este último resultado incentivou o prosseguimento dos estudos desta citocina nas referidas fêmeas, como será visto mais adiante.

6.2.4 Diminuição da Resistência à Infecção por *T. cruzi* Adquirida na Prole de Fêmeas de Camundongos Cronicamente Infectados

Diversos elementos imunológicos como anticorpos, antígenos circulantes, imunocomplexos, citocinas ou células sensibilizadas podem ser transmitidas da mãe à sua prole e assim modular a resposta imune de sua

descendência. No que concerne à prole de fêmeas de camundongos grávidas infectadas, pretende-se inicialmente verificar a hipótese da existência de uma possível modificação na resistência destas proles à infecção pelo *T. cruzi* adquirida após seu nascimento. Para tanto, seguiu-se o desenvolvimento de uma infecção pelo *T. cruzi* em proles com dois meses de idade, descendentes de mães cronicamente infectadas. Os resultados obtidos podem ser assim resumidos (Carlier et al., 1992):

- ausência de infecção congênita na prole de fêmeas de camundongos cronicamente infectadas no modelo utilizado;
- observação de parasitemia e mortalidade mais elevadas na prole descendente de mães infectadas;
- esta diminuição da resistência da prole a uma infecção adquirida pelo *T. cruzi* é máxima quando esta prole foi exposta à influência materna no período pré-natal (placenta) e pós-natal (leite). Este fato leva a prole a uma incapacidade de controlar a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, mas não tem efeito sobre sua fase crônica;
- este fenômeno é específico para o *T. cruzi*, e mostrou-se reversível e transitório uma vez que não é observado em proles infectadas aos cinco meses de idade.

Estes resultados sugerem uma depressão da resposta imune à infecção adquirida por *T. cruzi* em proles descendentes de fêmeas de camundongos cronicamente infectadas com este mesmo parasito. Sugerem ainda uma influência materna que pode ser prejudicial e não protetora para a prole.

6.2.5 Produção Elevada do Nível de Tnf- α em Fêmeas de Camundongos Grávidas Infectadas Cronicamente por *T. cruzi* e seu Aumento nos Fetos e na Prole destas Fêmeas

Os trabalhos anteriormente realizados mostraram, por um lado, que a infecção crônica por *T. cruzi* em fêmeas de camundongos grávidas levava a um retardo de crescimento fetal intra-uterino. Por outro lado, a prole destas mesma fêmeas cronicamente infectadas apresentou níveis elevados de parasitemia e mortalidade, sugerindo uma depressão em sua resposta imune a uma infecção adquirida por *T. cruzi*. Considerando que o TNF- α é uma citocina multifuncional implicada no crescimento fetal, na maturação dos tecidos linfóides fetais e que pode dar origem a lesões fatais em fenômenos inflamatórios agudos (Clark & Chaudri, 1988; De Kossodo et al., 1992; Giroir et al., 1992), investigou-se o seu papel nos fenômenos anteriormente observados nas interações materno-fetal e mãe-filho na infecção pelo *T. cruzi*. Estudou-se assim, a produção dessa citocina em fêmeas de camundongos infectadas e grávidas, no timo fetal e na prole destas fêmeas, especialmente quando apresentavam uma infecção adquirida pelo *T. cruzi*. Os resultados obtidos foram os seguintes (Rivera et al., 1995):

- a gestação aumenta os níveis séricos de TNF- α em fêmeas de camundongos cronicamente infectados pelo *T. cruzi*;
- as células tímicas de fetos provenientes de mães infectadas por *T. cruzi* produzem muito mais RNA de TNF- α ;
- a prole (machos e fêmeas) descendente de fêmeas cronicamente infectadas é capaz de produzir níveis elevados de TNF- α sérico circulante, depois de estimulados com LPS.

Estes resultados sugerem que descendentes de fêmeas de camundongos cronicamente infectadas pelo *T. cruzi* são estimulados a produzir níveis elevados TNF- α antes e após o nascimento. Isto mostra o papel importante desta citocina nas relações materno-fetal e mãe-filho durante a infecção pelo *T. cruzi*.

6.2.5 Os Anticorpos Maternos Anti *T. cruzi* de Fêmeas de Camundongos e sua Influência no Agravamento da Infecção Aguda por *T. cruzi* de sua Prole

Outros fatores solúveis existentes no soro de fêmeas de camundongos cronicamente infectadas com *T. cruzi* e que podem ser transmitidos à sua prole são os anticorpos específicos contra este parasita. Neste estudo analisou-se o possível papel destes anticorpos maternos no agravamento da infecção adquirida por *T. cruzi* na prole descrita anteriormente. Para tanto, reproduziu-se a fisiologia da transferência de anticorpos maternos anti *T. cruzi* previamente observados no homem e no camundongo, inoculando em fêmeas de camundongos grávidas, em período de lactação e não infectadas, soro crônico ou anticorpos anti *T. cruzi* purificados, provenientes de fêmeas de camundongos cronicamente infectadas. Foram obtidos os seguintes resultados (Marques de Araújo et al., 1996):

- fêmeas de camundongos grávidas e lactantes inoculadas com soro crônico ou com anticorpos anti *T. cruzi* purificados apresentaram nível mais baixo de anticorpos circulantes quando comparadas com fêmeas infectadas fora da gravidez e do período de lactação, sugerindo assim que existe transferência de anticorpos para o feto e para a prole que está sendo aumentada;
- a prole descendente destas fêmeas inoculadas com soro ou anticorpos anti *T. cruzi* purificados e que por sua vez foi inoculada com o parasita aos dois meses de idade apresentou parasitemia mais elevada e menor sobrevida que camundongos infectados com *T. cruzi* e sem transferência de anticorpos maternos anti *T. cruzi*.

Estes resultados mostraram que a transferência de anticorpos maternos pode exercer influência prejudicial sobre sua prole. Isto não exclui a função de outros fatores maternos transmitidos à sua descendência, como os antígenos parasitários circulantes ou os fatores envolvidos na indução da transcrição do TNF- α , analisada anteriormente.

Como perspectivas deste trabalho experimental pode-se considerar os seguintes aspectos: o conjunto dos resultados obtidos leva à reflexão sobre a relação da influência materna da infecção pelo *T. cruzi* sobre a susceptibilidade de sua prole à infecção por este mesmo parasito e deixa claro sua influência prejudicial em certas etapas da vida pré e pós-natal; leva ao questionamento sobre o papel das relações materno-fetais e sobre o desenvolvimento das formas clínicas da doença de Chagas na qual existe um gradiente considerável de gravidade. As crianças em áreas endêmicas são particularmente sensíveis à infecção aguda pelo *T. cruzi* durante os cinco primeiros anos de vida e este modelo experimental sugere uma explicação possível para esta observação.

Evidentemente as conclusões deste trabalho experimental não podem ser extrapoladas diretamente para o homem, no entanto podem conduzir a investigações epidemiológicas sobre a possibilidade de retardo de crescimento fetal em crianças não infectadas, nascidas de mães infectadas e o impacto deste retardo sobre sua saúde no futuro. Podem ainda, conduzir à suspeita de ocorrência de infecção adquirida mais grave em filhos de mães chagásicas. Aventadas estas situações, a dupla mãe chagásica-filho poderá ser vista como um grupo de alto risco, levando a decisões de saúde pública que tenham como objetivo limitar os efeitos graves da doença de Chagas em áreas endêmicas.

Referências Bibliográficas

- AZOGUE, E. & DARRAS, C. Estudio prospectivo de la enfermedad de Chagas en recién nacidos con infección placentaria por *Trypanosoma cruzi* en Santa Cruz-Bolivia. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24:105-109, 1991.
- AZOGUE, E.; FUENTE, L.A. & DARRAS, C. Congenital Chagas' disease in Bolivia: Epidemiological aspects and pathological findings. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 79:176-180, 1985.
- BAITNER, K. *Intestinal absorption of macromolecules and immune transmission from mother to young*. 1986. CRS press.

- BITTENCOURT, A. L. Congenital Chagas' disease. *American Journal of Disease of Children*, 130:97-103, 1976.
- BITTENCOURT, A. L. American trypanosomiasis Chagas' disease. In: *Parasitic infections in pregnancy and the newborn*. 1988. Oxford: Oxford Medical Publications, p. 62-86.
- BITTENCOURT, A. L. Possible risk factors for vertical transmission of Chagas' disease. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 34:403-408, 1992.
- BITTENCOURT, A. L.; MOTA, E.; RIERO FILHO, R.; FERNANDES, L. G.; CERQUEIRA DE ALMEIDA, P. R.; SHERLOCK, I.; MAGUIRE, J.; PIESMAN, J. & TODD, C. W. Incidence of congenital Chagas' disease in Bahia, Brazil. *Journal of Tropical Pediatrics*, 31:242-248, 1985.
- BITTENCOURT, A. L.; RODRIGUEZ DE FREITAS, L. A.; GALVÃO DE ARAUJO, M. O. & JACOMO, K. Pneumonitis in congenital Chagas' disease. A study of ten cases. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 30:38-42, 1981.
- BRENIERE, F. S.; BAILLY, M.; CARRASCO, R. & CARLIER, Y. Transmission transplacentaire des anticorps anti-*Trypanosoma cruzi*. *Cahiers ORSTOM, Série Entomologie Medicale et Parasitologie Vol XXI*:139-140, 1983.
- CARLIER, Y.; RIVERA, M. T.; TRUYENS, C.; PUISSANT, F. & MILAIRE, J. Interactions between chronic murine *Trypanosoma cruzi* infection and pregnancy: Fetal growth retardation. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 37:534-540, 1987.
- CARLIER, Y.; RIVERA, M. T.; TRUYENS, C.; GOLDMAN, M.; LAMBERT, P.; FLAMENT, J.; BAUWENS, D. & VRAY, B. Pregnancy and humoral immune response in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. *Infection & Immunity*, 55:2496-2501, 1987.
- CARLIER, Y.; RIVERA, M. T.; TRUYENS, C.; ONTIVERO, M.; FLAMENT, J.; VAN MARCK, E. & DE MAERTELAER, V. Chagas' disease: Decreased resistance to *Trypanosoma cruzi* acquired infection in offspring of infected mice. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 46:116-122, 1992.
- CHEN, H. L.; YANG, Y.; HU, X. L.; YELAVARTHI, K. K.; FISHBACK, J. L. & HUNT, J. S. TNF- α mRNA and protein are present in human placental and uterine cells at early and late stages of gestation. *American Journal of Pathology*, 139:327-335, 1991.
- CLARK, I. A. & CHAUDHRI, G. Tumor necrosis factor in malaria-induced abortion. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 39:246-249, 1988.
- DE KOSSODO, S.; GRAU, G. E.; DANEVA, T.; POINTAIRE, P.; FOSSATI, L.; ODY, C.; ZAPE, J.; PIGUET, P. F.; GAILLARD, R. C. & VASSALLI, P. Tumor Necrosis Factor α is involved in mouse growth and lymphoid tissue development. *Journal of Experimental Medicine*, 176:1259-1264, 1992.
- DVORAK, J. A. & SCHMUNIS, G. A. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with mouse peritoneal macrophages. *Experimental Parasitology*, 32:289-300, 1972.
- ELOI-SANTOS, S. M.; NOVATO-SILVA, E.; MASELLI, V. M.; GAZZINELLI, G.; COLLEY, D. G. & CORREA-OLIVEIRA, R. Idiotypic sensitization in utero of children born to mothers with schistosomiasis or Chagas' disease. *Journal of Clinical Investigation*, 84:1028-1031, 1989.
- FREITAS, J. L. P. & PINTO LIMA, F. X. Sobre a transmissão intrauterina da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. A propósito de uma observação anátomo-clínica. *Revista do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina São Paulo*, 5:1-8, 1950.
- GIROIR, B. P.; BROWN, T. & BEUTLER, B. Constitutive synthesis of tumor necrosis factor in the thymus. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 89:4864-4868, 1992.
- GILSON, G. J.; HARNER, K. A.; ABRAMS, J.; IZQUIERDO, L. A. & CURET, L. B. Chagas' disease in pregnancy. *Obstetrics & Gynecology*, 86:646-647, 1995.
- HOWARD, J. E. Clinical aspects of congenital Chagas' disease. American Trypanosomiasis research. *PAHO Scientific Publication*, 318:212-215, 1976.
- KOLODNY, M. H. The transmission of immunity in experimental trypanosomiasis *Trypanosoma cruzi* from mothers rats to their offspring. *American Journal of Hygiene*, 30:19-39, 1939.
- MARQUES DE ARAÚJO, S. & CHIARI, E. *Trypanosoma cruzi* infection in offspring born to chagasic C3H/He mice mothers. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:211-216, 1996.
- MARQUES DE ARAÚJO, S.; RIVERA, M. T.; ELBOUHDIDI, A.; DE MAERTELAER, V. & CARLIER, Y. Maternal *Trypanosoma cruzi*-specific antibodies and worsening of acute infection in mouse offspring. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 54:13-17, 1996.
- MAZZA, S.; MONTANA, A.; BENITEZ, C. Transmisión del *Schizotrypanum cruzi* al niño por leche de la madre con enfermedad de Chagas. Universidad Buenos Aires. *MEPRA*, 28:41-46, 1936.
- MEDINA-LOPEZ, M. D. *Transmissão materno-infantil da doença de Chagas*. 1983. Tese. Brasília: Universidade do Brasil.

- MILES, M. A. *Trypanosoma cruzi* milk transmission of infection and immunity from mother to young. *Parasitology*, 65:1-9, 1972.
- OLIVEIRA, F. C.; LOPES, E. R. & ALONSO, M. T. Doença de Chagas e gravidez. Considerações sobre a conduta obstétrica. *Folha Medica*, 56:165-177, 1968.
- REYES, M. B.; LORCA, M.; MUNOZ, P. & FRASCH, A. A. Fetal IgG specificities against *Trypanosoma cruzi* antigens in infected newborns. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 87:2846-2850, 1990.
- RIVERA, M. T.; MARQUES DE ARAÚJO, S.; LUCAS, R.; DEMAN, J.; TRUYENS, C.; DEFRESNE, M. P.; DE BAETSELIER, P. & CARLIER, Y. High TNF- α production in *Trypanosoma cruzi*-infected pregnant mice increased TNF-gene transcription in their offspring. *Infection & Immunity*, 63:591-595, 1995.
- RIVERA, M. T.; THIBAUT, G. & CARLIER, Y. Lactation reduces mortality but not parasitaemia during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 85:603-604, 1991.
- SHIRAHATA, T.; MUROYA, N.; OHTA, C.; GOTO, H. & NAKANE, A. Correlation between increased susceptibility to primary *Toxoplasma gondii* infection and depressed production of gamma interferon in pregnant mice. *Microbiology & Immunology*, 36:81-91, 1992.
- SIMISTER, N. E. Transport of monomeric antibodies across epithelia. In: *Fc receptors and the action of antibodies*, 1990. Washington, DC: American Society for Microbiology, p. 57-73.
- TARLETON, R. L. & NABORS, G. S. Regulation of cytokine production in Chagas' disease. In: *Molecular and immunological aspects of parasitism*, 1991. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science, p. 15-30.
- TORRICO, E.; HEREMANS, H.; RIVERA, M. T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A. & CARLIER, Y. Endogenous IFN-g is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Journal of Immunology*, 146:3626-3632, 1991.
- VOTTA, R. A.; PARADA, O. H. & WINOGRAD, R. H. *Obstetricia*. 1983. Buenos Aires: Ed. Lopez Libreros SLL.

Capítulo 7



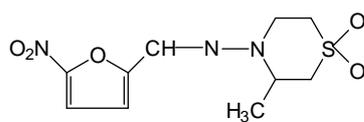
Quimioterapia Experimental

Solange L. de Castro, Ricardo M. Santa-Rita & Marcelo Einicker-Lamas

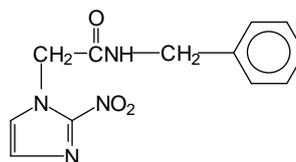
Praticamente desde a descoberta da doença de Chagas, seu tratamento vem sendo investigado. Na década de 60, o desenvolvimento de drogas contra esta doença estava relativamente atrasado em relação àquele contra infecções por outros tripanosomatídeos, sendo o *Trypanosoma cruzi* geralmente resistente a compostos ativos contra leishmanias e outros tripanosomas (Hawking, 1973). Podemos dividir o desenvolvimento da pesquisa destas drogas em duas fases, com o divisor na década de 70, quando foram descritos o nifurtimox e o benznidazol.

7.1 Estudos com Nifurtimox e Benznidazol

Atualmente, o tratamento da doença de Chagas está restrito a duas drogas nitro-heterocíclicas: o nitrofurano nifurtimox (Nif, Lampit, Bayer, 3-metil-4-(5'-nitrofurfurilidenoamino) tetrahydro-4H-1,4-tiazina-1,1-dióxido) introduzido na clínica em 1965, e que teve sua produção descontinuada no Brasil, e o 2-nitroimidazol benznidazol (Bz, Radanil ou Rochagan, Roche, N-benzil-2-nitro-1-imidazol acetamida) introduzido na década seguinte (revisto por Luquetti, 1997). Nif e Bz são ativas na fase aguda da doença de Chagas, porém têm efeito limitado sobre a forma crônica da doença (Rassi, 1982) as principais indicações destas drogas são: fase aguda da infecção, forma congênita, reativação associada com imunossupressão, infecções recentes e em situações de transfusões ou transplante de órgãos. As drogas podem também ser indicadas para o tratamento de alguns pacientes nas formas indeterminada e crônica com fraco envolvimento cardíaco. A prescrição do tratamento etiológico na fase crônica é controversa devido a dificuldades em monitorar sua eficiência terapêutica (Viotti et al., 1994) os esquemas mais utilizados de tratamento são: Nif por 60-90 dias, 8-10 mg/kg/dia em adultos e menos que 15 mg/kg/dia em crianças; Bz por 60 dias, 5 mg/kg/dia em adultos e menos de 10 mg/kg/dia em crianças. Ambas as drogas devem ser divididas em duas a três frações após as refeições. Reações adversas estão associadas a perturbações no trato digestivo como inapetência, náusea, vômito e perda de peso com Nif e dermatopatia e polineuropatia com Bz. As principais limitações das drogas são a necessidade de tempos longos de administração e efeitos colaterais (Coura, 1996; Cançado, 1997). Foram também relatadas falhas terapêuticas, provavelmente relacionadas com a variação de sensibilidade às drogas nas populações de parasitas na Américas Central e do Sul.



Nifurtimox



Benznidazol

Nif e Bz em estudos em animais experimentais o Nif, testado sobre infecções em diferentes espécies de animais, apresentou atividade dependente da cepa do parasita (Bock et al., 1969; Haberkorn & Gonnert, 1972). A análise ultra-estrutural dos amastigotas intracelulares mostrou alterações semelhantes às descritas no estudo em cultura de células (Voigt et al., 1972, 1973) bem como a indução de vacuolização, inchamento da mitocôndria e alterações de membrana parasita, além de lesões nas células cardíacas ao redor de parasitas danificados (Andrade & Freitas, 1987).

A administração de Bz a camundongos, em dose única (1 g/kg), sete dias pós-infecção (cepa Y), levou a uma queda progressiva na parasitemia, que se negativou após dez dias (Richle, 1973; Polak & Richle, 1978).

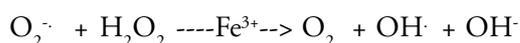
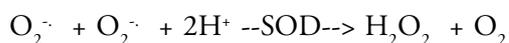
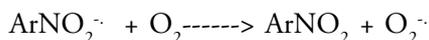
Vários estudos foram também realizados comparando-se a sensibilidade de diferentes cepas frente ao Nif e ao Bz em infecções experimentais:

- os percentuais de cura em infecções com a cepa Peru foram superiores àqueles com a cepa Colombiana, observando-se desenvolvimento de resistência ao Nif e ao Bz (Andrade et al., 1975, 1977; Andrade & Figueira, 1977);
- Brener et al. (1976), comparando as cepas Y e CL, e Andrade et al. (1985), analisando a susceptibilidade de trinta cepas de diferentes regiões, observaram uma boa correlação entre as atividades das duas drogas para uma dada cepa, indicando que os diferentes percentuais de cura estariam associados a fatores do parasita;
- analisando 47 cepas isoladas de diferentes fontes, Filardi & Brener (1987) relataram uma larga faixa de susceptibilidade ao Nif e ao Bz, correlacionada em vários casos com a região geográfica: as provenientes do sul do Brasil e da Argentina eram mais sensíveis em relação às de Minas Gerais. Essa diferença poderia estar associada a diferentes percentuais de cura de pacientes relatados na Argentina e no Brasil (Cançado & Brener, 1979).

Infectando camundongos com parasitas isolados de quatro pacientes agudos (antes do tratamento com Bz), Filardi & Brener (1987) observaram que animais que receberam parasitas provenientes dos dois pacientes tratados, considerados curados, responderam bem ao tratamento, enquanto o contrário ocorreu com aqueles infectados com parasitas dos pacientes não curados, mostrando assim correlação entre os resultados experimentais e clínicos.

Andrade et al. (1992) observaram uma correlação de 81,8% entre o resultado do tratamento de pacientes com Nif e o de camundongos recém-natos. No caso desta droga, a correlação entre as dosagens para camundongos foi baseada em Haberkorn & Gonnert (1972), que estabeleceram a equivalência entre doses de 15 ou 10 mg/kg para homens adultos e doses de 180 ou 120 mg/kg para os animais (Andrade et al., 1992).

O mecanismo de ação de Nif foi intensamente estudado pelo grupo de Do Campo (revisto em Do Campo & Moreno, 1986); a redução metabólica do grupo nitro por nitroreductases foi de fundamental importância, levando à geração de radical nitroanion. Sendo o *T. cruzi* parcialmente deficiente nos mecanismos de detoxicação, ele se torna mais susceptível a produtos de redução do oxigênio (Do Campo et al., 1976; Boveris et al., 1980; Morello, 1988).



Na presença de Nif em *T. cruzi* foram observados aumentos no consumo de O_2 , na liberação de H_2O_2 , e na taxa de produção de ion superóxido e de H_2O_2 . Também foi detectado o radical nitroanion na presença de NADPH em concentrações de Nif que causam efeito sobre a proliferação do parasita. A mesma estava na faixa de concentração sérica alcançada em adultos após dose única de 15 mg/kg ($\cong 10$ mM) (Do Campo & Stoppani, 1979).

O dano oxidativo foi descartado como mecanismo de ação de Bz para *T. cruzi*, pois em concentrações semelhantes às utilizadas em estudos com Nif, nas quais a droga mostrou atividade tripanocida, não houve estímulo da geração de ion superóxido e de H₂O₂. Somente foi detectado radical nitroanion quando o Nif foi usado em concentrações muito superiores (10 mM) àquelas necessárias para afetar o parasita. A ação de Bz sobre *T. cruzi* poderia envolver um efeito direto sobre a síntese de macromoléculas por ligação covalente ou outras interações dos intermediários de nitroredução com componentes celulares (Polak & Richle, 1978; Goijman et al., 1985; Do Campo & Moreno, 1986), ou uma ação inibitória direta de Bz sobre a atividade catenante da DNA topoisomerase do parasita (Riou et al., 1984). Foi observada por Diaz de Toranzo et al. (1988) a ligação de Bz à DNA, lipídeos e proteínas de epimastigotas de *T. cruzi*.

Nif e Bz apresentam efeitos colaterais sérios com danos, principalmente, ao sistema nervoso central e ao trato gastrointestinal; em alguns casos o tratamento foi temporariamente suspenso ou mesmo abandonado.

Estudos em animais experimentais mostraram que potencialmente estas drogas podem produzir efeitos danosos na fertilidade e no processo reprodutivo (Hoffman, 1972; Lorke, 1972; Navarro & Nagel, 1984; Bernacchi et al., 1986; Vieira et al., 1989). O tratamento de camundongos com Nif levou a um aumento na formação de micronúcleos na medula óssea, enquanto o Bz não apresentou efeito (Gorla & Castro, 1985). Coelho tratados com Nif ou Bz (8mg/kg/dia/60 dias) apresentaram alta incidência de linfomas malignos e, no caso de Bz, em 20% dos animais foi observada atrofia testicular (Teixeira et al., 1990a,b). Por outro lado, em estudos com camundongos tratados com Bz, não foi detectado aumento na incidência de linfomas (Lima Pereira et al., 1986).

No caso de crianças chagásicas tratadas com Bz, Gorla et al. (1988) observaram um aumento nos danos ao nível de cromossomas em linfócitos periféricos. Em crianças tratadas com Nif o nível de dano genético espontâneo foi treze vezes superior às chagásicas não tratadas (Gorla et al., 1989).

7.2 Esquemas e Acompanhamento do Efeito de Drogas em Animais Experimentalmente Infectados

Como o *T. cruzi* infecta um grande número de células *in vitro*, o "tratamento" de culturas infectadas permite estudos quantitativos. Com quantidades pequenas de droga, é possível a detecção da atividade sobre formas intra e/ou extracelulares, bem como de sua toxicidade para a célula hospedeira. Este tipo de estudo possibilita o controle das condições experimentais. Devemos estar alertas porém para o fato de que a simplificação introduzida pelo contato direto droga/célula infectada não permite extrapolação dos resultados para situações *in vivo*, pois a influência do metabolismo e da resposta imune não podem ser avaliadas.

Entre os sistemas *in vitro* para o estudo de drogas, diferentes tipos de cultura de tecidos ou células foram utilizados (revisto em Brener, 1975, 1979 e De Castro, 1993). A abordagem *in vitro* facilita a elaboração de ensaios em animais experimentais e testes clínicos para desenvolvimento de quimioterápicos mais eficazes e menos tóxicos. Naturalmente a simplificação oferecida por esta abordagem não permite a extrapolação dos resultados para situações *in vivo*, pois, com o contato direto da droga a ser testada com a célula infectada, a influência do metabolismo e da resposta imune do hospedeiro não podem ser avaliadas.

Em experimentos com animais, a maioria dos tratamentos foi realizada com tempos muitos curtos e os resultados expressos apenas como reduções da parasitemia, mortalidade e duração da fase aguda. A introdução de esquemas de longa duração (Brener, 1961a,b) e a padronização de ensaios de acompanhamento representaram um grande avanço nessa área.

Não existe até hoje um modelo consensual claro e caracterizado no qual o efeito de um quimioterápico possa ser acompanhado nas fases aguda e crônica da infecção chagásica. No modelo de camundongo infectado por *T. cruzi* a principal característica é a existência de grandes diferenças no curso da infecção a depender da cepa de camundongo utilizada e da origem (cepa ou clone) dos parasitas (ver Capítulo 9).

O modelo clássico de estudo de quimioterapia experimental é o de camundongo albino Swiss, não isogênico, infectado com 10^4 tripomastigotas sanguíneos da cepa Y. Nesse modelo há alta parasitemia na segunda semana e alta mortalidade em torno da terceira semana pós infecção, claramente revertidas pelo tratamento específico.

Para estudos das fases indeterminada e crônica, é essencial que o par hospedeiro-parasita escolhido apresente as seguintes características: (a) tenha parasitemia patente, porém baixa mortalidade na fase aguda para acompanhamento nas fases indeterminada e crônica; (b) apresente curvas de parasitemia de intensidade e cinética reprodutíveis, uma vez fixados a idade e o sexo do animal, o inóculo e a via de inoculação; (c) mantenha, na fase, aguda as características clássicas básicas da infecção no camundongo: ativação policlonal, imunossupressão com apoptose, sorologia e resposta linfoproliferativa positiva para antígeno de *T. cruzi* após trinta dias de infecção e miocardite detectável, embora não necessariamente intensa. Os camundongos devem ser acompanhados por quarenta dias (fase aguda), até seis a 48 meses (fases indeterminada e crônica).

Como ponto de partida nestes estudos temos principalmente os trabalhos do grupo de Brener (Brener, 1961a,b, 1962; Filardi & Brener, 1987) e de Andrade (Andrade & Figueira, 1977; Andrade et al., 1985, 1987). Brener (1962) observou que a atividade de drogas é mais rápida e mais facilmente detectada se administrada no dia da infecção ou no dia posterior. Este autor também recomenda, no caso de nova droga, utilizar a dosagem correspondente a cerca de um quinto da LD_{50} (dose que mata 50% dos animais) administrada por dez dias consecutivos. De um modo geral o tempo de tratamento depende do modelo escolhido e, assim, da cinética de parasitemia.

Estudos preliminares, *in vivo*, de drogas tripanocidas se concentram na fase aguda e analisam apenas parasitemia e mortalidade, comparando-se animais infectados tratados e não tratados e utilizando-se os métodos descritos neste manual.

No caso de uma pré-seleção de drogas potencialmente ativas é necessário analisar mais a fundo esta atividade, utilizando além da mortalidade e da parasitemia, diferentes critérios de cura além dos acima mencionados: subinoculação de sangue em recém-nascidos, reinoculação de sangue ou homogenatos de tecidos, xenodiagnóstico, hemocultura, histologia e detecção de anticorpos específicos anti *T. cruzi* e PCR. Segundo Brener (1962), a subinoculação e o xenodiagnóstico apresentam alta eficácia e a reinoculação pode prover resultados importantes na medida que a persistência da infecção está associada com alta imunidade a superinfecções.

De um modo geral, a maioria dos estudos se apoia na cura de animais agudamente infectados, com parasitemia patente, como indicador de sucesso. Porém em infecções humanas os perfis parasitológicos, patológicos e de sensibilidade a drogas se alteram marcadamente com o progresso da infecção. Desta forma o resultado de estudos apenas com animais de fase aguda pode ser deficiente.

Mesmo em trabalhos de quimioterapia experimental utilizando os nitroheterocíclicos Nif e Bz, pouca atenção tem sido dada à resposta imune. Desta forma seria interessante o desenvolvimento de um conjunto de parâmetros indicativos do grau de ativação da resposta inflamatória, de lesão tissular, de capacidade funcional cardiovascular, de intensidade da resposta imune humoral e celular específica e inespecífica, e de expansão de células citotóxicas e/ou auto-reativas que melhor possam complementar os parâmetros parasitológicos que monitoram a carga parasitária de animais experimentalmente infectados e tratados.

7.3 Desenvolvimento de Novas Drogas

Como etapas cruciais no surgimento de novas drogas temos a descoberta de uma estrutura química líder, com a atividade biológica desejada, e o desenvolvimento dessa estrutura em uma forma segura e terapêuticamente efetiva (transformações químicas).

Em poucas ocasiões drogas importantes foram descobertas sem um composto líder, sendo talvez a penicilina uma das poucas exceções. A descoberta deste composto líder pode ocorrer por várias vias:

- triagem randômica: procurar atividade biológica em diferentes compostos, independentemente de sua estrutura, que invariavelmente está associada a um grande volume de triagens e com o acaso;
- triagem direcionada: realizar testes de atividade biológica, após cuidadosa escolha do composto, baseada em compostos que intuitivamente têm semelhança com um outro que apresente sinais de atividade ou que seja ativo sobre outros organismos, ou sobre enzimas ou receptores específicos;
- descoberta racional: identificar uma via metabólica, chave única e vital para o parasita; obter estrutura tridimensional do alvo ou, caso a seqüência de aminoácidos seja suficientemente semelhante a de uma proteína com estrutura conhecida, a modelagem por homologia; obter grandes quantidades de material, geralmente por clonagem; e expressão do gene do alvo. A próxima etapa é o desenho ou procura (síntese ou coleção) de inibidores específicos.

A identificação de um composto líder por qualquer abordagem leva a uma colaboração entre químicos e biólogos dentro de um processo contínuo e iterativo envolvendo: (a) isolamento ou síntese de compostos; (b) desenvolvimento de testes *in vitro* e *in vivo* adequados para análise de atividade biológica; (c) identificação de diferenças entre parasita e hospedeiro; (d) correlação de estrutura/atividade visando boa atividade biológica, permeabilidade e minimização da toxicidade para o hospedeiro; (e) expressão de alvos em quantidades que permitam estudos estruturais; (f) geração de bibliotecas de compostos com as mais diferentes estruturas.

No desenvolvimento de novas drogas, alguns grupos opõem abordagem racional *versus* abordagem empírica (Croft, 1994; Douglas, 1994; Hudson, 1994; Hunter, 1995). Ambas são necessárias mas não suficientes, uma permitindo a definição precisa e expressão de alvos e a outra permitindo a geração dos mais diversos compostos que dão um novo significado à "triagem direcionada" e fornecem esperanças para o futuro da quimioterapia parasitária. O desafio é usar ambas as abordagens para produzir drogas efetivas, baratas, de baixa (ou sem) toxicidade, alta biodisponibilidade, ativas por via oral, em número e variedade suficientes para desenvolver um arsenal que possa combater a resistência a drogas (combinações seqüenciais ou simultâneas) e funcionar também em imunossuprimidos.

7.4 Perspectivas da Pesquisa de Drogas Tripanocidas

A quimioterapia da doença de Chagas é uma área de pesquisa muito intensa (revisto em De Castro, 1993; Croft et al., 1997; Urbina, 1999). As indústrias farmacêuticas têm pouco interesse no desenvolvimento de quimioterápicos contra esta doença, por serem esses programas muito caros, especulativos e longos, não sendo, assim, justificados em uma base puramente comercial (Gutteridge, 1987). Cabe às instituições de pesquisa e aos governos, principalmente de países contidos nas áreas endêmicas, subsidiar este tipo de investigação.

Avanços alcançados na área de bioquímica sinalizam para enzimas glicolíticas presentes em glicosomas, bem como para a tripanotiona redutase envolvida no metabolismo antioxidante (Fairlamb & Cerami, 1992) como alvos promissores no desenvolvimento de novas drogas.

O composto alopurinol (4-hidroxipirazolo (3,4-d) pirimidina), análogo da hipoxantina, apresenta um mecanismo de ação relacionado à competição com adenosina, nucleotídeo essencial para o parasita, e ao bloqueio da síntese de novo de nucleotídeos purínicos (Hammond & Gutteridge, 1984; Marr, 1991). Este composto apresentou resultados promissores em estudos *in vitro* (revisto por Marr & Berens, 1983), levando à realização de ensaios clínicos na fase crônica da doença; os percentuais de negatificação de xenodiagnóstico foram semelhantes aos obtidos com Nif e Bz, porém com menos efeitos colaterais (Sosa & Gallerano, 1988; Gallerano et al., 1990). Estudos recentes do grupo de Apt et al. (1998) demonstraram 44% de cura e 36,5% de normalização em pacientes cardiopatas tratados com alopurinol. Esta droga foi utilizada em dois casos de reativação da doença de Chagas devido a transplante cardíaco, levando à regressão de lesões cutâneas (Tomimori-Yamashita et al., 1997).

Grandes esforços estão sendo empregados na investigação do efeito de inibidores da biossíntese de ergosterol sobre *T. cruzi* (Urbina et al., 1988a,b,c, 1991, 1993, 1996, 1998). Estes compostos são usados no tratamento de doenças causadas por fungos, com o mecanismo de ação baseado na depleção de esteróis endógenos essenciais e/ou no acúmulo de intermediários tóxicos (revisado por Sheehan et al., 1999).

Um dos primeiros compostos deste grupo testado foi o ketoconazol, que se mostrou ativo sobre *T. cruzi* em estudos *in vitro* (McCabe et al., 1984; Urbina et al., 1988a). Foram observadas alterações no metabolismo de esteróis com acúmulo de produtos intermediários, em especial de precursores metilados (Urbina et al., 1988b; Goad et al., 1989). Em ensaios *in vivo* o tratamento na fase aguda levou à cura parasitológica (McCabe et al., 1983, 1987), porém na fase crônica não foi efetivo (McCabe, 1988). A combinação de ketoconazol com outros inibidores da síntese de ergosterol, como por exemplo alilamina SF-86327, lovastatina e terbinafina, mostrou um potente efeito sinérgico sobre a infecção por *T. cruzi* *in vitro* e *in vivo* (Urbina et al., 1988c, 1993; Maldonado et al., 1993). Em infecções experimentais, o ketoconazol não foi capaz de erradicar o parasita em animais infectados ou em pacientes chagásicos (Brener et al., 1993).

Outro composto que atua no metabolismo de esteróis é o triazol itraconazol, que se mostrou ativo em experimentos *in vitro* e *in vivo* (McCabe et al., 1986; Goad et al., 1989). Recentemente, em estudos clínicos com chagásicos crônicos, foi observada cura parasitológica em 53% dos casos com 48,2% de normalização de eletrocardiogramas (Apt et al., 1998).

Estudos com o fluconazol (ICI-195.739) mostraram sua atividade em experimentos com animais (Ryley et al., 1988). Estudos bioquímicos e ultra-estruturais sugeriram um mecanismo duplo na ação deste biazol sobre *T. cruzi*, envolvendo inibição da síntese de ergosterol ao nível da C14- α -desmetilase dependente de citocromo P450 e bloqueio da citocinese (Lazardi et al., 1991; Maldonado et al., 1993; Urbina et al., 1993). Este composto foi também utilizado com sucesso no tratamento de encefalite causada por reativação da doença de Chagas em um caso de paciente com Aids (Solari et al., 1993). Estudo subsequente com o isômero D(+) de fluconazol, D0870, mostrou potente atividade em pesquisas com animais experimentais nas fases aguda e crônica da doença de Chagas, sendo de trinta a cinquenta vezes mais ativo que o ketoconazol e capaz de promover de 60 a 70% de cura parasitológica (Urbina et al., 1996; Liendo et al., 1998). Esta cura foi monitorada por hemocultura, xenodiagnóstico, inoculação de homogenatos de órgãos em camundongos, hemoinoculação em camundongos jovens e PCR.

Um novo derivado triazólico, o SCH 56592 (Schering-Plough), desenvolvido como antifúngico sistêmico, mostrou ser de trinta a cem vezes mais potente *in vitro* do que o ketoconazol e o D0870 como agente antiproliferativo e inibidor da síntese de ergosterol contra *T. cruzi*. Em infecções experimentais, este composto protegeu contra a morte, produzindo de 90 a 100% de cura (Urbina et al., 1998).

A indução da resistência de *T. cruzi* a azóis, como fluconazol, e também da resistência cruzada entre ketoconazol, miconazol e itraconazol, observadas em experimentos *in vitro*, aponta para dificuldades da utilização destes compostos na clínica (Buckner et al., 1998).

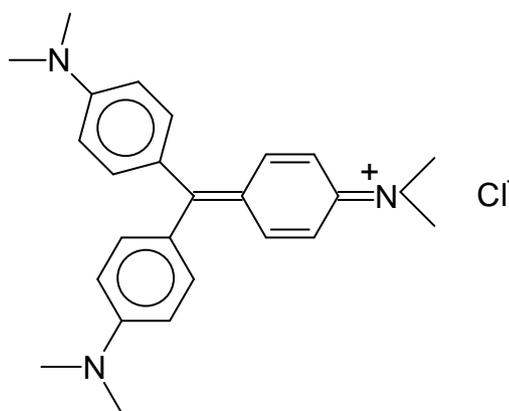
Estudos com alquil-lisofosfolípídeos têm revelado uma nova classe de compostos, promissora para o tratamento de doenças causadas por tripanosomatídeos. Na literatura temos vários relatos recentes sobre o efeito destes compostos sobre *T. cruzi*, *T. brucei* e diferentes espécies de *Leishmania* (Croft et al., 1987, 1993, 1996; Kuhlencord et al., 1992; Bourass et al., 1996; Konstantinov et al., 1997; Le Fichoux et al., 1998; Santa-Rita, 1999; Santa-Rita et al., 2000). Inclusive, a mitelfosina está sendo ensaiada no tratamento de leishmaniose visceral; 21/30 pacientes apresentaram cura, incluindo casos resistentes a antimônio (Sundar et al., 1998). O desenvolvimento destes compostos como agentes anticâncer assegura resultados sobre a farmacologia, a toxicologia e a tolerância dos mesmos em humanos, reduzindo os custos de desenvolvimento de drogas para o tratamento de doenças tropicais e, em especial, da doença de Chagas.

7.5 O Tratamento de Sangue Infectado

A pesquisa de drogas tripanocidas está também dirigida para compostos que possam substituir o cristal violeta como aditivo em sangue a ser transfundido. A importância epidemiológica da transmissão transfusional é importante devido ao processo de urbanização (Dias, 1992).

Devido à variação, entre vários fabricantes, na composição de violeta de genciana, este corante foi substituído por cristal violeta (seu principal componente) com forma quimicamente definida, portanto mais seguro (125 mg/500 ml sangue). Vários grupos de compostos foram ensaiados (fenotizinas, AmB, nafotquinonas, análogos trifenilmetânicos, entre outros) mas não foram capazes de substituir o cristal violeta. Os mais ativos enfrentaram problemas de toxicidade, baixa solubilidade em água e ligação a proteínas plasmáticas. Devido à dificuldade de se encontrar drogas alternativas, foi recomendado pela OMS dar continuidade à utilização de cristal violeta em serviços hemoterápicos em áreas endêmicas.

O cristal violeta não apresenta efeitos colaterais dignos de nota, porém há preocupações sobre possível toxicidade/mutagenicidade e relatos de microaglutinação de hemácias. Sua principal desvantagem é colorir o sangue, e conseqüentemente os tecidos. Seu mecanismo de ação envolve radicais livres, e o alvo principal é a mitocôndria (revisto em Gadelha et al., 1989; Do Campo, 1990).



Cristal violeta: cloreto de *N*-[4-[bis[4-(dimetilamino)-fenilmetileno]2,5-cyclohexadien-1-ildenol]-*N*-methylmetaminio

Referências Bibliográficas

- ANDRADE, S. G. & FIGUEIRA, R. M. Estudo experimental sobre a ação terapêutica da droga Ro 7-1051 na infecção por diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19:335-341, 1977.
- ANDRADE, S. G. & FREITAS, L. A. R. *Trypanosoma cruzi*: Cardiac myocells alterations due to spontaneous or therapeutically induced intracellular parasite desintegration. *Cellular and Molecular Biology*, 33:797-805, 1987.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. & FIGUEIRA, R. M. Estudo experimental sobre a resistência de uma cepa do *Trypanosoma cruzi* ao Bay 2502. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 19:124-129, 1977.
- ANDRADE, S. G.; FIGUEIRA, R. M.; CARVALHO, M. L. & GORINI, D. F. Influência da cepa do *Trypanosoma cruzi* na resposta à terapêutica pelo Bay 2505 (Resultados de tratamento a longo prazo). *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 17:380-389, 1975.

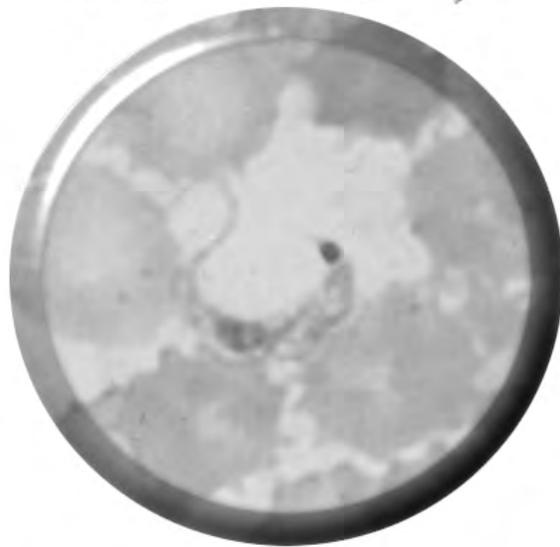
- ANDRADE, S. G.; MAGALHÃES, J. B. & PONTES, A. L. Evaluation of chemotherapy with benznidazole and nifurtimox in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strains of different types. *Bulletin WHO*, 63:721-726, 1985.
- ANDRADE, S. G.; SILVA, R. C.; SANTIAGO, M. G. & FREITAS, L. A. R. Therapeutic action of MK-436 2,5-nitroimidazole on *Trypanosoma cruzi* infections in mice: a parasitological, serological, histopathological and ultrastructural study. *Bulletin WHO*, 65:625-633, 1987.
- APT, W.; AGUILERA, X.; ARRIBADA, A.; PEREZ, C.; MIRANDA, C.; SANCHEZ, G.; ZULANTAY, I.; CORTES, P.; RODRIGUEZ, J. & JURI, D. Treatment of chronic Chagas' disease with itraconazole and allopurinol. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 59:133-138, 1998.
- BERNACCHI, A. S.; DE CASTRO, C. R.; DIAZ DE TORANZO, E. G. & CASTRO, J. A. Effect of nifurtimox and benznidazole administration on rat testes: Ultrastructural and biochemical studies. *Experimental Molecular Pathology*, 45:245-256, 1986.
- BOCK, M.; GONERT, R. & HABERKORN, A. Studies with Bay 2502 on animals. *Boletin Chileno de Parasitologia*, 24:13-19, 1969.
- BOURASS, J.; LOISEAU, P. M. & LETOURNEUX, Y. Antileishmanial activity of rac-1-dodecyl-2-octanamido-2-deoxy-glycerophosphocholine, a new dialkylglycero-phosphocholine, *in vitro*. *Annals Tropical Medicine & Parasitology*, 90:559-561, 1996.
- BOVERIS, A.; SIES, H.; MARTINO, E. E.; DO CAMPO, R., TURRENS, J. F. & STOPPANI, A. O. M. Deficient metabolic utilization of hydrogen peroxide in *Trypanosoma cruzi*. *Biochemical Journal*, 188:643-648, 1980.
- BRENER, Z. A atividade terapêutica da furaltadone, furazolidone e furadantina na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Hospital*, 60:947-951, 1961a.
- BRENER, Z. Atividade terapêutica do 5-nitro-2-furaldeído- semicarbazona nitrofurazona em esquemas de duração prolongada na infecção experimental do camundongo pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 3: 43-49, 1961b.
- BRENER, Z. Chemotherapy of *Trypanosoma cruzi* infections. In: *Advances in Pharmacology and Chemotherapy*, 1975. NY: Academic Press, vol. 13, p. 1-44.
- BRENER, Z. Present status of chemotherapy and chemoprophylaxis of human trypanosomiasis in the Western hemisphere. *Pharmacology Therapeutics*, 7:71-90, 1979.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 4:389-396, 1962.
- BRENER, Z.; CANÇADO, J. R.; GALVÃO, L. M.; DA LUZ, Z. M.; FILARDI, L. S.; PEREIRA, M. E.; SANTOS, L. M. & CANÇADO, C. B. An experimental and clinical assay with ketoconazole in the treatment of Chagas disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88:149-153, 1993.
- BRENER, Z.; COSTA, C. A. G. & CHIARI, C. A. Differences in the susceptibility of *Trypanosoma cruzi* strains to active chemotherapeutic agents. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 18:450-455, 1976.
- BUCKNER, F. S.; WILSON, A. J.; WHITE, T. C. & VAN VOORHIS, W. C. Induction of resistance to azole drugs in *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42:3245-3250, 1998.
- CANÇADO, J. R. Terapêutica específica. In: *Clínica e terapêutica da doença de Chagas*. Uma abordagem prática para o clínico geral. 1997. Rio de Janeiro: Fiocruz, p. 323-351.
- CANÇADO, J. R. & BRENER, Z. Terapêutica. In: *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 1979. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 362-424.
- COURA, J. R. Current prospects of specific treatment of Chagas' disease. *Bolletín Chileno Parasitology*, 51:69-75, 1996.
- CROFT, S. L. A rationale for antiparasite drug discovery. *Parasitology Today*, 10: 385-386, 1994.
- CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; PENDERGAST, W. & CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. *Biochemical Pharmacology*, 36:2633-2636, 1987.
- CROFT, S. L.; NEAL, R. A.; THORNTON, E. A. & HERRMANN, D. B. J. Antileishmanial activity of the ether phospholipid ilmofosine. *Transactions Royal Society of Tropical Meidicine & Hygiene*, 87:217-219, 1993.
- CROFT, S. L.; SNOWDOWN, D. & YARDLEY, V. The activities of four anticancer alkylsophospholipids against *Leishmania donovani*, *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 38:1041-1047, 1996.
- CROFT, S. L.; URBINA, J. A. & BRUN, R. Chemotherapy of human leishmaniasis and trypanosomiasis In: *Trypanosomiasis and Leishmaniasis*. 1997. Cab International, p. 245-257.
- DE CASTRO, S. L. The challenge of Chagas' disease chemotherapy: An update of drugs assayed against *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, 53:83-98, 1993.

- DIAS, J. C. Epidemiology of Chagas' disease. In: *Chagas' disease (Americam Trypanosomiasis): Its impact on transfusion and clinical medicine*. 1992. São Paulo: ISBT, p. 49-80.
- DIAZ DE TORANZO, E. G.; CASTRO, J. A.; FRANKE DE CAZZULO, B. M. & CAZZULO, J. J. Interaction of benznidazole reactive metabolites with nuclear and kinetoplastic DNA, proteins and lipids from *Trypanosoma cruzi*. *Experientia*, 44:880-881, 1988.
- DO CAMPO, R. Sensitivity of parasites to free radical damage by antiparasitic drugs. *Chemical Biological Interactions*, 73:1-27, 1990.
- DO CAMPO, R. & MORENO, S. N. J. Free radical metabolism of antiparasitic agents. *Federal Proceedings*, 45:2471-2476, 1986.
- DO CAMPO, R. & STOPPANI, A. O. M. Generation of superoxide anion and hydrogen peroxide induced by nifurtimox in *Trypanosoma cruzi*. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 197:317-321, 1979.
- DO CAMPO, R.; DE BOISO, J. F.; BOVERIS, A. & STOPPANI, A. O. M. Localization of peroxidase activity in *Trypanosoma cruzi* microbodies. *Experientia*, 32:972-975, 1976.
- DOUGLAS, K. T. Rational drug design in parasitology. *Parasitology Today*, 10:389-392, 1994.
- FAIRLAMB, A. H. & CERAMI, A. Metabolism and functions of trypanothione in the kinetoplastida. *Annual Review Microbiology*, 46:695-729, 1992.
- FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drugs used clinically in Chagas' disease. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 81:755-759, 1987.
- GADELHA, F. R.; MORENO, S. N. J.; DE SOUZA, W.; CRUZ, F. S. & DO CAMPO, R. The mitochondrion of *Trypanosoma cruzi* is a target of crystal violet toxicity. *Molecular Biochemical Parasitology*, 34:117-126, 1989.
- GALLERANO, R. H.; MARR, J. J. & SOSA, R. R. Therapeutic efficacy of allopurinol in patients with chronic Chagas' disease. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 43:159-166, 1990.
- GOAD, L. J.; BERENS, R. L.; MARR, J.; BEACH, D. H. & HOLZ, J. R. G. G. The activity of ketoconazole and other azoles against *Trypanosoma cruzi*: Biochemistry and chemotherapeutic action *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 32:179-190, 1989.
- GOIJMAN, S. G.; FRASCH, A. C. C. & STOPPANI, A. O. M. Damage of *Trypanosoma cruzi* deoxyribonucleic acid by nitroheterocyclic drugs. *Biochemical Pharmacology*, 34:1457-1461, 1985.
- GORLA, N. B. & CASTRO, J. A. Micronucleus formation in bone marrow of mice treated with nifurtimox or benznidazole. *Toxicological Letters*, 25:259-263, 1985.
- GORLA, N. B.; LEDESMA, O. S.; BARBIERI, G. & LARRIPA, I. B. Assesment of cytogenetic damage in chagasic children treated with benznidazole. *Mutation Research*, 206:212-220, 1988.
- GORLA, N. B.; LEDESMA, O. S.; BARBIERI, G. & LARRIPA, I. B. Thirteenfold increase of chromosomal aberrations non-randomly distributed in chagasic children treated with nifurtimox. *Mutation Research*, 224:263-267, 1989.
- GUTTERIDGE, W. E. New anti-protozoal agents. *International Journal of Parasitology*, 17:121-129, 1987.
- HABERKORN, A. & GONNERT, R. Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittel Forschung*, 22:570-1581, 1972.
- HAMMOND, D. J. & GUTTERIDGE, W. E. Purine and pyrimidine metabolism in Trypanosomatidae. *Molecular Biochemical Parasitology*, 13:243-261, 1984.
- HAWKING, F. Chemotherapy of trypanosomiasis. In: *Experimental chemotherapy*, 1973. NY: Acad.Press, Vol. IV, p. 131-256.
- HOFFMANN, B. K. Toxicological investigations on the tolerability of nifurtimox. *Arzneimittel-Forschung*, 22:1590-1603, 1972.
- HUDSON, A. T. The contribution of empiricism to antiparasite drug discovery. *Parasitology Today*, 10:387-389, 1994.
- HUNTER, W. N. Rational drug design: A multidisciplinary approach. *Molecular Medicine Today*, 1:31-34, 1995.
- KONSTANTINOV, S. M.; KAMINSKY, R.; BRUN, R.; BERGER, M. R. & ZILLMANN, U. Efficacy of anticancer alkylphosphocholines in *Trypanosoma brucei* subspecies. *Acta tropica*, 64:145-154, 1997.
- KUHLENCORD, A.; MANIERA, T.; EIBL, H. & UNGER, C. Hexadecylphosphocholine: Oral treatment of visceral leishmaniasis in mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 36:1630-1634, 1992.
- LAZARDI, K.; URBINA, J. A. & DE SOUZA, W. Ultrastructural alterations induced by ICI 195,739, a bis-triazole derivative with strong antiproliferative action against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 35: 736-740, 1991.
- LE FICHOUX, Y.; ROUSSEAU, D.; FERRUA, B.; RUETTE, S.; LELIEVRE, A.; GROUSSON, D. & KUBAR, J. Short- and long-term efficacy of hexadecylphosphocholine against established *Leishmania infantum* infection in BALB/C mice. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42:654-658, 1998.

- LIENDO, A.; LAZARDI, K. & URBINA, J. A. *In vitro* antiproliferative effects and mechanism of action of the bis-triazole D0870 and its S(-) enantiomer against *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 41:197-205, 1998.
- LIMA PEREIRA, F. E.; FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Benzimidazole and nifurtimox do not increase the incidence of spontaneous lymphoma and amyloid deposition in mice treated with *Trypanosoma cruzi*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 81 (Supl.): 156, 1986.
- LORKE, D. Embryotoxicity studies of nifurtimox in rats and mice and study of fertility and general reproductive performance. *Arzneimittel-Forschung*, 22:1603-1607, 1972.
- LUQUETTI, A. O. Etiological treatment for Chagas disease. Technical Report. Fundação Nacional da Saúde. *Parasitology Today*, 13:127-128, 1997.
- MALDONADO, R. A.; MOLINA, J.; PAYARES, G. & URBINA, J. A. Experimental chemotherapy with combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors in murine models of Chagas' disease. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37:1353-1359, 1993.
- MARR, J. J. Purine analogs as chemotherapeutic agents in leishmaniasis and American trypanosomiasis. *Journal Laboratory Clinical Medicine*, 118:111-119, 1991.
- MARR, J. J. & BERENS, R. L. Pyrazolopyrimidine metabolism in the pathogenic Trypanosomatidae. *Molecular Biochemical Parasitology*, 7:339-356, 1983.
- MCCABE, R. E. Failure of ketoconazole to cure chronic murine Chagas' disease. *Journal of Infectious Diseases*, 158:1408-1409, 1988.
- MCCABE, R. E.; ARAÚJO, F. G. & REMINGTON, J. S. Ketoconazole protects against infection with *Trypanosoma cruzi* in a murine model. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 32:960-962, 1983.
- MCCABE, R.; REMINGTON, J. S. & ARAÚJO, F. G. Ketoconazole inhibition of intracellular multiplication of *Trypanosoma cruzi* and protection against a lethal infection with the organism. *Journal of Infectious Diseases*, 150:594-601, 1984.
- MCCABE, R. E.; REMINGTON, J. S. & ARAÚJO, F. G. *In vitro* and *in vivo* effects of itraconazole against *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 35:280-284, 1986.
- MCCABE, R. E.; REMINGTON, J. S. & ARAÚJO, F. G. Ketoconazole promotes parasitological cure of mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 81:613-615, 1987.
- MORELLO, A. The biochemistry of the mode of action of drugs and the detoxication mechanisms in *Trypanosoma cruzi*. *Comparative Biochemistry and Physiology*, 90 C:1-12, 1988.
- NAVARRO, M. L. & NAGEL, R. Sperm-head abnormalities in mice induced by two antichagasic drugs. *Comparative Biology*, 3:29-32, 1984.
- POLAK, A. & RICHLE, R. Mode of action of 2-nitroimidazole derivative benzimidazol. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 72:228-232, 1978.
- RASSI, A. Tratamento etiológico da doença de Chagas. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 38:277-281, 1982.
- RICHLE, R. Chemotherapy of experimental acute Chagas' disease in mice: Beneficial effect of Ro-7.1051 on parasitemia and tissue parasitism. *Le Progres Medical*, 101:282, 1973.
- RIOU, G. F.; GABILLOT, M.; DOUC-RASSY, S. & KAYSER, A. W. DNA topoisomerases of trypanosomes: inhibitory effect of some chemicals. In: *Molecular biology of host-parasite interactions*. 1984. NY: Alan R. Less, p. 279-289.
- RYLEY, J. F.; MCGREGOR, S. & WILSON, R. G. Activity of ICI 195,739 - a novel orally active bistriazole - in rodent models of fungal and protozoal infection. *Annals New York Academy of Science*, 310:328, 1988.
- SANTA-RITA, R. M. Efeito de uma nova classe de compostos sobre *Trypanosoma cruzi*: *Alquil-lisofosfolípeos*. 1999. Tese de mestrado, Rio de Janeiro: Instituto Oswaldo Cruz.
- SANTA-RITA, R. M.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L., & DE CASTRO, S. L. Effect of alkyllysophospholipids on the proliferation and differentiation of *Trypanosoma cruzi*. *Acta tropica*, no prelo, 2000.
- SHEEHAN, D. J.; HITCHCOCK, C. A. & SIBLEY, C. M. Current and emerging azole antifungal agents. *Clinical Microbiological Review*, 12:40-79, 1999.
- SOLARI, A.; SAAVEDRA, H.; SEPULVEDA, C.; ODDÓ, D.; ACUÑA, G.; LABARCA, J.; MUÑOZ, S.; CUNY, G.; BRENGUES, C.; VEAS, F. & BRYAN, R. T. Successful treatment of *Trypanosoma cruzi* encephalitis in a patient with ehmfophilia and AIDS. *Clinical Infectious Diseases*, 16:255-259, 1993.
- SOSA, R. & GALLERANO, R. H. Tratamiento de la enfermedad de Chagas crónica, Efectos del allopurinol. *Revista Federacion Argentina de Cardiologia*, 17:234-236, 1988.
- SUNDAR, S.; ROSENKAIMER, F.; MAKHARIA, M. K.; GOYAL, A. K.; MANDAL, A. K.; VOSS, A.; HILGARD, P. & MURRAY, H. W. Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis. *Lancet*, 352:1821-1823, 1998.

- TAVARES, W. *Manual de quimioterápicos antiinfeciosos*. 1986. Rio de Janeiro: Ateneu, p.187.
- TEIXEIRA, A. R.; CORDOBA, J. C.; SOUTO MAIOR, I. C. & SOLORZANO, E. Chagas' disease: Lymphoma growth in rabbits treated with benznidazole. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 43:146-158, 1990b.
- TEIXEIRA, A. R.; SILVA, R.; CUNHA NETO, E.; SANTANA, J. M. & RIZZO, L. V. Malignant, non-Hodgkin's lymphomas in *Trypanosoma cruzi*-infected rabbits treated with nitroarenes. *Journal of Comparative Pathology*, 103:37-48, 1990a.
- TOMIMORI-YAMASHITA, J.; DEPS, P. D.; ALMEIDA, D. R.; ENOKIHARA, M. M.; DE SEIXAS, M. T. & FREYMULLER, E. Cutaneous manifestation of Chagas' disease after heart transplantation: Successful treatment with allopurinol. *British Journal Dermatology*, 37:626-630, 1997.
- URBINA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease: The how and the why. *Journal Molecular Medicine*, 77:332-338, 1999.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M. & PIRAS, R. Antiproliferative synergism of the allylamine SF 86-327 and ketoconazole on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 32:1237-1242, 1988c.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M. & PIRAS, R. Antiproliferative effects and mechanism of action of ICI 195,739, a novel bis-triazole derivative, on epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 35:730-735, 1991.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; LARRALDE, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M. & PIRAS, R. Synergistic effects of ketoconazole and SF-86327 on the proliferation of epimastigotes and amastigotes of *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*. *Annals New York Academy of Science*, 544:357-358, 1988a.
- URBINA, J. A.; LAZARDI, K.; MARCHAN, E.; VISBAL, G.; AGUIRRE, T.; PIRAS, M. M.; PIRAS, R.; MALDONADO, R. A.; PAYARES, G. & DE SOUZA, W. Mevinolin (lovastatin) potentiates the antiproliferative effects of ketoconazole and terbinafine against *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi*: *in vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 37:580-591, 1993.
- URBINA, J. A.; PAYARES, G.; MOLINA, J.; SANOJA, C.; LIENDO, A.; LAZARDI, M. M.; PIRAS, R. & PIRAS, M. Cure of short- and long-term experimental Chagas disease using D0870. *Science*, 273: 969-971, 1996.
- URBINA, J. A.; PAYARES, G.; CONTRERAS, L. M.; LIENDO, A.; SANOJA, C.; MOLINA, J.; PIRAS, M.; PIRAS, R.; PEREZ, N.; WINCKER, P. & LOEBENBERG, D. Antiproliferative effects and mechanism of action of SCH 56592 against *Trypanosoma cruzi*: *In vitro* and *in vivo* studies. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 42:1771-1777, 1998.
- URBINA, J. A.; VIVAS, J.; RAMOS, H.; LARRALDE, G.; AGUILAR, Z. & AVILA, L. Alteration of lipid order profile and permeability of plasma membranes from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes grown in the presence of ketoconazole. *Molecular Biochemical Parasitology*, 30:185-196, 1988b.
- VIEIRA, C. L.; LAMANO-CARVALHO, T. L.; FAVARETTO, A. L.; VALENCA, M. M.; ANTUNES-RODRIGUES, I. & BARREIRA, A. A. Testes alterations in pubertal benznidazole-treated rats. *Brazilian Journal of Medical Biology*, 22:695-698, 1989.
- VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; ARMENTI, H. & SEGURA, E. Treatment of chronic Chagas' disease with benznidazole: clinical and serologic evolution of patients with long-term follow-up. *American Heart Journal*, 127:151-162, 1994.
- VOIGT, V. H.; BOCK, M. & GONERT, R. Ultrastructural observations on the activity of nifurtimox on the causative organism of Chagas' disease. *Arzneimittel Forschung*, 22:1586-1589, 1972.
- VOIGT, W. H.; HABERKORN, A. & GONERT, R. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungen mastitogotes und amastigoter Formen von *Trypanosoma cruzi* unter dem Einfluss von Lampit. *Zeitschrift Parasitenkunde*, 41:255-267, 1973.

Parte 2



Protocolos e Métodos de Trabalho em Doença de
Chagas Experimental

Capítulo 8



Normas de Segurança para o Trabalho com *Trypanosoma cruzi*

Tania C. Araújo-Jorge & Claude Pirmez

Estas normas de segurança foram extraídas e revisadas a partir do texto preparado pelo Grupo de Trabalho Científico sobre Doença de Chagas, TDR, OMS e do Manual de Biossegurança (CTBio-Fiocruz, 1998). As normas para o trabalho com microorganismos patogênicos e geneticamente modificados foram regulamentadas pela Lei 8974, de 5 de janeiro de 1995. A Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio) foi instituída pelo decreto 1752, em 20 de dezembro de 1995.

O *Trypanosoma cruzi* é um microorganismo listado na *classe de risco 2*, definida pelas seguintes características:

- é capaz de causar doenças em seres humanos ou animais de laboratório sem apresentar risco grave aos trabalhadores, à comunidade ou ao ambiente;
- não é transmissível pelo ar;
- há tratamento e medidas preventivas disponíveis.

Como recomendado, deve-se sempre introduzir as normas de segurança para o trabalho com determinado agente patogênico, com informações sobre a doença e seu agente causal (ver abaixo). Além disso, é essencial:

- distribuir uma *cópia das normas de segurança a todas* as pessoas que trabalhem no laboratório, mesmo aquelas que não trabalham diretamente com *T. cruzi*;
- que *todos* estejam a par dos possíveis perigos e evitem uma aproximação casual;
- que não tenham receio do parasita.

8.1 A Doença de Chagas

O *T. cruzi* é o protozoário causador da doença de Chagas, uma infecção que acomete entre dezesseis e dezoito milhões de pessoas, em áreas que vão desde o sul dos Estados Unidos até a Argentina. O protozoário é transmitido ao homem por (1) formas tripomastigotas metacíclicas contidas nas fezes de insetos conhecidos popularmente como “barbeiros” (devido ao hábito de picar a face descoberta de pessoas adormecidas) ou “chupão” no Brasil, ou “vinchuca” nos demais países latino-americanos; e (2) por transfusão de sangue contendo formas tripomastigotas. Outras formas de transmissão, menos frequentes, são a congênita, o leite materno ou os transplantes. A infecção laboratorial pode ocorrer acidentalmente quando há lesões de pele ou quando o parasita entra em contato com mucosas (olho, nariz ou boca).

Uma vez no hospedeiro vertebrado, o parasita pode causar uma forma aguda da doença, que se manifesta por miocardite. É a melhor oportunidade para se fazer o tratamento específico contra o parasita. Mesmo que a fase aguda passe assintomática, cerca de 30% dos indivíduos infectados podem vir a desenvolver a forma crônica, em geral mais de dez anos após o primeiro contato. Esta forma manifesta-se por miocardite, traduzida por cansaço, arritmias e/ou insuficiência cardíaca, e ainda pelas formas digestivas, caracterizadas pela má digestão, megacólon e/ou megaesôfago. Até o momento não há tratamento eficaz para os efeitos da doença nessa fase.

8.2 Biologia Resumida do *T. cruzi*

O *T. cruzi* apresenta-se sob três estágios diferentes: tripomastigota, epimastigota e amastigota, adaptados às necessidades de seu desenvolvimento nos dois hospedeiros que utiliza em seu ciclo evolutivo, o invertebrado (triatomíneo hematófago) e o vertebrado (mamíferos, incluindo o homem). O triatomíneo se alimenta com sangue infectado do hospedeiro vertebrado, ingerindo as formas tripomastigotas sanguíneas. Algumas horas após sua ingestão, inicia-se a diferenciação destas formas para epimastigotas, que se desenvolvem na luz do intestino do vetor, multiplicando-se por divisão binária. Na parte posterior do intestino do inseto ocorre novo processo de diferenciação para tripomastigotas metacíclicos que, no instante da picada, são transmitidos junto com as fezes. Estas formas penetram em células do local de inoculação, transformando-se em amastigotas, que se multiplicam também por divisão binária no citoplasma da célula hospedeira. As amastigotas se diferenciam para tripomastigotas e a célula hospedeira se rompe, liberando parasitas que atingem a circulação sanguínea, de onde podem ser sugadas pelo inseto triatomíneo e iniciar um novo ciclo. Formas amastigotas liberadas por células rotas antes da completa diferenciação do parasita também são infectantes.

8.3 Normas para o Trabalho com *T. cruzi*: Regras Gerais

O *Nível de Biossegurança 2* (NB2) precisa ser implementado para o trabalho com *T. cruzi* e as *medidas obrigatórias* a serem adotadas são as seguintes:

I. Quanto à área física

1. Identificação do NB e do microorganismo nas portas de todas as salas e áreas de trabalho com *T. cruzi*, que devem ser bem *demarcadas* e adequadamente *sinalizadas* (ver modelos anexos, Capítulo 20);
2. O laboratório deve ser separado de passagens públicas;
3. O laboratório deve funcionar em sala própria, sem superposição com outras atividades;
4. O laboratório deve ter acesso restrito às pessoas autorizadas que manipularão o parasita ou os animais infectados. O acesso de crianças é estritamente proibido; o acesso de mulheres grávidas deve ser avaliado em razão dos riscos a que estiver exposta no laboratório;
5. O laboratório deve ser separado por antecâmara, com portas trancáveis interdependentes;
6. As janelas devem ser vedadas, inquebráveis, e com telas; as portas devem ter sistema de fechamento automático;
7. As paredes, teto e chão devem ser lisos, íntegros, de fácil limpeza, sem juntas e resistentes a desinfetantes. Os ralos devem ser vedados. As portas só devem abrir no sentido da área não contaminada para a contaminada;

8. Devem existir barreiras seguras para evitar a fuga de animais ou insetos infectados;
9. O laboratório deve ter um mínimo de móveis e equipamentos, todos de fácil limpeza;
10. Deve existir área, na antecâmara, para aventais de uso exclusivo no laboratório NB2.

II. Quanto às instalações

1. O laboratório deve estar ligado a sistema de emergência de energia elétrica;
2. Os dutos de fiação elétrica devem estar acessíveis para manutenção;
3. O laboratório deve ter iluminação de emergência;
4. Deve haver pia no laboratório ou perto da saída;
5. Na antecâmara deve haver pia automática ou com pedais;
6. Deve haver lava-olhos no laboratório, que devem ser verificados diariamente, pois é comum o entupimento por ferrugem ou desuso.

III. Quanto aos equipamentos

1. Trabalhar obrigatoriamente em câmara de fluxo laminar tipo II e, preferencialmente, em fluxo tipo III;
2. Agitações, homogeneizações e “sonicagens” devem ser feitas preferencialmente em câmara de fluxo laminar;
3. A retirada de tubos de suporte de centrífuga deve ser feita, preferencialmente, em câmara de fluxo laminar;
4. Modificar os equipamentos e procedimentos para *reduzir os riscos*;
5. Usar caixas de contenção para animais infectados;
6. Usar caixas de segurança para homogeneizadores;
7. Usar tampas para suportes e para tubos de centrífuga;
8. Manter material cirúrgico separado no laboratório;
9. Quando esterilizar vidraria sob calor seco, utilizar forno por 2 horas a 210°C.

IV. Quanto à manipulação

1. É indispensável *treinamento adequado antes do início do trabalho*. Apenas pessoal treinado deve trabalhar com *T. cruzi*, seja *in vivo* ou *in vitro*, ou seja, pessoal bem treinado em procedimentos gerais de laboratório, que conheça tanto as técnicas especiais necessárias para o trabalho com o parasita como a sua biologia. O pessoal que estiver começando a trabalhar com *T. cruzi* deve fazê-lo sob *rigorosa supervisão*. Deve-se evitar o envolvimento de estudantes de iniciação científica nas atividades onde a manipulação com *T. cruzi* ou animais infectados é planejada. Estes estudantes são, em geral, muito jovens e encontram-se em fase ainda indeterminada de sua escolha profissional e vocacional, devendo ser poupados do risco de uma infecção acidental;
2. É obrigatório manter no laboratório *cópia de procedimentos* de trabalho no laboratório, bem como de procedimentos para emergência;
3. É essencial não trabalhar sozinho; o trabalho com material patogênico deve ser feito *sempre em equipe*, para evitar que, na eventualidade de um acidente, o indivíduo se veja sozinho e não possa tomar as providências necessárias à situação;
4. É obrigatório usar *equipamento individual de proteção*; este equipamento deve estar acessível a quem for trabalhar com animais ou com os parasitas:
 - avental longo e de mangas compridas (deve estar disponível na antecâmara);
 - sapatos fechados (nunca sandálias ou sapatos abertos);
 - luvas (se possível, luva dupla) em todos os procedimentos que envolverem contato direto da pele com culturas, sangue, extratos ou animais infectados. Anéis ou outros adereços de mão que interferem com o uso da luva

devem ser retirados. As luvas devem ser removidas com cuidado, para evitar a formação de aerossóis, e descontaminadas antes de ser descartadas;

- máscara facial (não apenas óculos);

5. É obrigatório o *preparo adequado do ambiente e da bancada de trabalho*:

- expor o protocolo a ser seguido *em caso de acidente*;
- expor o protocolo de *descarte de animais* e insetos infectados: autoclavagem, incineração ou tratamento químico (ver modelo anexo, Capítulo 20);
- expor claramente o *protocolo para desinfecção* de material reciclável de vidro ou plástico (ver modelo anexo, Capítulo 20);
- colocar aviso de que se está trabalhando com *T. cruzi*; o local da bancada onde se está trabalhando com o parasita deve também ser claramente marcado com um *aviso* apropriado (ver modelo anexo, Capítulo 20);
- proteger o local de trabalho com papel absorvente;
- ter sempre à mão frascos lavadores com *soluções desinfetantes para T. cruzi*: álcool 70%, hipoclorito de sódio a 5% (ou 1:3, 1 volume de água sanitária para 2 volumes de água) e solução desinfetante padrão (50 ml de extran ou sabão neutro e 30 ml de água sanitária para 1 litro de água corrente); observação: o hipoclorito comercial contém cerca de 10% de substância ativa, e a água sanitária apenas 2 a 3%; normalmente utiliza-se uma solução de hipoclorito a 1% para descontaminação, sendo esta solução preparada no mesmo dia de uso, devido à sua instabilidade;
- ter sobre a bancada recipientes para descarte de:
 - material reciclável (vidraria) e descartável (plásticos);
 - capilares e agulhas contaminados (vidros transparentes e com tampa, com solução desinfetante, para descarte direto no lixo quando ficarem cheios);
 - animais infectados (sacos plásticos e formol a 4%);
- na saída do laboratório deve haver lixo para luvas usadas;
- na saída do laboratório deve estar disponível um livro de ocorrências;

6. Regras gerais de conduta

- considerar todo material biológico infeccioso, e todo material humano como infectado;
- trabalhar com atenção e sem tensão;
- limpar e desinfetar sempre a área de trabalho ao iniciar e ao terminar o trabalho, ou no mínimo diariamente;
- não tocar com as luvas de trabalho no rosto, nos equipamentos ou em maçanetas e interruptores;
- trocar de luvas ao trocar de material. Se for inevitável guardar luvas usadas e molhadas com desinfetantes, fazê-lo com as luvas viradas para dentro; desvirar antes de reutilizar;
- nunca trabalhar sem ter à mão os recipientes apropriados para descarte, com as corretas soluções desinfetantes;
- evitar recapear agulhas de seringa. Se isso for necessário, proceder colocando a capa da agulha sobre a bancada (sem segurá-la) e “pescando-a” com a agulha;
- nunca usar vidraria quebrada ou trincada;
- lavar sempre as mãos após manipulação e após remoção das luvas, do avental ou do jaleco, e antes de sair do laboratório;
- não transitar pelos corredores com material patogênico e não sair da área de trabalho sem antes remover e descartar as luvas de trabalho com *T. cruzi*;
- não aplicar cosméticos e evitar usar jóias, bijuterias e lentes de contato;
- não retirar canetas ou quaisquer instrumentos do laboratório sem descontaminar antes;
- não mastigar lápis ou caneta e não roer as unhas;
- não fumar, beber ou comer no local de trabalho com *T. cruzi* e não estocar comida ou bebida no laboratório;
- manter o laboratório limpo e arrumado, evitando o armazenamento de materiais não pertinentes ao trabalho do laboratório.

V. Quanto ao trabalho com culturas

Embora as culturas axênicas sejam de menor risco, dado à forma predominante não ser infectante (epimastigotas), lembrar que geralmente cerca de 10% dos parasitas são formas tripomastigotas metacíclicas e, portanto, altamente infectantes. Por outro lado, as culturas feitas com células infectadas oferecem o mesmo risco que um animal infectado, uma vez que contêm tanto tripomastigotas quanto amastigotas, ambas infectantes. Por isso:

1. Abrir cuidadosamente os tubos e frascos, evitando sacudi-los;
2. Identificar claramente todos os tubos e frascos;
3. Manipular os tubos, frascos, pipetas ou seringas com as extremidades em direção oposta ao operador;
4. Evitar a formação de aerossóis desprezando sobrenadantes, decantando-os sobre material absorvente embebido em desinfetante dentro de um recipiente (becher, por exemplo); esta prática evita a projeção de gotas;
5. Nunca pipetar suspensões com parasitas com a boca; usar bulbos ou pipetadores automáticos;
6. As pipetas devem conter, na extremidade que entra em contato com o pipetador, um tampão de algodão hidrófobo;
7. Os frascos de cultura, descartáveis ou não, contendo células infectadas pelo *T. cruzi* devem ser preenchidos com formol 4% antes de serem descartados no lixo comum ou lavados para o reuso.

VI. Quanto ao trabalho com animais

O trabalho com animais é o que oferece maior risco, dado que os animais têm comportamento imprevisível e contêm as formas tripomastigotas no sangue, potencialmente infectantes. Assim:

1. Seguir os padrões, as leis e os regulamentos para cuidado e manutenção de animais de experimentação;
2. Assegurar-se de que todos os que têm contato com os animais e seus descartes estejam familiarizados com os procedimentos e cuidados necessários;
3. Verificar se as tampas das gaiolas impedem a fuga dos animais infectados; cuidado com frestas, pois animais de baixo peso podem eventualmente escapar pelas grades da tampa;
4. Todas as gaiolas devem ter uma ficha de identificação que contenha as seguintes informações:
 - animal: espécie, número, cepa, sexo, idade e peso;
 - infecção: data, cepa do parasita, via e dose de inoculação do parasita;
 - pesquisador/técnico responsável;
5. Qualquer animal encontrado fora de gaiolas deve ser sacrificado e o fato deve ser anotado num livro de ocorrências na sala de trabalho. Na eventualidade de um animal inoculado escapar das imediações do laboratório, *as autoridades devem ser prontamente notificadas.*

a. Coleta de sangue

- qualquer sangramento do animal deve ser feito com o animal imobilizado, utilizando-se um frasco de contenção;
- após colheita de sangue de animal infectado, NUNCA RETIRAR o ar da seringa sem colocar um chumaço de algodão encharcado com solução desinfetante na ponta da agulha;
- os materiais utilizados para a sangria devem ser colocados em solução desinfetante após o uso. Quando a sangria é feita na cauda, cauterizar com fósforos ou com pinça aquecida no fogo, ou com instrumento cirúrgico adequado à cauterização;
- quando utilizar sangue para microscopia, usar lamínulas de tamanho inferior à lâmina. Desprezar lâminas em frasco contendo solução desinfetante, observando se a lamínula se desprende da lâmina. Essas mesmas regras devem ser aplicadas às câmaras de contagem. Após o uso, limpar todas as partes do microscópio com solução desinfetante.

b. Inóculo

ATENÇÃO: O acidente de laboratório mais freqüente é a auto-inoculação com seringas e agulhas contaminadas por *T. cruzi*.

- cuidado especial deve ser tomado com as inoculações subcutâneas; a pele do animal pode ser transfixada pela agulha que atinge então a mão do operador;
- a manipulação de agulhas e seringas deve ser feita, sempre, com uma proteção na ponta da agulha (capa da agulha, algodão ou gase embebida em álcool);
- as agulhas nunca são recapeadas; desprezá-las sempre em recipiente próprio, isto é, de plástico firme, com tampa que contenha um orifício que não permita a saída do material para fora do recipiente. Após a manipulação, aspirar solução desinfetante na seringa e manter todo o material utilizado imerso nesta solução por pelo menos 4 horas. Procure utilizar recipientes próprios para o descarte e a inutilização de agulhas infectadas, que nunca devem ser reutilizadas.

VII. Quanto ao descarte e retirada de materiais biológicos

1. Desinfetar a superfície externa das embalagens antes de retirar os frascos do laboratório;
2. Descontaminar (em autoclave ou desinfetante) todo o material usado antes de retirá-lo do laboratório, inclusive antes de embalar material descartável para eliminação;
3. Desinfetar as superfícies de bancadas após o término do trabalho;
4. Desinfetar equipamentos (centrífugas, microscópios, etc.) após o uso;
5. Desinfetar vidrarias e metais reutilizáveis de modo a inativar o *T. cruzi* antes da lavagem;
6. Condições de autoclavagem: 30 min a 120°C (15 psi);
7. Descarte de animais infectados:
 - os animais mortos, infectados, NÃO devem ser descartados no lixo comum;
 - após o sacrifício dos animais, colocá-los em sacos plásticos bem vedados e incinerá-los;
 - quando a incineração não for possível, fazer autoclavagem ou descontaminação química: abrir os animais expondo todas as vísceras e mergulhá-los em solução de formol a 4% por pelo menos 12 horas, selar em saco plástico para, somente então, desprezá-los no lixo comum;
 - após a utilização, as gaiolas que contiverem animais infectados devem ser mergulhadas em solução de hipoclorito de sódio a 1% ou solução desinfetante comercial fenólica, tipo ufenol ou creolina, por cerca de 4 horas antes da limpeza com detergente;
 - a maravalha utilizada deve ser ensacada cuidadosamente para ser autoclavada ou incinerada.

VIII. Quanto ao transporte de *T. cruzi*

O transporte de microorganismos do grupo 2 é regulamentado pela Instrução Normativa nº 4 da CTNbio e é de responsabilidade do pesquisador principal do laboratório:

1. O transporte de *T. cruzi* só pode ocorrer com permissão, emitida pela CTNbio, por pedido da CTbio da instituição, após solicitação do pesquisador principal, em formulário apropriado (ver anexo, Capítulo 20);
2. Para emissão da permissão de transporte, tanto a entidade remetente como a destinatária devem possuir o certificado de qualidade em biossegurança conferido pela CTNbio;
3. O pesquisador remetente informará à CTbio da sua entidade e àquela da entidade de destino, sobre o conteúdo, o volume, o local e as condições de embalagem do material;
4. O pesquisador remetente informará à CTbio de sua entidade e ao transportador sobre os cuidados no transporte e sobre os procedimentos de emergência no caso de escape ou acidente durante o mesmo;

5. O pesquisador remetente deve assegurar que o *T. cruzi* a ser transportado estará contido em embalagens firmemente fechadas ou vedadas para prevenir o escape do mesmo. Serão sempre utilizados dois recipientes, ambos claramente identificados: um interno inquebrável (tubo de ensaio) que conterá o parasita a ser transportado, que deve ser firmemente fechado de forma a evitar o escape do material, e que será colocado dentro de um segundo recipiente. O recipiente externo, inquebrável e resistente a impactos, deve ser cuidadosamente embalado para a remessa em caixa de papelão, madeira ou outro material que ofereça resistência durante o transporte. Caso sejam enviados vários tubos com amostras de *T. cruzi*, com um mesmo ou com diferentes volumes, a embalagem externa deverá conter material absorvente, para absorção de líquido que possa escapar do recipiente interno, e protetores de impacto, dispostos entre os tubos com o parasita;
6. Cada recipiente interno não poderá conter mais do que 1 litro de material, e o volume total da remessa não poderá ser superior a 4 litros;
7. Para transporte de espécime congelado em gelo seco, o recipiente externo contendo, também, gelo seco deverá permitir escape de gás CO₂;
8. Para transporte de espécime congelado em nitrogênio líquido, deverão ser utilizados recipientes ou botijões apropriados para nitrogênio líquido e obedecidas as regras convencionais para seu transporte;
9. Todas as embalagens devem ser claramente identificadas com o símbolo de biossegurança e de “frágil” com a mensagem: “Cuidado: Abertura autorizada apenas no interior de laboratório por técnico especializado”. A embalagem externa deverá conter o nome, endereço completo e telefone, tanto do destinatário quanto do remetente;
10. No caso de transporte para fora do país, a CTbio da entidade remetente será responsável pelo cumprimento das exigências destas normas, inclusive o encaminhando à CTNbio da solicitação de autorização para o transporte;
11. Após a chegada do material o destinatário deverá notificar o remetente sobre o recebimento e sobre as condições do mesmo.

IX. Quanto às medidas de prevenção de acidentes

1. Informar o *peçoal de manutenção* (de equipamentos, de limpeza de salas, brigada de incêndio, etc.) da natureza do trabalho que é ali realizado;
2. O *peçoal de manutenção* (instalações físicas e equipamentos), deverá ser *sempre acompanhado de um pesquisador responsável*, e usar equipamentos individuais de proteção;
3. Informar o *peçoal médico* da instituição sobre a natureza do trabalho que está sendo realizado, de modo que procedimentos para monitoração e tratamento possam ser estabelecidos;
4. *Todo o peçoal* envolvido no trabalho com *T. cruzi* deve ser *monitorado* sorologicamente a cada seis meses por dosagem de igG anti *T. cruzi*, nos serviços de diagnóstico locais;
5. Drogas e doses recomendadas pela FNS/Brasil (*)

Droga	Dose total diária		Doses ao dia	Tempo de tratamento
	Adultos	Crianças		
Benznidazol ®	5 mg/kg	5-10 mg/kg	2 a 3	60 dias
Nifurtimox ® **	8-10 mg/kg	15 mg/kg	3	60 a 90

* Luquetti (1997); ** não disponível no Brasil.

RECOMENDAÇÃO DA OMS: quando comprovadamente ocorrer um acidente, iniciar imediatamente o tratamento específico, mesmo antes de ter evidência parasitológica ou sorológica de infecção

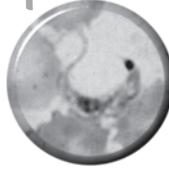
8.4 Procedimento em Caso de Acidente com *Trypanosoma cruzi*

1. É obrigatório conter o material contaminado por *T. cruzi*: Evitar que líquidos se espalhem, cobrindo com material absorvente seco para em seguida colocar o desinfetante e depois descontaminar o material absorvente (autoclave ou desinfetante); evitar que resíduos sólidos contaminados sejam carregados nas solas de sapato ou roupas;
2. Atender o(s) indivíduo(s) exposto(s) aos riscos durante o acidente;
3. Quando aerossóis e/ou gotas forem projetados à distância, limpar o local com papel absorvente embebido em álcool a 70%; na roupa ou na pele saturar a área com álcool a 70%;
4. Limpar a pele imediatamente com álcool ou outro desinfetante;
5. Se o contato for com os olhos ou mucosas, lavar exaustivamente com água corrente em lava-olhos (se não tiver, lavar com salina ou água boricada);
6. As feridas superficiais devem ser lavadas, exaustivamente, e cauterizadas com nitrato de prata;
7. As feridas punctuais (agulha) devem ser espremidas para obter o máximo de sangue possível e cauterizadas;
8. Informar o acidente ao responsável médico apropriado para que sejam tomadas as providências cabíveis (teste sorológico, tratamento, acompanhamento clínico-laboratorial);
9. Colher sangue para teste de parasitemia (pesquisa do parasita em gota espessa e em capilar de microhematócrito, de três em três dias, durante os primeiros quinze dias após o acidente);
10. Colher soro ou plasma para sorologia de fase aguda: IgM anti *T. cruzi* nos dias zero, quinze e trinta após o acidente e, se possível, dosar proteínas de fase aguda;
11. Se houver apenas um risco leve (suspeita) de infecção, monitorar o sangue, por alguns meses mais, com sorologia (IgG anti *T. cruzi*);
12. Se o risco de infecção for grande (certeza), tratar imediatamente com benznidazol (rochagan); não aguardar a evidência de infecção;
13. Informar o acidente à autoridade de saúde pública competente, preenchendo o formulário de notificação de acidentes da instituição; notificar à chefia imediata e à Coordenação de Saúde do Trabalhador.

Referências Bibliográficas

- CTBio-Fiocruz. *Procedimentos para manipulação de microorganismos patogênicos e/ou recombinantes na Fiocruz*. 1998. Ministério da Saúde, p. 166.
- CTNBio. Instrução Normativa nº 4. Diário Oficial da União 20/12/96, p. 27820-27821, 1996.
- CTNBio. Instrução Normativa nº 7. Diário Oficial 9/6/97, p. 11827-11833, 1997.
- LUQUETTI, A. O. Etiological treatment for Chagas disease. *Parasitology Today*, 13:127, 1997.
- MAHLER J. New issues and future legislation on biosafety. *J Biotechnol* 68:179-183, 1999.
- MOREL, C. M. *Genes and Antigens of Parasites. A Laboratory Manual*. 2nd ed., 1984. Rio de Janeiro: Fundação Oswaldo Cruz.
- RANGEL-ALDAO, R. Biosafety protocol. "Biosafety" to assure underdevelopment. *Nat Biotechnology* 17:515-516, 1999.

Capítulo 9



Modelos Animais para o Estudo *In Vivo* da Doença de Chagas e de seus Aspectos Histopatológicos

O uso de modelos animais para o estudo da infecção por *Trypanosoma cruzi* foi estabelecido desde o artigo original no qual Carlos Chagas descreveu a doença que leva seu nome (Chagas, 1909). Antes que a infecção fosse verificada nos humanos ou nos animais domésticos, Chagas enviou para Manguinhos os barbeiros infectados coletados na área endêmica de Minas Gerais onde estava trabalhando e, no Rio de Janeiro, Oswaldo Cruz alimentou esses hematófagos em macacos *Callithrix penicillata*, observando parasitemia patente nos animais vinte a trinta dias depois. Escreveu Carlos Chagas em 1922:

a verificação da doença precedeu aqui a descoberta do parasita que a ocasiona, e quando no sangue periférico de uma criança febril, observamos o flagelado patogênico, de sua biologia já possuíamos noção completa, adquirida em demorados estudos anteriores.

Até as décadas de 30-40, cobaias, cães, coelhos, outros macacos e também o camundongo branco, foram utilizados para o estudo da infecção experimental, tanto pelo próprio Chagas e sua equipe do Instituto Oswaldo Cruz, como por seus discípulos, em especial Emmanuel Dias. Ratos e camundongos foram também utilizados por outros grupos como os de E. Brumpt em São Paulo, A. Robertson e C. A. Kofoid nos EUA, e Henri Galliard na França. A partir da década de 60, provavelmente por influência do intenso uso do camundongo como modelo básico em estudos de imunologia geral, bem como pela facilidade e baixo custo da manutenção desses animais em biotério, os trabalhos com infecção experimental por *T. cruzi* acumularam-se cada vez mais no modelo do camundongo. A revisão comparativa mais recente sobre modelos animais para a doença de Chagas foi publicada por Cabeza-Meckert & Laguens (1994).

Atualmente a maioria das instituições de pesquisa dispõe de Comissões de Ética específicas para analisar os projetos que envolvem o uso de animais, e aprovar seus procedimentos experimentais, indicando sua adequação ou não, pendências e substitutos quando necessário. No Capítulo 20 (Anexos) são encontrados os Princípios Éticos Básicos para Pesquisa e Experimentação com Animais, bem como os contatos com instituições que tem contribuído para o aperfeiçoamento contínuo das normas deles decorrentes.



9.1 Camundongo

Tania C. Araújo-Jorge

9.1.1 Características do *Mus Domesticus Domesticus* (Camundongo) como Modelo para a Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Os parâmetros reprodutivos do camundongo são:

- idade de acasalamento: cinquenta a sessenta dias;
- período de gestação: dezoito a 21 dias;
- filhotes por parto: três a dez;
- idade de desmame: dezoito a 21 dias;
- peso ao nascimento: 1,5 g;
- peso ao desmame: 10 g;
- peso ao acasalamento: 25 g.

Hoje confirmadas e ampliadas por diversos autores, as seguintes características básicas da infecção no camundongo foram descritas por Chagas (1909) e por seu discípulo E. Dias (1934):

- existem diferenças no curso da infecção (cinética, intensidade e mortalidade) a depender da espécie hospedeira utilizada e da origem dos parasitas;
- animais jovens apresentam maior susceptibilidade à infecção experimental que animais adultos;
- qualquer que seja o material infectante utilizado (sangue de animal ou fezes de barbeiro infectado), a intensidade da infecção depende do número de parasitos inoculados;
- tanto formas tripomastigotas metacíclicas como as sangüíneas são infectivas para o camundongo, deflagrando a forma aguda, e nos casos de sobrevivência a essa fase, também a forma crônica, apresenta as características histopatológicas da doença humana, ao menos em sua forma cardíaca;
- durante toda a fase inicial da infecção, seja qual for a via de inoculação utilizada, existe sempre parasitemia, ainda que subpatente, pois com o sangue de animais inoculados por apenas 24 horas pode-se transferir a infecção para outro animal;
- formas metacíclicas do vetor apresentam maior capacidade de penetração nas células do sítio de inoculação e não aparecem rapidamente na circulação, precisando de um período de proliferação tecidual preliminar maior do que tripomastigotas sangüíneos para se evidenciar a parasitemia;
- qualquer via de inoculação deflagra qualitativamente um curso similar de infecção, diferindo somente no tempo necessário para observação de parasitemia patente e para início do período de mortalidade;
- o principal local de multiplicação inicial do *T. cruzi* é ao nível dos tecidos do ponto de inoculação dos parasitas;
- o homem e os animais experimentais que sofreram infecção pelo *T. cruzi* adquirem certo grau de imunidade

contra esse parasita, pois animais infectados reinoculados demonstram grande resistência à infecção. No entanto essa imunidade é relativa, pois em certos casos pode haver “recidivas”.

As características que se seguem foram descritas num vasto número de estudos que utilizaram o camundongo como modelo experimental:

- heterogeneidade do curso da infecção dependente da especificidade da cepa/clone de *T. cruzi* e da linhagem exo ou endocriada do camundongo;
- alta letalidade na fase aguda ante cepas patogênicas, com elevada parasitemia, presença de amastigotas em macrófagos de baço, fígado e tecido adiposo, em cardiomiócitos, músculo esquelético e liso, em neurônios e na neuroglia;
- pan-infectividade tissular na fase aguda com intensidade elevada em alguns órgãos, a depender do par parasita-hospedeiro (Lenzi et al., 1996);
- na fase crônica a pan-infectividade persiste, pois é possível recuperar parasitas de praticamente todos os órgãos (McCabe et al., 1989);
- fase aguda com sinais de imunossupressão transitória, ativação policlonal e apoptose;
- fase crônica com soropositividade (convencional e lítica) e parasitemia subpatente, miocardite e miosite, fibrose, inflamação em camadas do intestino, alterações funcionais do coração e eletrocardiográficas (bloqueios atrio-ventriculares de primeiro e segundo grau, extra-sístoles, distúrbios de condução intraventricular com aumento do complexo QRS) e encontro eventual de megavisceras;
- a miocardite induzida por *T. cruzi* é um processo progressivo, e a intensidade das lesões inflamatórias está provavelmente relacionada à extensão dos danos miocárdicos iniciados durante a fase aguda (Schlemper et al., 1983; Marinho et al., 1999);
- reversão de lesões histopatológicas pelo tratamento com agentes tripanocidas tanto na fase aguda como na fase crônica;
- apesar da pan-infectividade, pode ser observado um marcado histotropismo de certas cepas para certos órgãos (Melo & Brener, 1978). Recentemente esse tropismo tem sido atribuído a características das próprias cepas, pois comparando-se quinze isolados dos três principais clones genotípicos do *T. cruzi* (Diego et al., 1998), foi observado que todos induzem à formação de infiltrados inflamatórios no miocárdio, mas que a formação de pseudocistos (ninhos de amastigotas) varia com a cepa, ocorrendo em 20% dos isolados do genótipo 20, 50% do genótipo 19 e 83% do genótipo 39, caracterizando claramente um potencial replicativo diferente destes genótipos no tecido cardíaco. Outro achado interessante nesse sentido foi a descoberta de que animais infectados simultaneamente por dois isolados de *T. cruzi* (cepa JG e clone Coll.7G2), que podiam ser identificadas por técnicas moleculares específicas (LSSP-PCR), mostraram distribuição tissular claramente diferente entre elas, indicando uma influência do polimorfismo genético das populações de *T. cruzi* infectantes na patogênese da cardiopatia chagásica crônica (Andrade et al., 1999).

9.1.2 Aplicações do Modelo Camundongo

As fases aguda e crônica da doença de Chagas, com suas características parasitológicas, imunológicas e histopatológicas (ver Capítulo 4) já foram reproduzidas no modelo camundongo, em diferentes graus de severidade a depender do par parasita-hospedeiro (cepa de *T. cruzi*-linhagem de camundongo) utilizado (ver a seguir). Também a infecção congênita já foi reproduzida, apresentando características similares à doença de Chagas congênita humana (Cabeza-Meckert & Laguens, 1980; Carlier et al., 1987), com uma incidência de até 4%.

Têm sido muito vastas as aplicações de diferentes cepas de camundongo no estudo da infecção experimental. Em especial destacam-se estudos sobre:

- isolamento de cepas patogênicas, quando se utilizam, geralmente, camundongos bastante susceptíveis;
- o curso da infecção em diferentes situações experimentais: cepas/clones de *T. cruzi*, inóculos, vias de infecção, constituição genética do hospedeiro (cepas de camundongo e diferentes tipos de cruzamentos), idade, temperatura, sexo, etc.;
- quimioterapia;
- a caracterização das respostas inflamatória e imune inata;
- a caracterização da resposta imune global e específica ao parasita e de aspectos auto-ímunes;
- a caracterização da evolução das lesões histopatológicas e funcionais dos diversos órgãos e sistemas afetados no curso da infecção e da doença.

9.1.3 Heterogeneidade no Modelo Camundongo

Uma característica importante do modelo camundongo é a heterogeneidade do curso e intensidade da infecção, bem como das lesões em diferentes populações (raças, cepas), que se expressa na distinção entre modelos resistentes e susceptíveis a condições similares de infecção. Essa característica, já apontada na década de 40 (Hauschka, 1947; Pizzi et al., 1948), foi explorada quanto ao mapeamento genético da resistência durante as décadas de 70 e 80 (Trischmann et al., 1978; Trischmann & Bloom, 1982; Wrightsman et al., 1982, 1984; Trischmann, 1983; Juri et al., 1990; Eksi et al., 1996), e até hoje é utilizada para facilitar estudos sobre as características da resposta imune inata e adquirida (Silva J.S. et al., 1995). Os *padrões de resistência e susceptibilidade à infecção*, medidos através de taxas de mortalidade, tempo de sobrevivência e níveis de parasitemia, *dependem da conjunção das cepas do camundongo e do parasita*, o que implica em que qualquer estudo tenha que ser interpretado à luz do modelo usado (Andrade et al., 1985a).

A linhagem CBA foi caracterizada quanto ao curso da infecção por *T. cruzi* pelo grupo de F. Kierszenbaum (Hayes & Kierszenbaum, 1981; Kierszenbaum & Budzko, 1982), mas não é um modelo de uso mais generalizado. Camundongos C3H e C57BL/6 são classicamente referidos, respectivamente, como resistentes e susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (Trischmann et al., 1978; Starobinas et al., 1991), contudo, eles apresentam respostas inversas às usualmente descritas quando infectados com o clone SylvioX10 (Postan et al., 1983, 1984); os camundongos C57BL/6 são extremamente suscetíveis à infecção pela cepa Tulahuen de *T. cruzi* (Silva et al., 1992). Como disse Tarleton (1995) “não é possível fazer-se qualquer generalização de um achado em modelo experimental sem que seja no contexto estrito do par hospedeiro-parasita usado como modelo”.

No entanto, como a doença humana também varia desde formas assintomáticas e muito brandas até as muito severas e letais, o fato de o camundongo apresentar fenótipos heterogêneos quanto à resistência à infecção o torna um modelo adequado. As diferentes combinações de cepa de camundongo com cepa/clonagem de parasita tendem a se distribuir nesse espectro quando analisados diversos parâmetros, sejam eles parasitológicos, imunológicos, histopatológicos, eletrofisiológicos ou bioquímicos. E para não fugir à regra da heterogeneidade no modelo de camundongo, até o dogma de que todos os camundongos já ensaiados se infectam com *T. cruzi* e contraem a doença foi recentemente contestado, com a descrição de um modelo experimental (Balb/C infectado com clone CL14 de *T. cruzi*) no qual não se conseguiu observar infecção, mas apenas desenvolvimento de imunidade (Lima et al., 1991).

Em função dessa heterogeneidade, desde os primeiros estudos com animais experimentais, e especialmente com camundongos, uma questão emerge: o que torna um animal susceptível ou resistente à infecção?

Essa questão foi explorada tanto sob a ótica do parasita como pela ótica do hospedeiro. Assim, foi estudado o curso da infecção experimental com formas metacíclicas ou sangüíneas, introduzidas por diferentes vias de inoculação; com isolados (cepas) de diferentes regiões geográficas ou provenientes de diferentes hospedeiros (isolados de vetores, de reservatórios naturais, de pacientes com diferentes formas clínicas da doença, etc.); com parasitas submetidos à

atenuação ou aumento da virulência por passagens repetidas em cultura ou em animais, ou ainda pré-incubados com diferentes drogas ou com diferentes componentes do soro ou plasma de hospedeiros imunes ou não imunes; entre outras. Hoje sabemos que isso varia com o modelo animal utilizado, com a cepa de *T. cruzi* inoculada e com o tamanho do inóculo, e que são determinadas em grande extensão pelo balanço funcional de diferentes citocinas produzidas no curso da infecção (ver Capítulo 4).

As vias intraperitoneal (IP) e subcutânea (SC) são as mais amplamente utilizadas para inoculação do *T. cruzi* em camundongos e os animais jovens são mais susceptíveis que os adultos. A via conjuntival, utilizada em outros modelos (Ramirez & Brener, 1987), foi menos explorada com camundongos. A via oral foi demonstrada como eficaz apenas em camundongos de até vinte dias de idade, enquanto a IP promove infecção em qualquer faixa etária (Culbertson & Kessler, 1942). Mais recentemente, foi demonstrado que a infecção via oral ocorre através da mucosa gástrica e não da mucosa de qualquer outra parte superior do tubo digestivo (Hoft et al., 1996). Apenas tripomastigotas metacíclicos são competentes para a infecção via oral; com tripomastigotas sanguíneos a infecção não foi obtida (Hoft, 1996).

Diferenças na resistência entre machos e fêmeas são observadas em alguns modelos e não em outros (Hauschka, 1947; Araújo-Jorge et al., 1992). Até hoje não estão esclarecidos os mecanismos que interferem na resistência dos animais com relação à idade e ao sexo.

A reprodução da fase crônica da infecção por *T. cruzi* em camundongos já foi obtida por quatro estratégias: (1) infecção de linhagens de camundongos susceptíveis com cepas de *T. cruzi* patogênicas numa combinação de inóculo, idade dos animais e via de inoculação que permita a sobrevivência à fase aguda de uma proporção significativa dos animais infectados (Federici et al., 1964; Laguens et al., 1980); (2) infecção de camundongos com uma dose letal de parasitas seguida de tratamento com drogas tripanocidas que assegurem a sobrevivência na fase aguda sem cura parasitológica (Andrade et al., 1970; Marinho et al., 1999); (3) infecção de linhagens de camundongos resistentes ou susceptíveis com cepas de parasitas de baixa patogenicidade, especialmente a cepa CA1 e os clones CL-Brener e Dm28c, com inóculos subletais (González-Cappa et al., 1981; Araújo & Chiari, 1989; Lopes et al., 1995); (4) infecção com cepas patogênicas em animais imunizados com cepas atenuadas (Johnson et al., 1963; Hudson, 1984; McCormick & Rowland, 1989; Milei et al., 1991; Gomez et al., 1996).

9.1.4 Modelos mais Amplamente Utilizados

Um dos maiores problemas para o entendimento e sistematização dos dados existentes sobre a imunobiologia e imunopatologia na doença de Chagas experimental é o fato de não haver um modelo comum, de eleição, usado pela maioria dos grupos que trabalham na área. Certos grupos se concentram num único modelo e caracterizam-no sob vários parâmetros. Isso é útil do ponto de vista da biologia geral da infecção, delineando um quadro mais completo da resposta do hospedeiro ao parasita, mas deixa a desejar quanto à possibilidade de extrapolação dos dados para outros modelos e mesmo para humanos. Outros laboratórios buscam analisar um mesmo fenômeno em diferentes modelos para firmar conceitos que possam ser generalizados com relação à infecção.

9.1.4.1 Camundongos exocriados Swiss, não isogênicos

Desde os primeiros experimentos com o camundongo branco, até hoje, o camundongo albino Swiss, não isogênico, tem sido um modelo amplamente utilizado. Os animais são extremamente sensíveis às diversas cepas do parasita (Andrade et al., 1985a) e não apresentam diferença na resistência quanto ao sexo (Luz et al., 1995). No entanto, isolados de *T. cruzi* provenientes de animais silvestres podem apresentar parasitemia baixa e 100% de sobrevivência (ver Capítulo 3). Pelo seu baixo custo, os camundongos Swiss são muito utilizados em estudos de quimioterapia experimental (ver Capítulo 7), que implicam no estudo de grande número de animais e avaliação de sobrevivência (Gutteridge et al., 1978). A reversibilidade de lesões musculares em animais crônicos após

quimioterapia tripanocida foi demonstrada nesse modelo (Andrade et al., 1991; Segura et al., 1994). Os primeiros estudos eletrocardiográficos em camundongos infectados também foram feitos nesse modelo (Packchianian & Robinson, 1958) e mostraram claramente que existem diferenças significativas nos traçados de animais crônicos em relação aos normais. Alterações eletrocardiográficas e correlação destas com lesões histopatológicas no sistema de condução também foram descritas em camundongos Swiss (Andrade & Sadigursky, 1987). A descrição das cepas Y e CL como polares em relação a curvas parasitêmicas e ao tropismo tissular foi feita nesse modelo (Melo & Brener, 1978), assim como a caracterização biológica do clone Dm28c (Contreras et al., 1988). A influência da cepa de parasita na resistência do hospedeiro também foi confirmada no modelo Swiss (Andrade et al., 1985b). Algumas podem ser extremamente virulentas, como a cepa Y (Silva & Nussensweig, 1953), enquanto outras não, como a Tulahuen (Cardoni et al., 1986). Com inóculos baixos de cepas pouco virulentas foram obtidas cronicidade (Laguens et al., 1980) e reprodução da miocardiopatia chagásica humana crônica, com fibrose, poucos parasitas intracelulares, alterações eletrocardiográficas, sorologia positiva, parasitemia subpatente evidenciada por xenodiagnóstico ou inoculação em camundongos recém-natos, e associação eventual com megavísceras (Laguens et al., 1981; Milei et al., 1984; Molina et al., 1988). Um estudo com setenta animais crônicos demonstrou que mesmo em animais com testes parasitológicos persistentemente negativos, a infecção ativa pode ser evidenciada quando se submetem os animais à imunossupressão com ciclofosfamida (Magalhães & Andrade, 1994).

9.1.4.2 Camundongos endocriados, isogênicos

O uso de camundongos isogênicos com diferenças no complexo maior de histocompatibilidade (*locus* H-2) e *back-grounds* genéticos foi revisto por De Titto (1994). Estudos clássicos mostraram, no entanto, que diferente de certos microorganismos como *Mycobacterium leprae*, *Listeria monocitogenes* ou *Leishmania donovani*, cuja resistência é governada por um gene ou grupo de genes relacionados, a resistência a *T. cruzi* é regulada por controle multigênico (Trischmann & Bloom, 1982; Wrightsman et al., 1982, 1984). Não existem linhagens polares, resistentes ou susceptíveis, mas um gradiente contínuo entre esses dois fenótipos. Além disso, como a resistência está mais ligada às características da cepa de *T. cruzi* infectante (Andrade et al., 1985b), um hospedeiro pode ser resistente e controlar a infecção com algumas cepas, mas não com todas.

9.4.1.3 Camundongo Balb/C

De longe os camundongos Balb/C se configuram na linhagem mais utilizada em estudos experimentais (282 referências na base de dados *MedLine* com as palavras-chave Balb e Chagas disease, em julho de 1999). Descrito como um dos modelos mais susceptíveis, e portanto bom para a triagem inicial de drogas e de agentes imunomoduladores que aumentam a resistência, essa cepa é muito utilizada por vários grupos. O modelo Balb/C-cepas Y ou CL foi muito estudado por grupos no Brasil e na França (Rossi et al., 1984, 1986; Silva et al., 1985; Minoprio et al., 1986, 1988; D'Império-Lima et al., 1986; Russo et al., 1989). Como controle para o modelo Xid (ver Capítulo 4), a imunologia do camundongo Balb/C infectado por *T. cruzi* tem sido amplamente investigada (Minoprio et al., 1991, 1993). O modelo Balb/C-cepa Colombiana é o preferido e é largamente caracterizado pelo grupo de Ribeiro dos Santos & Pirmez, no Brasil (Ribeiro-dos-Santos et al., 1992; Silva-Barbosa et al., 1997). O modelo Balb/C-cepa Tulahuen tem sido intensamente utilizado e caracterizado pelo grupo argentino de Cardoni & De Titto (Cardoni et al., 1986; Rottenberg et al., 1991; Antunes et al., 1997). O modelo Balb/C-cepa Tehuantepec foi o escolhido e amplamente caracterizado por Carlier et al. (1987). Os modelos Balb/C-clone Dm28c (Lopes et al., 1995) e Balb/C-cepa CL e clone CL14 (Lima et al., 1991) vêm sendo utilizados e caracterizados no Brasil.

9.4.1.4 Camundongo C3H

O conjunto de trabalhos realizados por Pizzi et al. (1948, 1953) nas décadas de 40 e 50 introduziram o uso da linhagem C3H nos estudos de infecção experimental com *T. cruzi*, em conjunção com a cepa Tulahuen, que é reticulotrópica e bastante virulenta. Os camundongos C3H são hoje a segunda linhagem mais utilizada (197

referências encontradas na base de dados *MedLine* com as palavras-chave C3H e Chagas disease, em julho de 1999). O modelo C3H-cepa Colombiana (10^4 IP) crônica, e mostrou-se interessante quanto à reprodução de características fisiopatológicas e hemodinâmicas observadas em humanos chagásicos crônicos (Federici et al., 1964; Abelman, 1969). Muitos outros grupos têm usado a cepa C3H para estudos da resposta inflamatória e imune, ante diferentes cepas e clones de parasitas (Postan et al., 1983; Minoprio et al., 1989; Russo et al., 1989; Pakianathan & Kuhn, 1994). O modelo C3H-cepa Tulahuen foi caracterizado por Morales et al. (1987), com relação à miocardiopatia, comparativamente a outras linhagens de camundongo. Recentemente os camundongos C3H vêm sendo utilizados para estudos da infecção e patologia do sistema nervoso central no Instituto Oswaldo Cruz (Silva, A. A. et al., 1995).

9.4.1.5 Camundongos C57BL (6 e 10)

Descrita como uma das cepas de camundongos mais resistentes (Pizzi et al., 1948), as linhagens C57BL/6 e C57BL/10 vêm sendo utilizadas ante diferentes cepas e clones do *T. cruzi*, por muitos grupos (Reed et al., 1984; Silva J.S. et al., 1995; Tarleton, 1995). Exatamente por isso é um modelo em que a cronificação pode ser obtida com certa facilidade, especialmente quando se utilizam inóculos baixos (Postan et al., 1984, 1987a). Muitas vezes são usados comparativamente com camundongos C3H ou Balb/C. Em todos os casos, no entanto, há que se referir sempre à cepa do parasita utilizada, pois algumas são extremamente virulentas, inclusive para esse hospedeiro (Luz et al., 1994).

9.4.1.6 Camundongos geneticamente transformados: mutantes e *knock-outs*

O interesse no uso de animais geneticamente deficientes em certa função ou molécula para estudo da implicação direta ou indireta desta na resistência à infecção já é antiga. Os primeiros animais usados para essa finalidade foram os camundongos “Biozzi” selecionados quanto à capacidade de produção de anticorpos (alta ou baixa) por cruzamentos e retrocruzamentos (Kierszenbaum & Howard, 1976). Posteriormente animais B10.D2/old, geneticamente deficientes no componente C5 do sistema complemento, foram usados para demonstrar que a lise mediada por complemento não é decisiva na sobrevivência nem na parasitemia dos animais na fase aguda (Dalmaso & Jarvinen, 1980). Os animais “nude”, que não possuem timo, também foram usados como instrumentos para a compreensão do papel de células T na infecção (Gonçalves da Costa et al., 1984; Trischmann, 1984), bem como os animais Xid, que não possuem células BCD5 (Minoprio et al., 1991, 1993). Linhagens com fenótipos auto-imunes (tais como linhagens com o gene *lpr*, linhagens NZB e BXSB) também tendem a ser mais susceptíveis à infecção por *T. cruzi* (Nickell et al., 1985). Mais recentemente uma série de animais, geneticamente deficientes em certas moléculas, têm sido utilizados para estudos experimentais com diversos agentes infecciosos, tais como animais *knock-out*, para os genes de moléculas de histocompatibilidade classe I, sem células T CD8 maduras (Tarleton et al., 1992), de classe II, sem células T CD4 maduras (Rottenberg et al., 1993), para os genes RAG e de IL-10 (Abrahamsohn & Coffman, 1996; Hunter et al., 1997), para a cadeia δ do TCR (Santos-Lima & Minoprio, 1996), entre outros. Do mesmo modo, animais deficientes em receptor de IFN- γ , bem como em óxido nítrico sintetase (Holscher et al., 1998) mostraram um fenótipo extremamente susceptível à infecção por *T. cruzi* e permitiram evidenciar o papel crucial que estes mecanismos exercem na resistência dos animais, como discutido no Capítulo 4. Recentemente foi estudado o curso da infecção por *T. cruzi* em animais deficientes em vias de citotoxicidade, como a via Fas (animais *gld*) e a via perforina (Henriques-Pons et al., 1998; Lopes et al., 1999). No primeiro caso os animais apresentaram maior susceptibilidade, associada ao desenvolvimento precoce de uma potente resposta Th2, e no segundo maior mortalidade, associada a um descontrole do grau de inflamação tissular. A perspectiva para os próximos anos é que mais modelos com deficiências gênicas naturais ou induzidas por recombinação homóloga (*knock-outs*) venham a ser aplicados para o estudo da imunopatologia da infecção por *T. cruzi*.



9.2 Rato

Luis Eduardo Ramírez, Valdo D. Silva, Eliane Lages-Silva & Edmundo Chapadeiro

O rato é outro modelo animal utilizado no estudo da infecção chagásica. Contudo, tem-se observado que ele oferece certa resistência ao *Trypanosoma cruzi*, desenvolvendo uma infecção lenta e pouco evidente, mesmo em animais recentemente desmamados. Na maioria das vezes, torna-se necessária a utilização de grandes inóculos do parasita, para se obter parasitemia patente na fase aguda e uma fase crônica com manifestações clínico-patológicas evidentes. Porém alguns estudos histopatológicos do coração, do trato digestivo e do sistema nervoso central identificaram lesões similares às encontradas na doença de Chagas humana, contradizendo, portanto, aqueles que não consideram o rato como um bom modelo experimental para a pesquisa da infecção chagásica. Além disso, um estudo com ratos isogênicos mostrou que, dependendo do *background* genético, esse modelo também pode apresentar variabilidade no grau de resistência (Rivera-Vanderpas et al., 1983).

Brand et al. (1949) observaram que a infecção nos animais inoculados com diferentes cepas tem evolução de aproximadamente três semanas e que, dependendo da sua patogenicidade, os animais podem cronificar ou morrer. Pizzi et al. (1953) estudaram, comparativamente, a infecção em camundongos isogênicos C3H e ratos infectados com cepa Tulahuen do *T. cruzi* e observaram uma menor parasitemia e mortalidade em ratos. Brener (1971) inoculou ratos com 200.000 formas sanguíneas das cepas Y, Berenice, CL e MR e observou, com as duas primeiras, apenas uma pequena e transitória parasitemia, ao passo que com as outras duas a parasitemia foi elevada e persistente, sugerindo que essas diferenças poderiam estar relacionadas com a morfologia das referidas cepas. Revelli et al. (1980) infectaram ratos de poucos dias de idade e adultos jovens com elevadas doses de tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*, pela via subcutânea, e observaram uma fase aguda onde a parasitemia dos animais recentemente desmamados era maior que a dos animais adultos jovens, não se registrando nenhuma morte. Além disso, observaram uma resposta imunológica humoral específica e uma miocardite crônica focal com alterações leves do eletrocardiograma. Beraldo (1987) caracterizou a curva de parasitemia em ratos infectados com diferentes inóculos de formas sanguíneas por grama de peso corporal e observou que, independentemente da cepa ou do grau do inóculo, havia uma elevação progressiva da parasitemia até a segunda ou terceira semanas após a infecção. A partir de então, a parasitemia declinava, tornando-se desprezível ou desaparecendo por completo na quarta semana. O nível máximo de parasitemia observado não pareceu guardar qualquer correlação com o grau de inóculo administrado. Com base nas curvas de parasitemia e mortalidade espontânea, definiu a fase aguda da infecção como aquela que se inicia após a inoculação do *T. cruzi* até a sexta semana subsequente. Segundo esse autor, depois desta fase começa a fase crônica, onde a parasitemia é inaparente e a mortalidade espontânea é baixa. Postan et al. (1987b) infectaram ratos com quatro clones diferentes de *T. cruzi* e verificaram padrões distintos de parasitemia, mortalidade e comportamento histopatológico. Um dos clones desenvolveu fibrose cardíaca mais acentuada e precoce que os demais, levando-os a discutir a influência genética do parasita e do hospedeiro no curso da infecção. De outro lado, Revelli et al. (1990) demonstraram que, quando os ratos eram reinoculados com parasitas da mesma cepa, não reproduziam o quadro agudo inicial e não modificavam o tipo e grau de lesão cardíaca. Esse modelo tem sido utilizado para estudo da rede de citocinas (Revelli et al., 1998),

confirmando que também no rato a citocina decisiva para a resistência é o IFN- γ .

Estudando as manifestações viscerais na fase crônica em ratos inoculados com a cepa Y, Alcântara (1964) observou que a cardiopatia era a forma mais freqüente, embora também tenha encontrado a formação de megas, principalmente no cólon, bexiga, vesícula seminal e útero. Alcântara & Oliveira (1964) demonstraram, durante a fase crônica da infecção, redução dos neurônios do plexo de Meissner, principalmente da região secretora do estômago e nos cólons transversos e descendentes, assim como também no plexo de Auerbach, desde o estômago até o reto. Scorza & Scorza (1972) estudaram o miocárdio de ratos infectados com a cepa Y e verificaram que grande número de animais morria entre o décimo e o 25º dias pós-inoculação, apresentando miocardite, ganglionite e periganglionite intensas. Chapadeiro et al. (1988) estudaram a evolução da cardiopatia em ratos infectados com diferentes inóculos das cepas Y, Colombiana e 12SF de *T. cruzi* ao longo das fases aguda e crônica, observando que a miocardite progredia com o tempo, associando-se à fibrose em 15% dos animais.

Alcântara (1961) encontrou um reduzido número de neurônios pós-ganglionares cardíacos em ratos infectados pela cepa Y do *T. cruzi*, à semelhança do observado por Amorim et al. (1973) em pacientes chagásicos crônicos. Entretanto, esses resultados não foram confirmados por Chapadeiro et al. (1991) em animais cronicamente infectados, nos quais a contagem de neurônios cardíacos em cortes seriados não apresentou redução numérica significativa, comparada aos animais controles. Embora as lesões encontradas não tenham sido quantitativamente significativas, ganglionite e neurite foram mais intensas nos gânglios intracardíacos dos animais infectados, o que pode explicar a alteração da resposta bradicárdica barorreflexa observada nestes mesmos animais, caracterizando, portanto, uma disfunção autonômica parassimpática cardíaca no rato chagásico crônico (Chapadeiro et al., 1991; Junqueira Jr. et al., 1992).

Bestetti et al. (1987) avaliaram o eletrocardiograma de ratos de seis meses de idade infectados com a cepa Colombiana do *T. cruzi* e observaram alterações similares às encontradas em pacientes chagásicos crônicos. Junqueira Jr. (1991), num estudo seqüenciado do eletrocardiograma em ratos infectados com as cepas Y, Colombiana e 12SF pareados com animais controles, não encontrou alterações durante oito meses de infecção, porém verificou que certas arritmias (extra-sístoles supraventriculares e ventriculares) eram mais freqüentes nos infectados que nos controles, concluindo que este modelo parece ser adequado para o estudo da disfunção cardíaca.

Em estudo empregando a monitorização *holter* do eletrocardiograma em ratos chagásicos crônicos acordados, observamos (dados não publicados) uma alta prevalência de arritmias cardíacas, caracterizadas principalmente por extra-sístoles supraventriculares com ou sem condução aberrante e com freqüência média significativamente maior nos animais chagásicos. Estes dados, aliados aos resultados obtidos nos estudos eletrocardiográficos convencionais, permitem concluir que o rato parece ser um modelo adequado para o conhecimento da patogênese e da terapêutica da disfunção elétrica cardíaca induzida pela infecção pelo *T. cruzi*. Entretanto, as possíveis causas destas alterações eletrocardiográficas e das arritmias na infecção chagásica crônica neste modelo permanecem obscuras e, provavelmente, estão associadas à miocardite focal, à fibrose miocárdica (Chapadeiro et al., 1988) e/ou à disfunção autonômica parassimpática (Chapadeiro et al., 1991; Junqueira Jr. et al., 1992). As Figuras 1 a 8 mostram aspectos da histopatologia de ratos infectados com *T. cruzi*.

A falta de estudos imunológicos adequados e a ausência de pesquisas que demonstrem uma progressiva redução da função contrátil miocárdica que leve ao desenvolvimento de uma síndrome de insuficiência cardíaca congestiva, como acontece na doença de Chagas humana, parecem explicar porque o rato não é considerado, ainda, um modelo útil no estudo da infecção chagásica experimental.

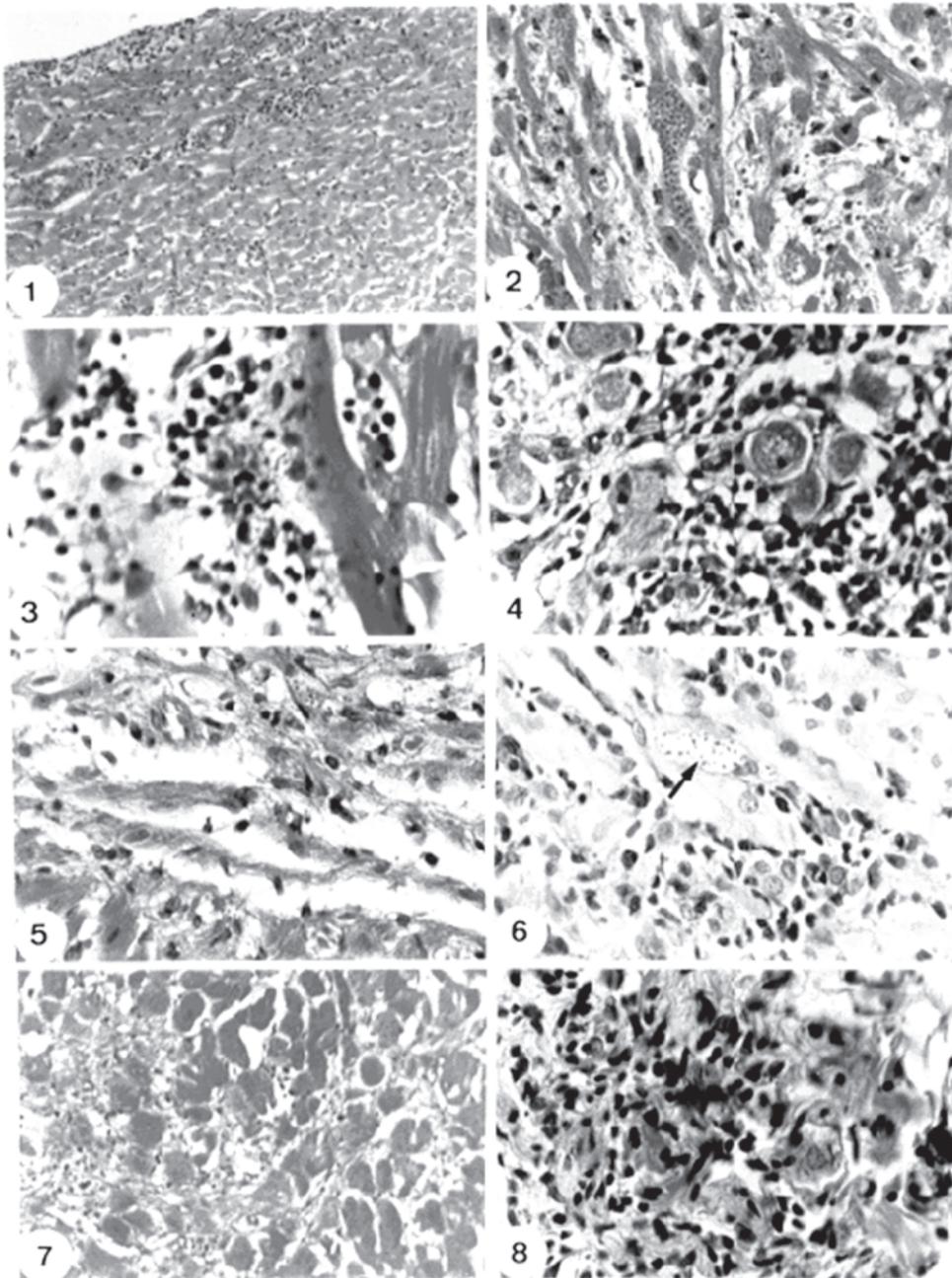


Figura 1 – Inflamação aguda intensa do epicárdio e miocárdio em rato infectado com cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi* (visão panorâmica) - HE x 100

Figura 2 – Detalhe da figura anterior mostrando infiltrado inflamatório predominantemente mononuclear, no endomísio; fenômenos degenerativos de necrose de grandes números de fibras miocárdicas. Ninhos de amastigotas no interior das fibras - HE x 200

Figura 3 – Outro detalhe da mesma figura mostrando formas amastigotas no endomísio, circundadas por mononucleares; intenso edema do interstício e fenômenos degenerativos com ruptura de fibras miocárdicas - HE x 400

Figura 4 – Ganglionite atrial aguda em rato infectado com cepa São Felipe. Observa-se infiltrado inflamatório mononuclear com intensos fenômenos degenerativos e destrutivos de vários neurônios - HE x 400

Figura 5 – Mesmo caso da figura anterior. Observa-se ninho de amastigota e infiltrado inflamatório mononuclear no tecido de condução (feixe átrio-ventricular) situado nos 2/3 superiores à direita da fotomicrografia - HE x 200

Figura 6 – Miocardite crônica focal em rato infectado com a cepa Colombiana. Nota-se pequeno foco de infiltrado inflamatório mononuclear ao lado de ninho de amastigotas (seta) - HE x 400

Figura 7 – Miocardite crônica em rato infectado com a cepa Y. Observa-se intensa fibrose difusa endomisial com discreto infiltrado mononuclear; hipertrofia acentuada da maioria das fibro-células; atrofia, degeneração e necrose de outras. HE x 200

Figura 8 – Ganglionite atrial crônica em rato infectado com a cepa Colombiana. Observa-se intenso infiltrado inflamatório e destruição da maioria dos neurônios - HE x 200



9.3

Calomys Callosus

Sonia G. Andrade

O *Calomys callosus callosus* (Rodentia, Cricetidae) é um reservatório natural do *Trypanosoma cruzi* (Ribeiro, 1973; Mello e Teixeira, 1977). A biologia do *C. callosus* e a sua manutenção em laboratório foram descritos por Mello (1984) e têm fornecido importantes subsídios para estudos posteriores. Além disso, diversos trabalhos foram desenvolvidos utilizando este animal como modelo da doença de Chagas experimental (Mello et al., 1979; Mello & Borges, 1981; Borges et al., 1982).

Este modelo oferece muito interesse, pois sendo um reservatório silvestre poderá estar albergando cepas do *T. cruzi* sem desenvolver doença aparente e, deste modo, contribuindo para a manutenção das fontes de contaminação dos vetores nos seus ecótopos silvestres. Por outro lado é de interesse verificar como se comporta este animal quando infectado por cepas do *T. cruzi* mantidas em laboratório, comparando com o comportamento biológico no camundongo. Com este objetivo, foi feito o estudo da infecção do *C. callosus* com diferentes cepas do *T. cruzi* em comparação com o camundongo, não só quanto ao desenvolvimento de lesões histopatológicas, como em relação à ativação dos macrófagos peritoneais destes animais ante a infecção (Borges et al., 1992). As cepas do *T. cruzi* utilizadas neste estudo foram as Y, F, M226 (isolada de *C. callosus* naturalmente infectado) e Costalimai (isolada de *Triatoma costalimai*).

Os principais resultados obtidos foram (Borges et al., 1992, 1995):

- o *C. callosus* mostrou níveis parasitemicos superponíveis aos do camundongo, com as cepas Y e F; porém, enquanto os camundongos tiveram alta mortalidade, todos os *C. callosus* sobreviveram à infecção, mostrando regressão das lesões histopatológicas entre quarenta e sessenta dias;
- com as duas cepas do *T. cruzi* de origem silvestre (M226 e Costalimai) os camundongos não desenvolveram parasitemias patentes, porém apresentaram intensas lesões tissulares enquanto os *C. callosus* desenvolveram baixas parasitemias e ausência de lesões, indicando uma adaptação e maior resistência às cepas silvestres;
- a ativação de macrófagos peritoneais foi idêntica em camundongos e *C. callosus* infectados com a cepa Y. Na infecção com a cepa F a liberação de H_2O_2 foi idêntica nas duas espécies porém variou no *timing*, pois continuava elevada em camundongos após os sessenta dias quando as lesões estavam presentes e era muito baixa nos *C. callosus* entre quarenta e sessenta dias, correspondendo à regressão das lesões, observada nesta espécie;
- as maiores diferenças na liberação de H_2O_2 de macrófagos peritoneais foram vistas com as duas cepas silvestres (Costalimai e M226). A cepa Costalimai determinou no camundongo altos níveis de ativação dos macrófagos, que corresponderam à intensa agressão tissular determinada por esta cepa, enquanto o *C. callosus* apresentou apenas discreta ativação de macrófagos e ausência de lesões. Os mesmos achados foram obtidos com a cepa M226;
- o estudo dos níveis de γ -interferon (IFN- γ) no *C. callosus* demonstrou que as diferentes cepas induzem a produção desta interleucina, sendo os níveis mais altos observado no soro dos animais infectados com a cepa F, a qual se caracteriza por determinar no *C. callosus* lesões de grande intensidade no miocárdio e no músculo esquelético na fase aguda da infecção com regressão total aos sessenta dias;

- o *C. callosus* infectado pela cepa F se constitui, desta maneira, em um excelente modelo para o estudo da resistência nesta espécie e a sua correlação com os aspectos peculiares da sua patologia.

De fato, embora considerado “resistente” devido à ausência de mortalidade e negatização parasitêmica, o *C. callosus* desenvolve intensas lesões inflamatórias no músculo esquelético e no miocárdio, com predominância de macrófagos (que assumem aspecto epitelióide), linfócitos e fibroblastos (Figuras 9 e 10). Simultaneamente se desenvolve intenso processo fibrogênico, que se inicia precocemente (26 a 30 dias), com acentuada proliferação fibroblástica e espessamento da matriz intercelular com depósito de colágeno (Figura 11). Dos cinquenta aos sessenta dias de infecção observa-se regressão da inflamação e da fibrose, restando apenas infiltrados focais residuais (Figura 12). Desenvolve-se nestes animais um equilíbrio parasito/hospedeiro, uma vez que, embora o exame direto revele parasitemias negativas, os testes parasitológicos mais acurados (xenodiagnóstico, hemocultura e subinoculação do sangue em camundongos) permitem revelar a persistência da infecção (Andrade et al., 1994). As peculiaridades apresentadas por este modelo o recomendam para pesquisas sobre o controle imunológico da infecção, o processo de fibrogênese e de regressão espontânea da fibrose. Além disso é um animal de pequeno porte e de fácil manuseio. A dificuldade está apenas na obtenção e manutenção de colônias destes animais para a sua fácil utilização, como ocorre com o camundongo.

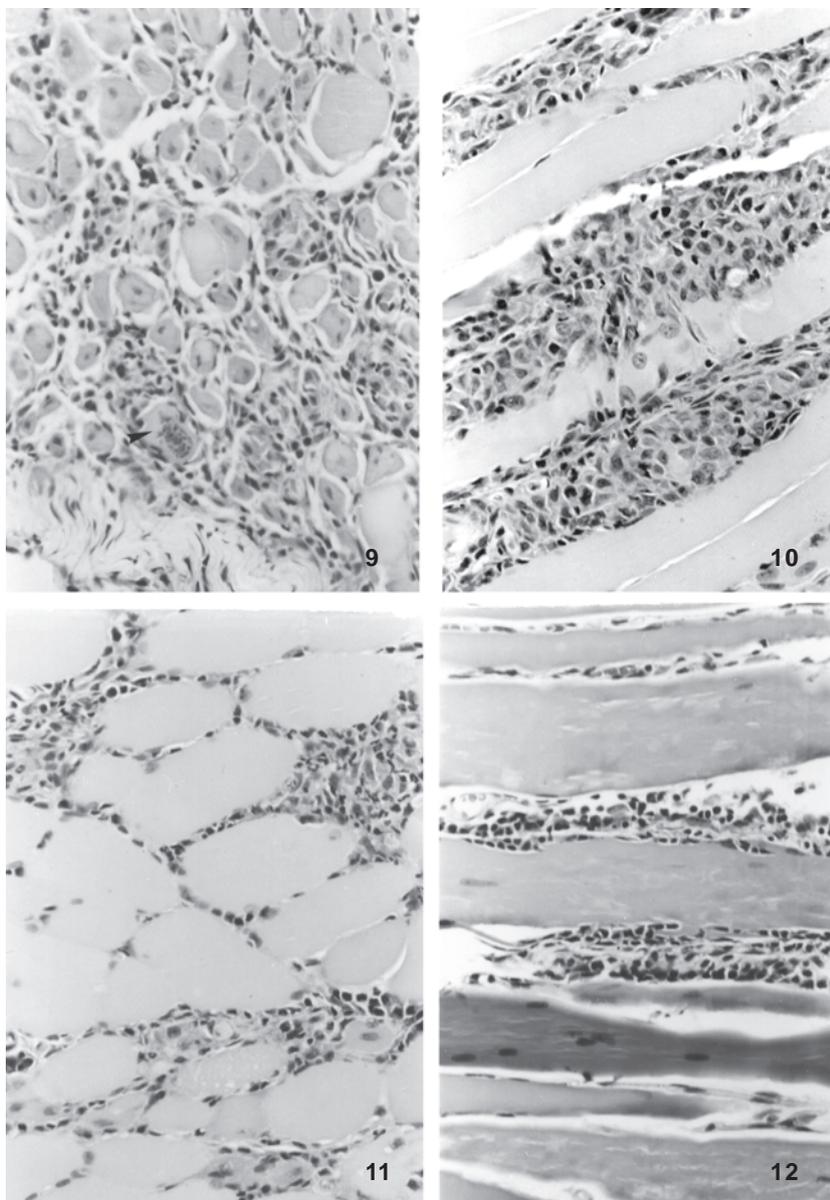


Figura 9 – Miocardite difusa; necrose de fibras cardíacas que estão substituídas por infiltrado mononuclear (macrófagos e linfócitos); proliferação de fibroblastos e depósito matricial intersticial (26 dias de infecção) - HE x 400

Figura 10 – Músculo esquelético: acentuada miosite com infiltrado intersticial mononuclear de linfócitos e macrófagos. Numerosas formas amastigotas do *Trypanosoma cruzi* em célula muscular (setas) (26 dias de infecção) - HE x 400

Figura 11 – Músculo esquelético, trinta dias pós-infecção: espessamento da matriz intersticial com depósito de colágeno em torno de miócitos e de vasos sanguíneos, mostrando birrefringência à luz polarizada em seções coradas pelo método do Picro-Sirius - x 400

Figura 12 – Músculo esquelético, 56 dias de infecção: regressão da fibrose, com depósitos colagênicos intersticiais residuais. Picro-Sirius (luz polarizada) - x 400



9.4

Hamster

Luis Eduardo Ramírez, Eliane Lages-Silva & Edmundo Chapadeiro

Embora a susceptibilidade do hamster ao *Trypanosoma cruzi* seja conhecida, este animal não tem sido utilizado como modelo no estudo da doença de Chagas. Existem alguns trabalhos mostrando parasitismo em todos os órgãos, acompanhado de intensa reação inflamatória, fenômenos degenerativos, elevada hiperplasia do sistema macrofágico e alta mortalidade quando os animais eram inoculados com a cepa Tulahuen (Cariola et al., 1950). A comparação da infecção deste animal com o camundongo, infectado com diferentes cepas e procedências distintas, mostrou que o camundongo é mais susceptível que o hamster (Ossimani & Gurri 1954).

Trabalhos sistematizados, realizados em nossos laboratórios através de métodos parasitológicos, sorológicos, clínicos (radiológicos e eletrocardiográficos) e histopatológicos, tanto na fase aguda, como na fase crônica confirmam que o hamster é susceptível à infecção pelo *T. cruzi* quando inoculado com diferentes cepas (Y, Vicentina, Benedito) e pelas vias intraperitoneal, conjuntival, endovenosa e subcutânea (Ramírez et al., 1991, 1993, 1994). Comparativamente com camundongos, infectados por via intraperitoneal com o mesmo inóculo da cepa Y, observou-se durante a fase aguda (quinze dias) que o hamster controla mais eficientemente a infecção, apresentando uma parasitemia e parasitismo tissular, respectivamente, 5,9 e 1,9 vezes menor (Ramírez et al., 1996).

Nos dois modelos experimentais, o período prepatente foi similar, com duração de três a quatro dias, porém o perfil das curvas de parasitemia mostrou algumas diferenças: nos camundongos foi progressivamente ascendente até o oitavo dia da infecção, a partir do qual começou a declinar até se tornar subpatente, confirmando as observações de outros autores (Melo & Brener 1978; Sousa & Alencar 1984). No hamster, a curva de parasitemia foi baixa e irregular com o pico máximo no 15º dia, confirmando os achados de Ossimani & Gurri (1954). O parasitismo tissular no hamster mostrou maior número de ninhos de amastigotas nas células macrofágicas, quando inoculado com a cepa Y, enquanto no camundongo foi maior nas miocélulas da musculatura lisa, o que parece demonstrar que a cepa Y, durante a fase aguda, é mais macrofagotrópica no hamster e mais miotrópica no camundongo. Em relação ao tecido gorduroso, não foi possível estabelecer, com certeza, a localização dos parasitas, se nos macrófagos ou nos adipócitos, como demonstrado por Andrade & Rocha Silva (1996). Por outro lado, nossas observações não confirmam os achados do parasitismo em relação ao tecido gorduroso marrom (Shoemaker & Hoffman, 1974).

Quanto à fase aguda, não foram observados sinais clínicos importantes. O estudo eletrocardiográfico mostrou em 60% dos hamsters alterações sugestivas de miocardite. A necrópsia dos animais revelou aumento e congestão do coração, do baço e do fígado. Lesões microscópicas foram comuns e progressivas desde as primeiras 24 horas na maioria dos tecidos e órgãos, sendo mais graves no tecido gorduroso e conjuntivo frouxo (celulite) e no músculo liso (miosite). Posteriormente, foi encontrada miocardite, de início nos átrios e, em seguida, nos ventrículos, caracterizada por infiltrado endomisial de mono e polimorfonucleares. Igualmente, este infiltrado foi observado no sistema de condução: nó de Hiss, feixe e ramos. Os gânglios e filetes nervosos do plexo autonômico cardíaco revelaram ganglionite, periganglionite, neurite e perineurite, acompanhadas de sinais de destruição neuronal. No trato digestivo, as lesões (miosite e ganglionite) mostraram sinais de degeneração e necrose. O baço,

o timo, os linfonodos e a medula óssea apresentaram, desde o começo da infecção, um estado reacional de variável intensidade com parasitismo nos macrófagos.

Lesões inflamatórias agudas também foram observadas nos órgãos e tecidos genitais e perigenitais internos (miocélulas, conjuntivo frouxo e plexo nervoso hipogástrico), acompanhadas de intenso parasitismo. Nas adrenais foi observado parasitismo de intensidade variável nos macrófagos da parede dos sinusóides, mas não na parede da veia central. Nos demais órgãos, especialmente na musculatura esquelética e sistema nervoso central, as lesões foram menos freqüentes ou ausentes.

Na fase crônica, alguns animais apresentaram mau estado geral, caracterizado por apatia, perda de peso e pêlos, gengivite ulcerada, palidez das mucosas, dispnéia e edema generalizado; alguns morreram espontaneamente e de modo súbito. O traçado eletrocardiográfico dos animais nesta fase mostrou, a partir do segundo e terceiro meses, aumento transitório da frequência cardíaca e, entre o quarto e quinto meses, redução da mesma. O exame radiológico do trato digestivo, após dieta baritada, revelou aumento do volume do estômago e do calibre do intestino grosso, especialmente ceco (dados não publicados).

Apesar de não ter sido realizado um estudo da cinética dos anticorpos no transcurso da infecção, foi demonstrado, através da técnica da lise mediada pelo complemento (Kretzli & Brener, 1982), que estes animais produzem anticorpos líticos, a partir do terceiro ou quarto mês pós-infecção.

A autópsia dos animais mortos espontaneamente e/ou sacrificados, após anestesia pelo éter, revelou edema do tecido subcutâneo e derrame líquido, claro e transparente, nas cavidades pericárdica, pleural e abdominal (ascite). A presença de formas tripomastigotas do *T. cruzi* foi detectada nesses líquidos, após concentração pelo microhematócrito e pela hemocultura.

O coração da maioria dos hamsters mostrou-se aumentado de volume e congesto e, aos cortes, as cavidades átrio-ventriculares apresentaram-se dilatadas e com ocasionais trombos parietais. Microscopicamente, os corações exibiram infiltrado inflamatório predominantemente de mononucleares de intensidade variável, ora focal, ora zonal, raramente difuso, entre as fibras cardíacas dos átrios, ventrículos e septos. Fibrose, de extensão também variável, substituiu áreas de miocárdio destruído. O tecido específico de condução mostrou, fundamentalmente, porém em grau menor, as mesmas lesões do miocárdio funcional. Ninhos de amastigotas no miocárdio foram encontrados em 50% dos corações. Também o epicárdio exibiu infiltrados focais de mononucleares (epicardite), assim como os gânglios e filetes nervosos do plexo intracardíaco (ganglionite, periganglionite e neurite) com significativa destruição neuronal. Neste modelo, a redução neuronal, ao contrário do que ocorre em outros modelos de animais infectados pelo *T. cruzi*, como ratos (Chapadeiro et al., 1988), camundongos, *C. callosus* (Ferraz de Carvalho et al., 1993) e cães (Lana et al., 1992) é altamente significativa, sendo, portanto, até agora, o único animal no qual se comprovou, de fato, redução neuronal significativa (dados não publicados). Dilatação e alongamento do intestino grosso, especialmente do ceco, constituiu achado freqüente nesta fase, confirmando os achados radiológicos. Microscopicamente, o tubo gastrointestinal apresentou infiltrado de mononucleares na muscular própria (miosite) e nos gânglios (ganglionite) dos plexos misentérico e submucoso com sinais evidentes de destruição neuronal.

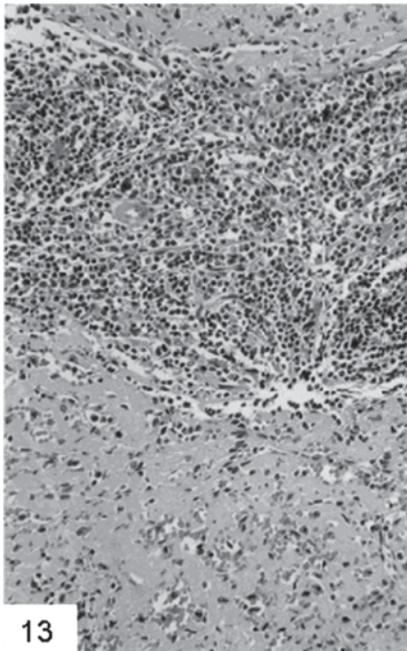
O fígado, em alguns animais, mostrou macro e microscopicamente as características do órgão cardíaco, isto é, congestão e degeneração dos hepatócitos. Além disso, acúmulos nodulares de macrófagos e infiltrados de linfócitos intralobulares podiam ser observados; mais raramente material amilóide (vermelho Congo positivo) podia ser evidenciado nas trabéculas hepáticas. Pancreatite crônica com fibrose e atrofia da parte exócrina constituiu achado freqüente, entretanto, as ilhotas pareciam íntegras. Os linfonodos, baço e medula óssea mostraram discreta hiperplasia reacional, enquanto o timo era geralmente atrofico.

A musculatura esquelética exibiu miosite focal, caracterizada por infiltrado mononuclear endomisial e, ocasionalmente, necrose das fibrocélulas e raros ninhos parasitários.

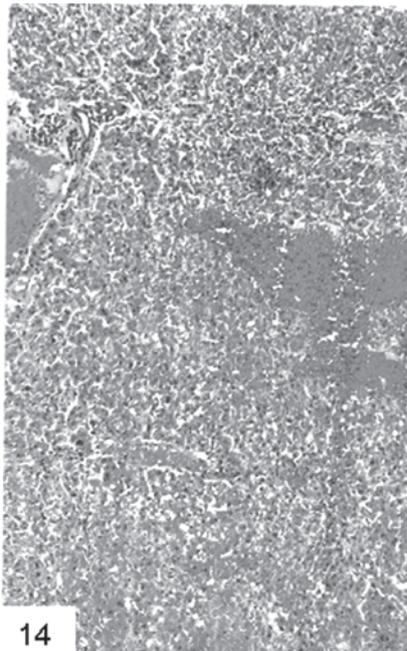
Os órgãos genitais internos mostraram infiltrado de mononucleares no epidídimo (epididimite), vesícula seminal (vesiculite), próstata (prostatite) nos machos, e nos ovários (ooforite) e útero (metrite) nas fêmeas, acompanhadas de atrofia em grau variável desses órgãos; o parênquima testicular, entretanto, mostrou-se preservado em todos os animais. O trato urinário exibiu o mesmo infiltrado mononuclear focal na musculatura lisa da bexiga

(cistite), do ureter (ureterite) e uretra (uretrite). Os gânglios e filetes nervosos no plexo hipogástrico exibiam discreta reação inflamatória. No sistema nervoso central observaram-se, ocasionalmente, nódulos gliais esparsos na substância branca e infiltrados mononucleares na leptomeninge (leptomeningite focal). Nas adrenais não foi encontrado parasitismo e/ou sinais inflamatórios nas veias da medular, como tem sido observado no homem (Teixeira et al., 1991). As Figuras 13 a 24 mostram as características histopatológicas encontradas no modelo hamster durante a fase crônica da infecção experimental por *T. cruzi*.

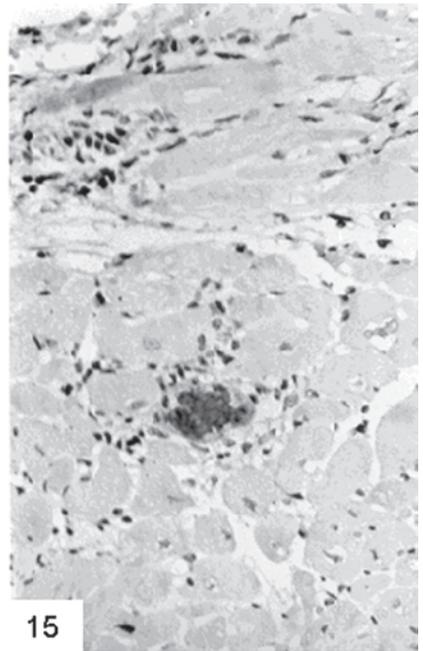
Concluindo, o hamster infectado com *T. cruzi* pode constituir mais um modelo útil para o estudo da doença de Chagas, visto que reproduz muitas das características observadas na infecção chagásica humana; no entanto, torna-se necessário o prosseguimento das pesquisas, principalmente em nível imunológico, para que este animal seja caracterizado como tal.



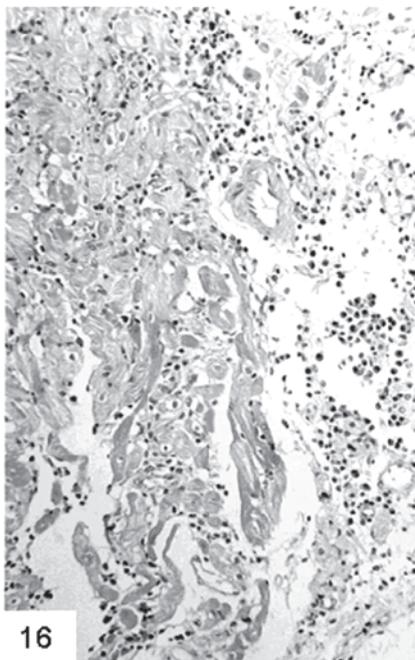
13



14



15



16

Figura 13 – Baço (infecção crônica): deposição intensa de material ameloide amorfo na polpa vermelha e discreta na polpa branca com depleção de ambas as polpas - HE x 200

Figura 14 – Fígado (infecção crônica): congestão sangüínea intensa e áreas extensas de infarto vermelho (fígado cardíaco) – HE x 100

Figura 15 – Coração (infecção crônica): processo inflamatório crônico focal em torno de ninho de amastigotas - PAP x 400

Figura 16 – Coração: miocardite crônica difusa com intensa destruição de miofibras - HE x 200

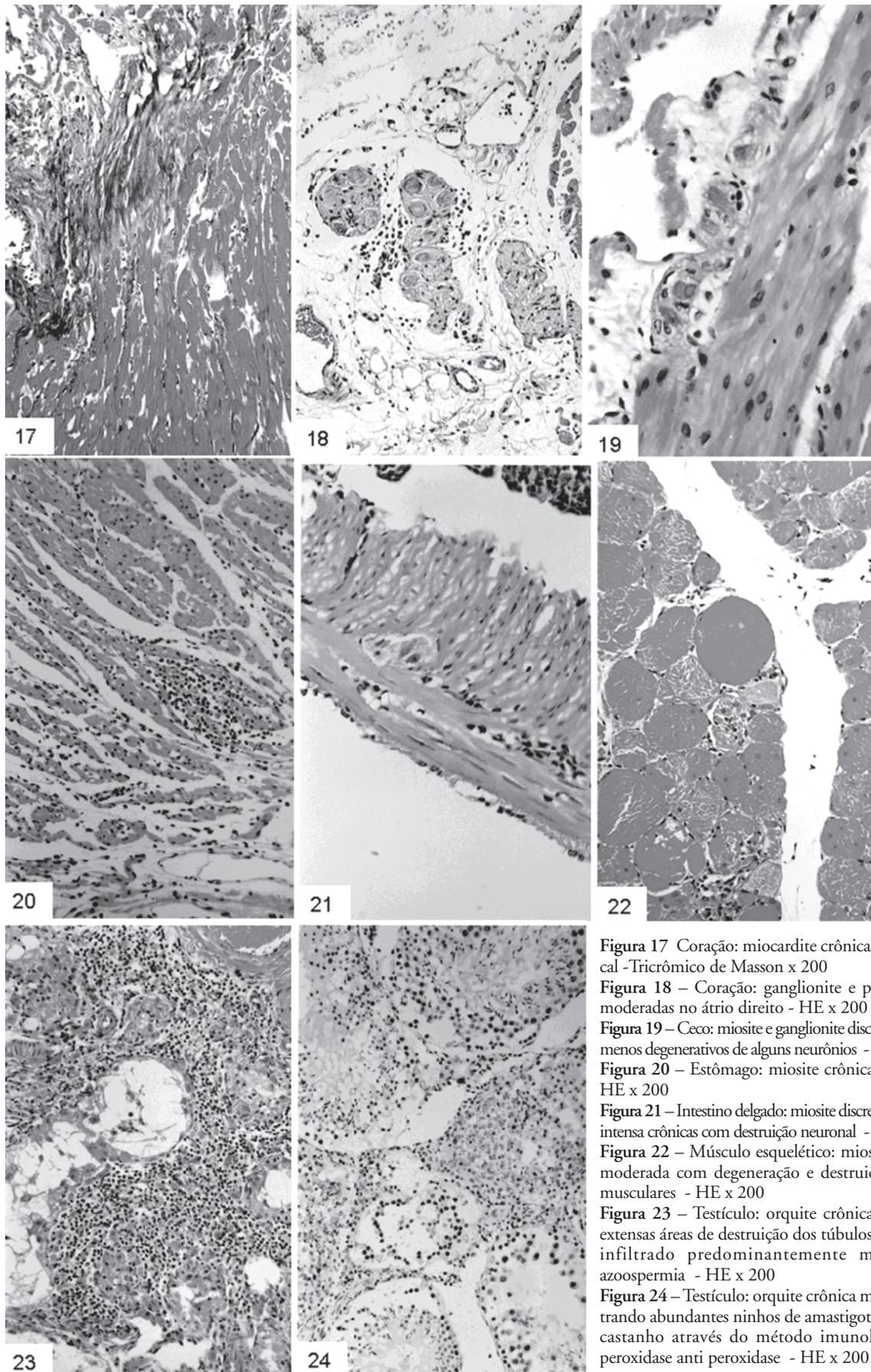


Figura 17 Coração: miocardite crônica fibrosante focal -Tricrômico de Masson x 200
Figura 18 – Coração: ganglionite e periganglionite moderadas no átrio direito - HE x 200
Figura 19 – Ceco: miosite e ganglionite discretas com fenômenos degenerativos de alguns neurônios - HE x 400
Figura 20 – Estômago: miosite crônica multifocal - HE x 200
Figura 21 – Intestino delgado: miosite discreta e ganglionite intensa crônicas com destruição neuronal - HE x 400
Figura 22 – Músculo esquelético: miosite multifocal moderada com degeneração e destruição das fibras musculares - HE x 200
Figura 23 – Testículo: orquite crônica intensa com extensas áreas de destruição dos túbulos seminíferos e infiltrado predominantemente mononuclear, azoospermia - HE x 200
Figura 24 – Testículo: orquite crônica moderada mostrando abundantes ninhos de amastigotas corados em castanho através do método imunohistoquímico peroxidase anti peroxidase - HE x 200



9.5 Coelho

Luis Eduardo Ramírez, Eliane Lages-Silva & Edmundo Chapadeiro

O coelho vem sendo utilizado para o estudo da infecção chagásica desde a descoberta da doença (Chagas, 1909; Agosin & Badinez, 1949). Entretanto, Teixeira et al. (1975) foram, praticamente, os primeiros a realizar um estudo sistematizado da infecção neste animal, tratando de avaliá-lo como modelo experimental. Segundo estes autores, o curso natural da infecção chagásica experimental no coelho parece estar associado à baixa mortalidade na fase aguda e elevada na fase crônica. Histopatologicamente, na fase crônica observaram no coração e intestinos lesões similares às encontradas em humanos, não tendo sido detectado parasitismo tissular em nenhum dos animais inoculados. Além disso, durante esta fase, observaram diferentes graus de neurólise e perda de células ganglionares. Por outro lado, Figueiredo et al. (1979), inoculando coelhos jovens com tripomastigotas da cepa Ernestina, provenientes de cultivos de células de coração ou de células Vero, observaram parasitemia pelo xenodiagnóstico, anticorpos IgM específicos, até o terceiro mês, e IgG pelo resto da vida do animal; foram também observados transtornos eletrocardiográficos na fase aguda manifestados por alterações da repolarização ventricular e bloqueio incompleto do ramo direito do feixe de Hiss e, na fase crônica, bloqueio completo do ramo direito, hemibloqueio anterior esquerdo e intervalo PR longo. Macroscopicamente, foram observados aumento do coração com átrios e ventrículos dilatados, sinais de insuficiência cardíaca, tromboembolismo e megacólon. Esses mesmos animais mostraram, no intestino, infiltrados linfocitários com destruição das células da musculatura própria e células ganglionares parassimpáticas, com conseqüentes seqüelas fibrosas e despopulação neuronal (Rezende Filho et al., 1979).

Santos-Buch & Teixeira (1974) demonstraram que linfócitos provenientes de coelhos infectados com *T. cruzi*, ou imunizados com frações subcelulares do mesmo parasita, destruíam células singênicas de coelhos infectados ou não infectados, demonstrando a existência de determinantes antigênicos comuns entre o parasita e as fibras musculares cardíacas. Segundo os mesmos autores, isto configuraria um mecanismo de auto-imunidade ou fundamento da patogênese da lesão cardíaca. Por outro lado, Andrade & Andrade (1979) observaram que o coelho oferece elevada resistência à indução da infecção experimental pelo *T. cruzi* quando infectado com diferentes inóculos e cepas (Y, Colombiana e 12SF); durante a fase aguda, a maioria dos animais apresentou parasitemia muito baixa ou negativa, não ocorrendo mortalidade nesta fase. Do ponto de vista histopatológico apenas alguns animais sacrificados mostraram pequenos focos esparsos de infiltração mononuclear no miocárdio na ausência de ninhos de amastigotas. Em animais que morreram entre o quarto e o 24º meses após inoculação, não foram observados parasitas nem lesões difusas no coração, mas somente pequenos e escassos focos de células mononucleares e fibrose intersticial. Contudo, Chiari et al. (1980) inoculando coelhos com diferentes doses, vias e cepas (Y, CL e MR), não recuperaram o parasita através de hemoculturas (LIT) realizadas entre os quinze e sessenta dias após inoculação. Além disso, nenhum dos animais, nas fases aguda e crônica, apresentou lesões histopatológicas significativas e as alterações encontradas foram muito discretas, as quais, de acordo com os autores, não foram induzidas pelos parasitas. Os autores concluem que esses animais são pouco susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* e, por conseguinte, não seriam um bom modelo experimental para o estudo da doença de Chagas.

A validade do coelho como modelo para o estudo da fase crônica da infecção foi reafirmada por Teixeira et al. (1983), os quais demonstraram que este animal apresentava, com grande frequência, aumento da área cardíaca, insuficiência cardíaca congestiva, fenômenos tromboembólicos, manifestações eletrocardiográficas e megacólon.

Ramírez & Brener (1987), em pesquisa sistematizada realizada através de estudos parasitológicos, imunológicos, clínicos e histopatológicos em coelhos infectados por diferentes cepas (Y, CL e Ernane), inóculos ($2-4.10^3$ e 10^7), vias (intraperitoneal e conjuntival) e procedência de tripomastigotas (fezes de barbeiros, sangue de camundongos e cultura de células Vero), constataram alguns achados interessantes: na fase aguda da infecção, 95,6% dos animais inoculados apresentaram parasitemia patente; os demais foram positivos através do xenodiagnóstico ou da pesquisa de anticorpos pela imunofluorescência indireta. Algumas das características desta fase, período prepatente e curvas de parasitemia, foram fortemente influenciadas pela cepa e origem do parasita, inóculo e via de inoculação.

A sorologia realizada pelos métodos da imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HAI) e lise mediada pelo complemento (LMC) mostrou a presença de anticorpos específicos desde os primeiros dias da infecção, variando de acordo com a via de inoculação e natureza do inóculo. Os títulos de IgM foram detectados na maioria dos coelhos até a 19ª semana, enquanto a IgG foi observada, ao longo de toda a infecção, com títulos elevados. Os anticorpos hemaglutinantes foram coincidentes com o aparecimento da IgG e atingiram também elevados títulos durante a fase crônica. Estas observações confirmam as de outros pesquisadores em coelhos (Katzin et al., 1977; Figueiredo et al., 1979; Teixeira et al., 1983), assim como em humanos (Vattuone et al., 1973; Cerisola, 1977; Hanson, 1977). Os anticorpos líticos foram detectados em todos os animais infectados, aparecendo entre a segunda e a oitava semanas pós-inoculação, com elevadas percentagens de lise no transcurso da infecção, independente da cepa utilizada, demonstrando a implantação de um processo ativo de infecção pelo *T. cruzi* (Ramírez, 1984).

O estudo eletrocardiográfico na fase aguda mostrou que 62,5% dos coelhos infectados apresentavam mutabilidade do traçado, sendo as alterações mais frequentes a bradicardia e o longo intervalo entre as ondas P e R. A mortalidade não foi observada durante a fase aguda, confirmando os achados de outros autores (Andrade & Andrade 1979; Chiari et al., 1980).

Nos animais sacrificados durante a fase aguda, a autópsia não revelou alterações macroscópicas significativas. Microscopicamente, o coração de alguns animais apresentou miocardite aguda de intensidade e extensão variáveis, caracterizada por focos de infiltrados endomisiais de células mononucleares aderidas ao sarcolema das fibrocélulas e, ocasionalmente, polimorfonucleares neutrófilos e eosinófilos. O exsudato estava associado à degeneração e à destruição de miocélulas, observando-se discreta fibrose intersticial em poucos animais. Ninhos de amastigotas nas células musculares cardíacas foram encontrados em 35% dos coelhos. No trato digestivo observaram-se infiltrados focais discretos na muscular própria (miosite) e nos plexos entéricos (ganglionite); na musculatura estriada foram encontrados, ocasionalmente, focos de infiltrados mononucleares, na ausência de parasitas (Moreira-Silva et al., 1996).

Na fase crônica, a partir do terceiro mês até o 22º mês, a parasitemia foi detectada em 38% dos animais através do xenodiagnóstico, em 14,8% através da hemocultura (LIT), como demonstraram também as pesquisas de Teixeira et al. (1983) e Figueiredo (1984).

Durante a mesma fase, 71,7% dos coelhos apresentaram alterações eletrocardiográficas, sendo as mais frequentes: bradicardia sinusal, bloqueio átrio-ventricular de primeiro grau, fibrilação auricular, extra-sístoles ventriculares e distúrbios de condução intraventricular. Nos coelhos controles não foram observadas alterações que chamassem a atenção. Entretanto, cumpre observar que a falta de estudos básicos do traçado eletrocardiográfico no coelho, as dificuldades de obtenção do mesmo e a falta de estudos anátomo-clínicos, envolvendo inclusive o sistema de condução, dificultaram a exata interpretação desses achados.

À necropsia, poucos animais apresentaram sinais de insuficiência cardíaca congestiva, como presença de hidroperitônio, fígado em noz moscada e hidropericárdio. A morte súbita foi rara, não tendo sido possível estabelecer uma correlação desta com os achados clínicos.

Do ponto de vista histopatológico, a fase crônica foi subdividida em crônica recente (três a seis meses) e crônica tardia (depois de seis meses), a fim de detectar possíveis lesões evolutivas entre as fases aguda e crônica e, desta maneira, estabelecer a morfogênese do processo patológico. Na fase crônica recente, a miocardite foi pouco freqüente, porém a fibrose (discreta) mostrou-se mais comum que na fase crônica, levando-nos a supor que no coelho esta fibrose inicial representaria um fenômeno reparativo que se segue à destruição miocárdica que ocorre na fase aguda (Moreira-Silva et al., 1996).

Segundo nossas observações, o coelho não reproduziu o megacólon encontrado por outros autores, nem as graves lesões microscópicas observadas no trato digestivo humano (Teixeira et al., 1975; Rezende Filho et al., 1979; Figueiredo, 1984). As lesões na musculatura esquelética, especialmente a miosite, foram discretas. As Figuras 25 a 56 mostram aspectos histopatológicos encontrados no modelo coelho, fases aguda e crônica.

Apesar da positividade do xenodiagnóstico e da hemocultura, nenhum dos órgãos e tecidos examinados na fase crônica apresentou ninhos de amastigotas.

Em conclusão, embora o coelho infectado pelo *T. cruzi* não preencha, até o momento, todos os requisitos para um bom modelo experimental, em vista de não reproduzir as lesões observadas nos humanos, poderá, entretanto, ser bastante útil para os estudos imunopatogênicos, como foi sugerido por Teixeira et al. (1983).

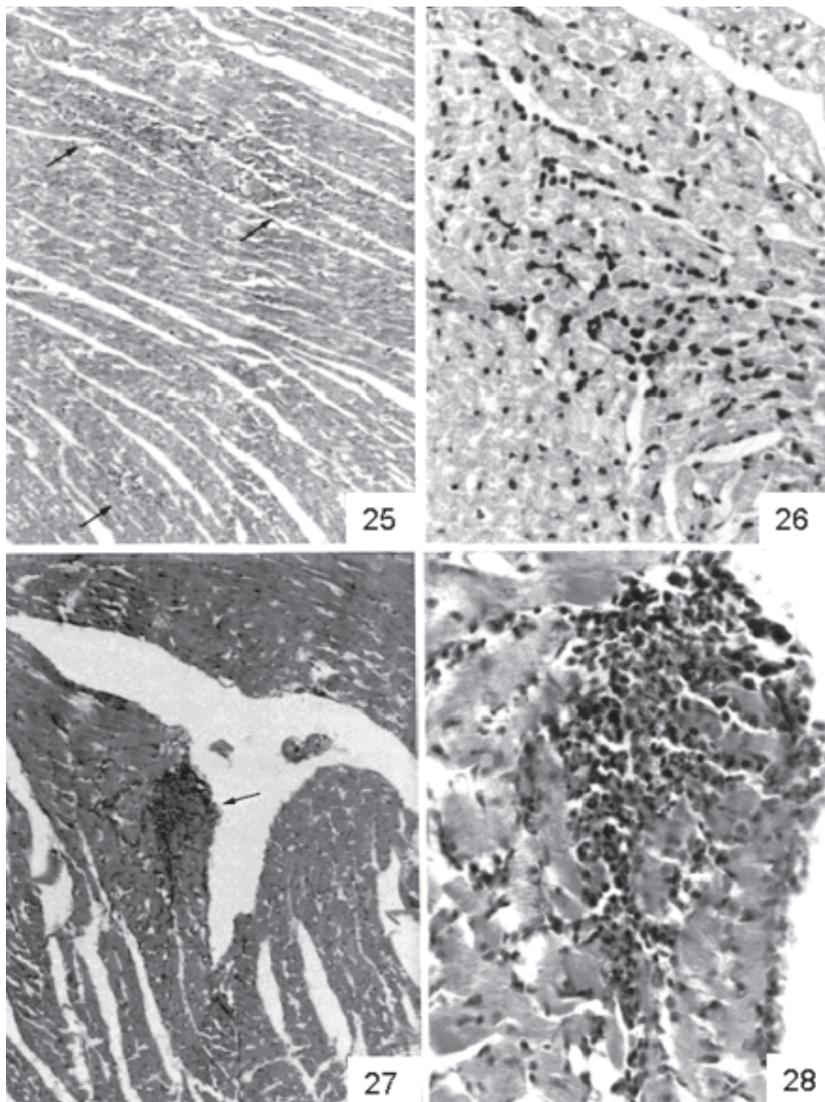


Figura 25 – Miocárdio (C92 -fase aguda - 25 dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite focal moderada. Focos de infiltrado leucocitário no endomísio (setas) - HE x 107,5

Figura 26 – Miocárdio (C92 - fase aguda - 25 dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite focal moderada. Pormenor da figura anterior, mostrando infiltrado mononuclear (provavelmente constituído por pequenos linfócitos) no endomísio. Os linfócitos acham-se aderidos ao sarcolema das fibrocélulas - HE x 430

Figura 27 – Miocárdio (C85 - fase aguda - quarenta dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite focal moderada. Foco de infiltrado inflamatório (seta) - HE x 107,5

Figura 28 – Miocárdio (C85 - fase aguda - quarenta dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite focal moderada. Pormenor da figura anterior mostrando o infiltrado leucocitário constituído por mononucleares (grandes e pequenos), granulócitos, neutrófilos e eosinófilos, associados a fenômenos degenerativos e necróticos de fibrocélulas - HE x 430

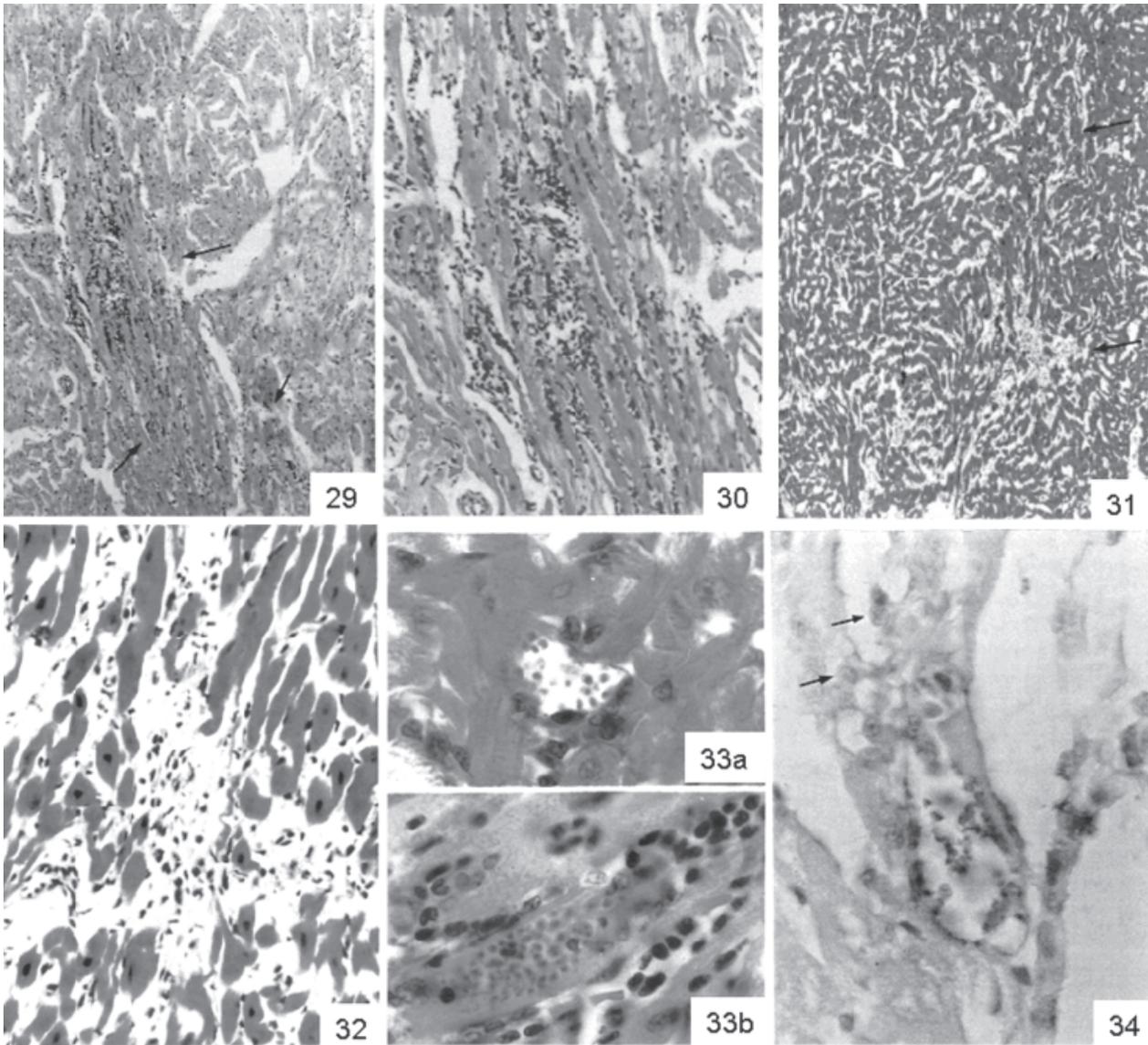


Figura 29 – Miocárdio (C75 - fase aguda - 23 dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite multifocal confluyente (zonal). Múltiplos focos confluentes (setas) de infiltrado leucocitário endomisial - HE x 107,5

Figura 30 – Miocárdio (C75 - fase aguda - 23 dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite multifocal confluyente (zonal). Pormenor da figura anterior mostrando infiltrado mononuclear endomisial, associado à destruição de fibrocélulas cardíacas - HE x 213

Figura 31 – Miocárdio (C76 - fase aguda - 23 dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite focal moderada com fibrose inicial levíssima. Focos de fibrose inicial endomisial e perimisial (setas) - Tricrômico de Gomori x 107,5

Figura 32 – Miocárdio (C76 - fase aguda - 23 dias de infecção pela cepa Ernane): miocardite focal moderada com fibrose inicial levíssima, endomisial e perimisial. Pormenor da figura anterior mostrando um foco de miocardite caracterizado por infiltrado mononuclear, destruição de miócitos e proliferação de células fusiformes compatíveis com fibroblastos, com discreta deposição de colágeno (corado levemente em azul) - Tricrômico de Gomori x 430

Figura 33a – Miocárdio (C7 - fase aguda - 22 dias de infecção pela cepa CL): ninho de amastigotas do *Trypanosoma cruzi*, aparentemente íntegro sem reação inflamatória - H&E x 1.075 [checar com autor se não é 107,5]

Figura 33b – Miocárdio (C2 - fase aguda - 23 dias de infecção pela cepa Y): ninho de amastigotas de *Trypanosoma cruzi*, aparentemente roto, com reação inflamatória em torno - H&E x 1.075 [idem]

Figura 34 – Miocárdio (C91 - fase aguda - 25 dias de infecção pela cepa Ernane): ninho de amastigotas do *Trypanosoma cruzi*, aparentemente roto, com reação inflamatória em torno (mononucleares apontados por setas) - PAP x 1.075 [idem]

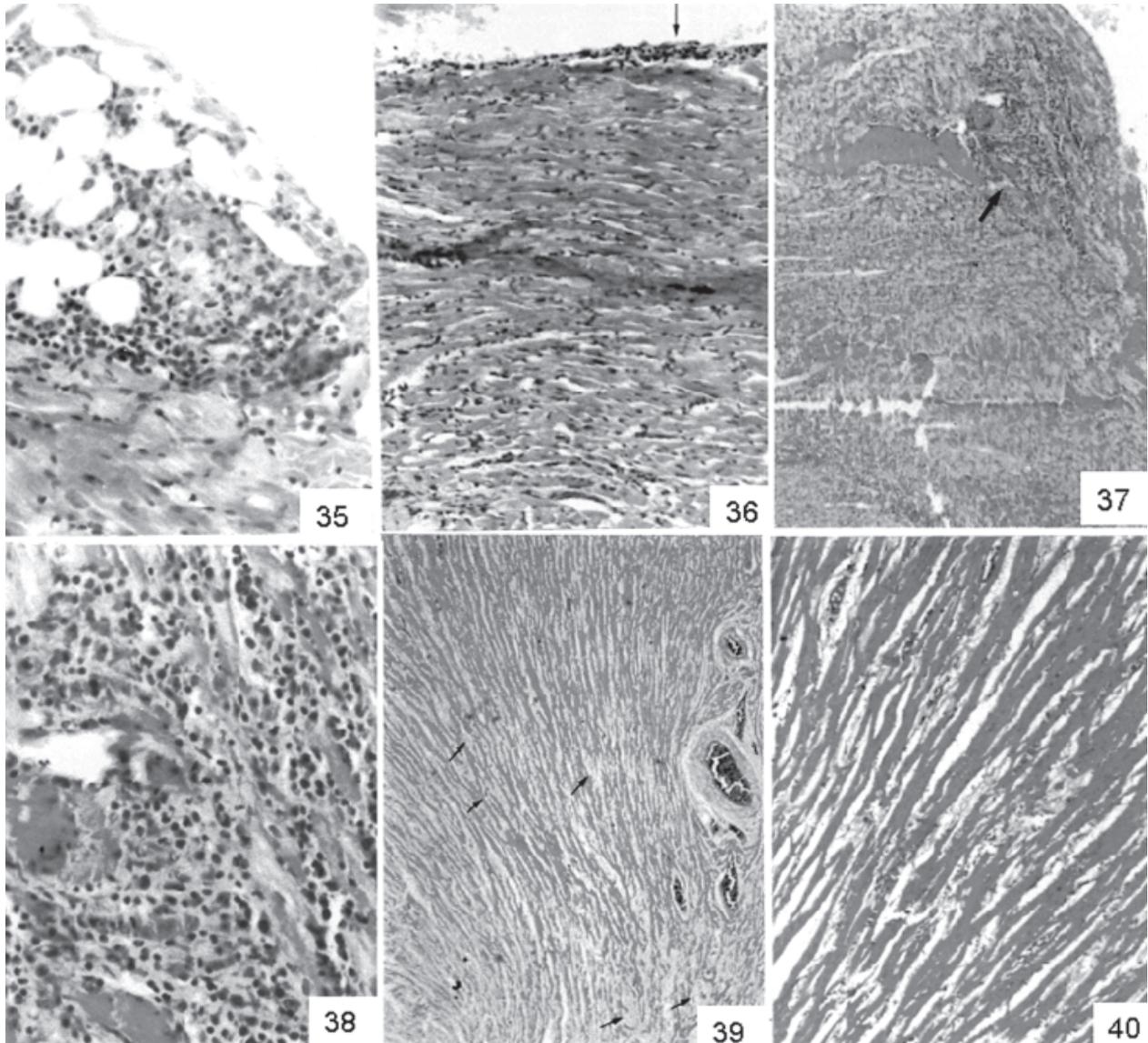


Figura 35 – Epicárdio (C91 - fase aguda - 25 dias de infecção pela cepa Ernane): epicardite focal. Infiltrado mononuclear, neutrofílico e eosinofílico no tecido adiposo epicárdico - HE x215

Figura 36 – Endocárdio e miocárdio (C92 - fase aguda - 25 dias de infecção pela cepa Ernane): endocardite focal. Infiltrado mononuclear focal, discreto no endocárdio. No miocárdio também se observam focos de infiltrado mononuclear - HE x 215

Figura 37 – Miocárdio (C84 - fase crônica recente - três meses de infecção pela cepa Y): miocardite focal leve, endomisial e perimisial. Foco de infiltrado leucocitário no miocárdio (seta) - HE x 107,5

Figura 38 – Miocárdio (C84 - fase crônica recente - três meses de infecção pela cepa Y): miocardite focal leve, endomisial e perimisial. Pormenor da figura anterior, mostrando exsudato de mononucleares (grandes e pequenos) e granulócitos neutrófilos, associado a fenômenos degenerativos e necrose de fibrocélulas - HE x 430

Figura 39 – Miocárdio (C64 - fase crônica recente - quatro meses de infecção pela cepa Ernane): miocardite multifocal confluyente (zonal) predominantemente endomisial. Focos confluentes de infiltrados leucocitários endomisiais (setas) - HE x 43.

Figura 40 – Miocárdio (C64 - fase crônica recente - quatro meses de infecção pela cepa Ernane): miocardite multifocal confluyente (zonal) predominantemente endomisial. Pormenor da figura anterior mostrando focos de infiltrado mononuclear, endomisiais, com alterações degenerativas e necrose de fibrocélulas - HE x 107,5

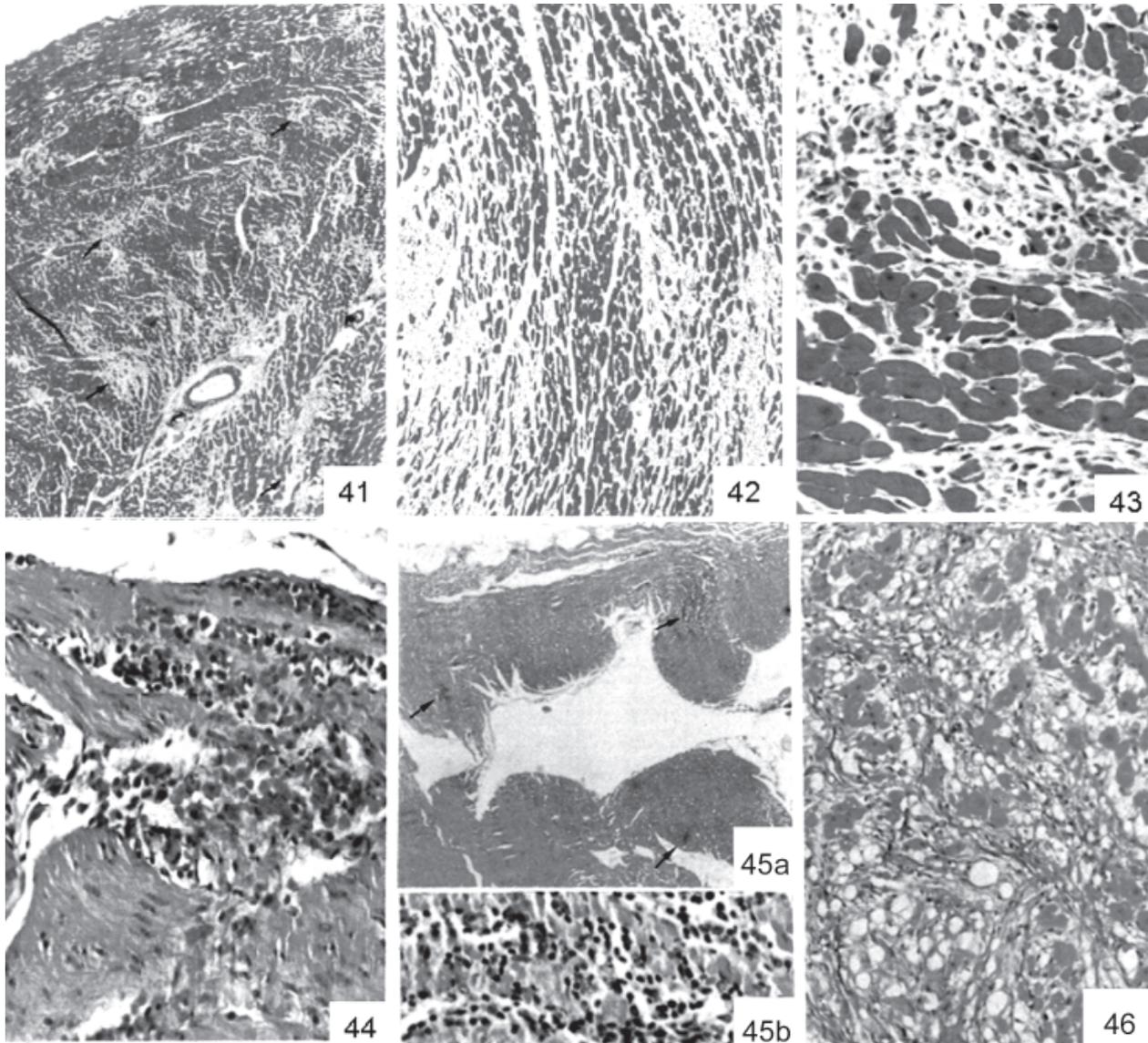


Figura 41 – Miocárdio (C52 - fase crônica recente - quatro meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante. Múltiplos focos confluentes de infiltrado leucocitário associados à destruição de fibrocélulas e fibrose inicial, em leve tom azul (setas), de distribuição endomisial e perimisial - Tricrômico de Gomori x 43

Figura 42 – Miocárdio (C52 - fase crônica recente - quatro meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante. Pormenor da figura anterior mostrando áreas confluentes de destruição de fibrocélulas, substituídas pela fibrose. A hipercelularidade e a discreta deposição de colágeno, indicada pela leve tonalidade azul, caracteriza a fibrose como inicial - Tricrômico de Gomori x 107,5

Figura 43 – Miocárdio (C52 - fase crônica recente - quatro meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante. Pormenor da figura anterior mostrando a proliferação de células fusiformes, compatíveis com fibroblastos, com discreta deposição de colágeno (coloração azulada), em substituição às fibrocélulas destruídas - Tricrômico de Gomori x 430

Figura 44 – Túnica muscular de parede gástrica (C81 - fase crônica recente - três meses de infecção pela cepa Y): miosite focal. Infiltrado inflamatório mononuclear e neutrofílico na túnica muscular do estômago - HE x 430

Figura 45 – Miocárdio (C9 - fase crônica tardia - dezesseis meses de infecção pela cepa CL): miocardite focal leve. Focos de infiltrado leucocitário (setas). Em B, pormenor de um dos focos mostrando o infiltrado constituído por mononucleares, pequenos e grandes, no endomísio - H&E x107,5 (Figura 45 A), H&E x 430 (Figura 45 B)

Figura 46 – Miocárdio (C47 - fase crônica tardia - seis meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante. Foco de miocardite mostrando infiltrado mononuclear, acentuada miocitólise e proliferação de células fusiformes compatíveis com fibroblastos - H&E x 215

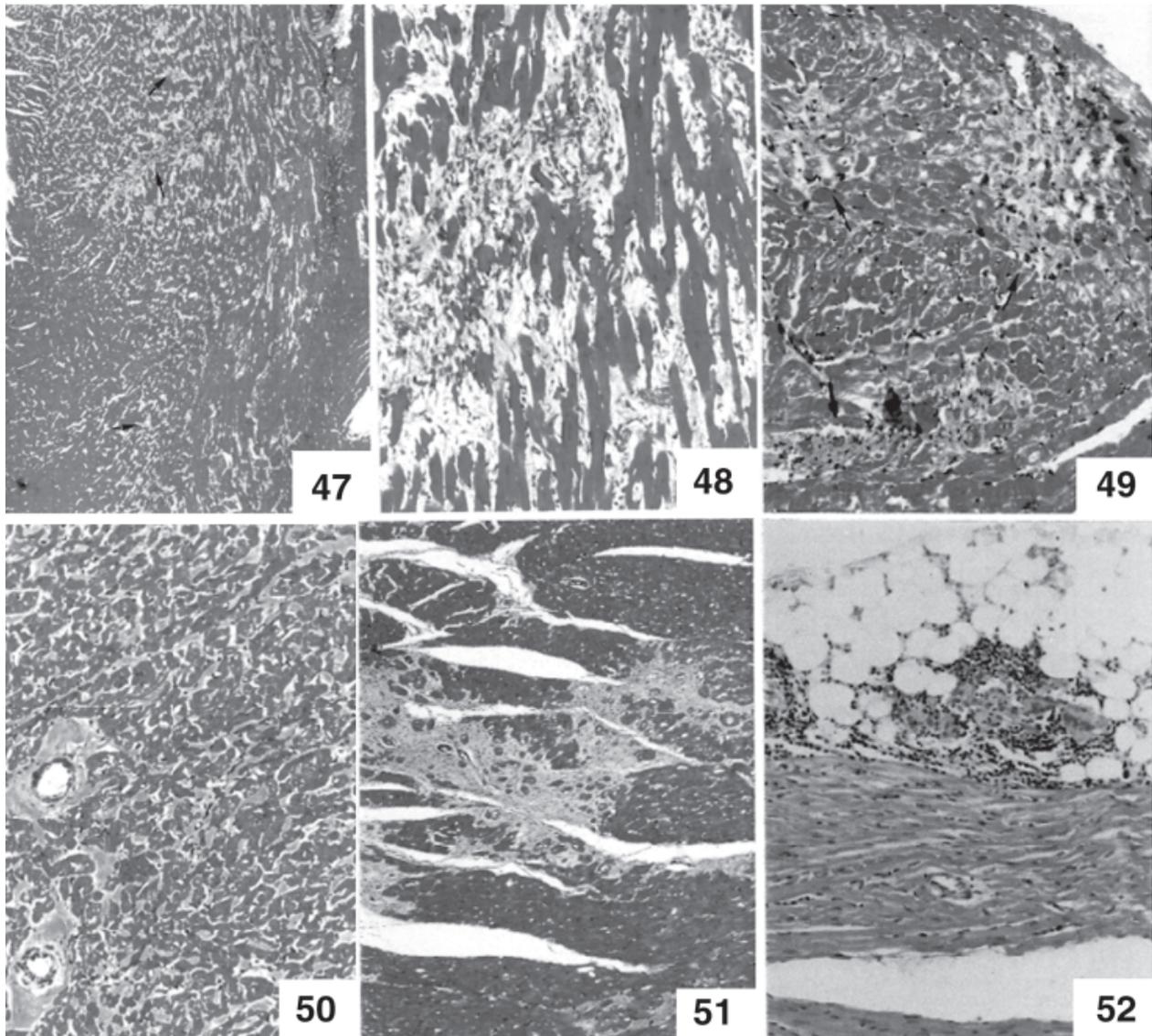


Figura 47 – Miocárdio (C47 - fase crônica tardia - seis meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante. Múltiplos focos confluentes de infiltrado leucocitário miocárdico, com destruição de fibrocélulas e fibrose inicial (setas) - Tricrômico de Gomori x 43

Figura 48 – Miocárdio (C47 - fase crônica tardia - seis meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante. Pormenor da figura anterior mostrando áreas perimisiais e endomisiais de destruição de miócitos e proliferação de células fusiformes, compatíveis com fibroblatos, com discreta deposição de colágeno (fibrose inicial) - Tricrômico de Gomori x 215

Figura 49 – Miocárdio (C25 - fase crônica tardia - treze meses de infecção pela cepa Y): miocardite focal moderada, fibrosante. São vistos três focos de fibrose miocárdica (setas), predominantemente endomisial, com discreto infiltrado mononuclear. A fibrose caracteriza-se por intensa deposição de colágeno, corado em azul (fibrose avançada) - Tricrômico de Gomori x 215

Figura 50 – Miocárdio (C47 - fase crônica tardia - seis meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante, perimisial e endomisial. Pormenor de uma área de fibrose miocárdica perimisial e endomisial, caracterizada por acentuada deposição de colágeno, corado em azul (fibrose avançada) - Tricrômico de Gomori x 215

Figura 51 – Miocárdio (C4 - fase crônica tardia - doze meses de infecção pela cepa Y): miocardite multifocal confluyente (zonal), fibrosante, perimisial e endomisial. Múltiplos focos confluentes de destruição de fibrocélulas e substituição por fibrose avançada - Tricrômico de Gomori x 107,5

Figura 52 – Epicárdio (C9 - fase crônica tardia - dezesseis meses de infecção pela cepa CL): epicardite focal. Infiltrado mononuclear no tecido adiposo epicárdico, com presença de células epitelióides e de células gigantes do tipo Langhans - HE x 215

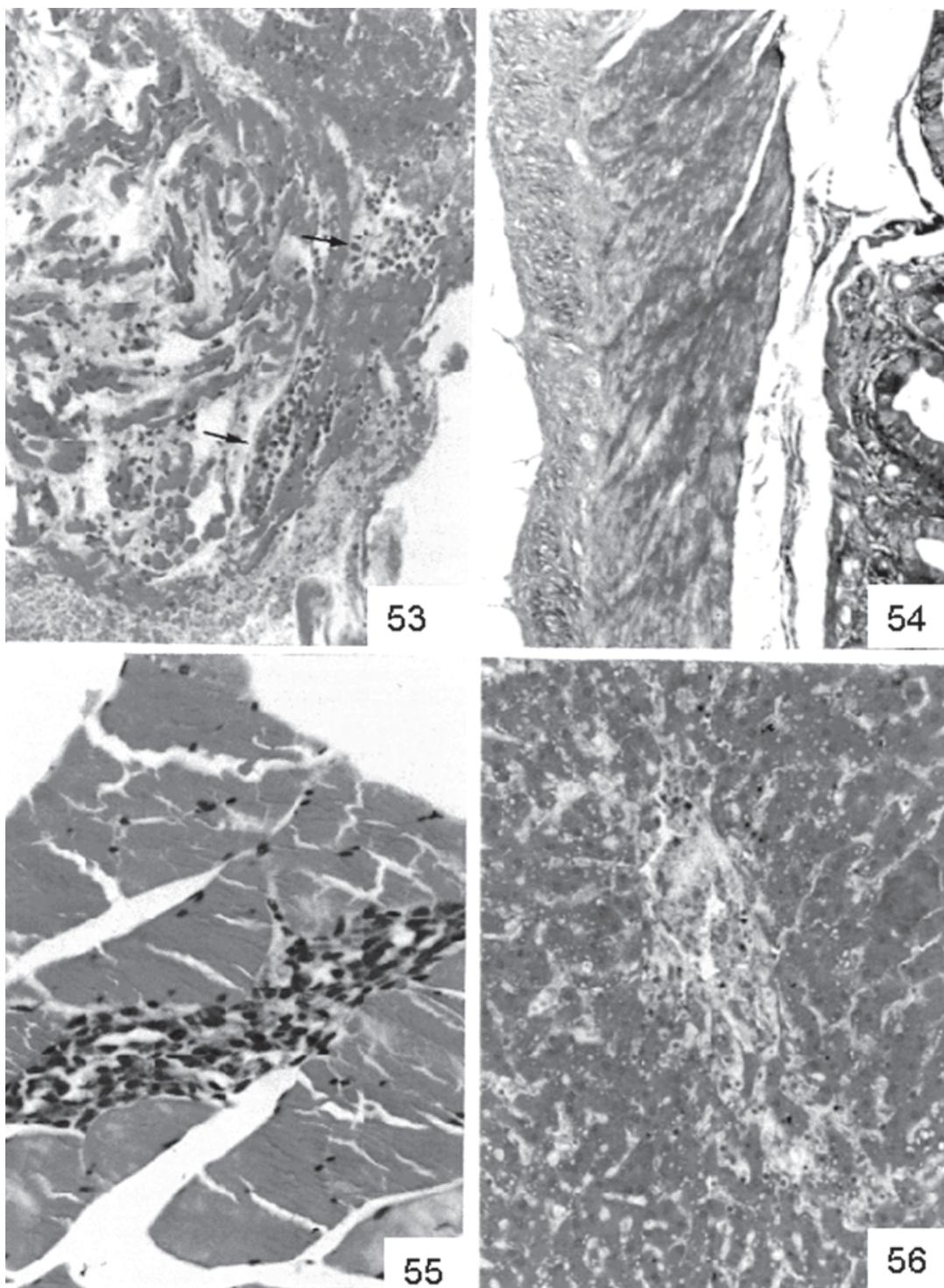


Figura 53 – Miocárdio da ponta do ventrículo direito, em área de ruptura (C57 - fase crônica tardia - doze meses de infecção pela cepa Y): hemorragia e intensa miocardite, com exsudato mononuclear e neutrofilico, formando microabscessos (setas) - HE x 215

Figura 54 – Parede do ceco (C44 - fase crônica tardia - dezoito meses de infecção pela cepa Y): fibrose difusa demonstrada pela coloração azul, da túnica muscular externa - Tricrômico de Gomori x 107,5

Figura 55 – Tecido muscular esquelético (C16 - fase crônica tardia - 22 meses de infecção pela cepa CL): miosite focal. Foco de infiltrado mononuclear perimisial e proliferação de células fusiformes compatíveis com fibroblastos - HE x 430

Figura 56 – Tecido hepático (C47 - fase crônica tardia - seis meses de infecção pela cepa Y): fígado cardíaco de segundo grau. Congestão hepática centrolobular com fenômenos degenerativos (degeneração hidrópica e esteatose) e necrose de hepatócitos perivenulares - HE x 215



9.6 Cão

Sonia G. Andrade

O cão tem sido utilizado por diversos pesquisadores no estudo experimental da doença de Chagas. Este modelo é de grande interesse porque é o único, entre os diversos modelos experimentais, que desenvolve as diversas formas clínico-patológicas da doença de Chagas, como são vistas no homem.

A fase aguda da doença em cães jovens, inoculados com cepas virulentas do *Trypanosoma cruzi* evolui em um período de quinze a 25 dias pós-inóculo, cursando em geral como uma forma aguda grave no homem, com envolvimento cardíaco proeminente (Andrade & Andrade, 1980). Os animais que sobrevivem a esta fase aguda passam a uma fase latente da infecção, sem sinais de doença, com eletrocardiogramas normais, caracterizando a fase indeterminada (Andrade et al., 1981; Andrade, 1984). Apenas uma pequena percentagem dos casos desenvolve a forma crônica cardíaca, com cardiomegalia, arritmias, edema periférico, ascite e derrame pericárdico e um quadro de miocardite crônica progressiva (Laranja & Andrade, 1980).

A fase aguda da infecção é facilmente obtida em cães jovens (dois a três meses de idade). Utilizando as cepas do *T. cruzi*, classificadas como do Tipo I (Y ou Peruana), a infecção se caracteriza por um curso rápido, levando ao óbito em no máximo vinte dias e, a depender do inóculo, os cães não sobrevivem à fase aguda. Por este motivo as cepas que têm sido usadas, objetivando um acompanhamento mais prolongado, são as cepas 12 SF (Tipo II) proveniente de São Felipe, Bahia, e a cepa Colombiana (Tipo III).

Os inóculos, constituídos de formas sanguícolas obtidas de sangue citratado de camundongos, são injetados intraperitonealmente variando entre 4.10^5 e 6.10^5 . Os cães jovens desenvolvem parasitemias pouco elevadas a partir do sétimo dia pós-infecção, não havendo paralelismo entre o número de parasitos no sangue periférico e o intenso parasitismo cardíaco desenvolvido por estes animais.

As lesões histopatológicas da fase aguda se caracterizam por intenso parasitismo do miocárdio, com rotura das células parasitadas, determinando acentuado infiltrado focal com mononucleares e polimorfonucleares. Há também necrose de miócitos não parasitados e intensa miocardite (Figura 57).

As lesões na fase aguda podem ser monitorizadas pelo estudo eletrocardiográfico e comparadas com o quadro anátomo-patológico (Andrade, 1984) pelo estudo do sistema de condução do coração que mostra lesões inflamatórias acentuadas. Em geral as alterações eletrocardiográficas aparecem entre quinze e trinta dias pós-infecção e se caracterizam por alterações de onda T e do segmento ST, evoluindo posteriormente para alterações indicativas do envolvimento dos átrios do coração, principalmente a fibrilação atrial. A reversão das alterações eletrocardiográficas foi vista em cães tratados com quimioterápico específico (nifurtimox), principalmente quando associado com corticóide (Andrade et al., 1980) e correspondeu à regressão das intensas lesões histopatológicas apresentadas pelos animais antes do tratamento. A possibilidade de acompanhamento eletrocardiográfico permite avaliar a produção e condução do estímulo elétrico e a instalação das arritmias cardíacas, bem como estabelecer a sua correlação com as lesões do sistema excito-condutor do coração.

O modelo do cão, pelas suas características, permite a investigação dos mecanismos patogénéticos envolvidos no estabelecimento das lesões através de estudos histopatológico, ultra-estrutural e imunopatológico.

O estudo ultra-estrutural do miocárdio na fase aguda mostrou, ao lado de células parasitadas, a presença de alterações degenerativas e necróticas em miócitos não parasitados (Andrade et al., 1996). Linfócitos e macrófagos estavam aderentes às células cardíacas e determinavam alterações da membrana basal, miocitólise e separação das junções intercelulares. Estas alterações sugerem um mecanismo citotóxico e citolítico mediado por células imunes efectoras, na necrose de células cardíacas não parasitadas, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (Andrade et al., 1996).

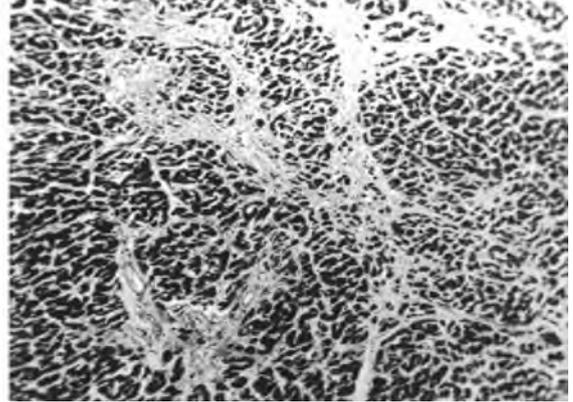
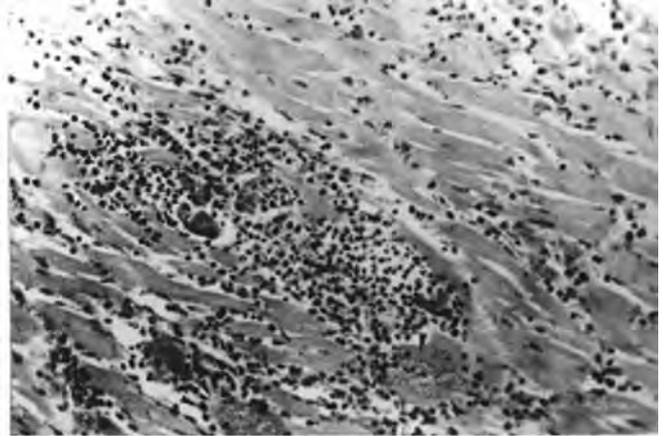
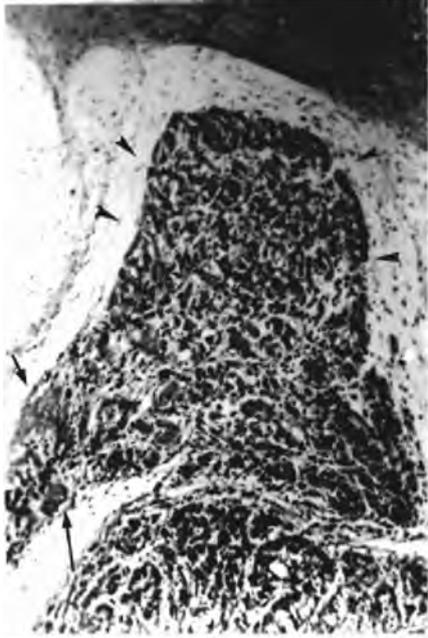
A forma indeterminada no cão, como no homem, cursa sem sintomatologia e sem alterações eletrocardiográficas. Os animais acompanhados desde a fase aguda até três anos após a infecção tiveram bom desenvolvimento, com saúde aparente e ativos. O estudo histopatológico do coração nestes animais mostrou ausência de lesões ou presença de lesões inflamatórias focais discretas constituídas por macrófagos e linfócitos. Diferentemente do que foi observado na fase aguda, não mostram tendência a aderirem ao miócito, não determinam alterações citotóxicas sobre os mesmos quando examinados ao microscópio eletrônico e mostram tendência ao desaparecimento por apoptose, com condensação citoplasmática e alterações características da cromatina nuclear (Andrade et al., 1996). Este processo visto na forma indeterminada do cão pode ser responsável pela falta de progressão das lesões nesta forma, que estariam sujeitas a um mecanismo de controle que levaria à apoptose das células inflamatórias. Uma acentuação da miocardite da fase indeterminada foi obtida em cães pelo uso de ciclofosfamida em baixas doses (50 mg/m² área corporal, três vezes por semana, durante três semanas). Estes animais desenvolveram uma miocardite difusa com necrose de fibras cardíacas e acentuado infiltrado inflamatório mononuclear, na ausência de parasitos.

Estes achados vieram a demonstrar que uma interferência na rede imunológica de supressão de hipersensibilidade tardia, que mantinha os animais na forma indeterminada, é capaz de desencadear uma miocardite evolutiva nos mesmos (Andrade et al., 1987).

A forma crônica cardíaca raramente se desenvolve no cão, pelo menos no intervalo de tempo de três anos entre a inoculação e o sacrifício. Têm sido descritos casos com cardiomegalia, arritmia e insuficiência cardíaca congestiva, porém sem estudo anátomo-patológico. Esta correlação clínico-patológica foi observada por Laranja & Andrade (1980), que descreveram a forma crônica cardíaca em um cão com dezesseis meses de infecção com características semelhantes às observadas na cardiopatia humana, com miocardite difusa, fibrose focal e intersticial e degeneração focal de fibras cardíacas em relação com o processo inflamatório (Figura 58). Também na fase crônica o estudo do sistema excito-condutor do coração permite reconhecer topograficamente as lesões fibrótico-inflamatórias nos diversos segmentos do sistema (Figuras 59 e 60), possibilitando a correlação eletrocardiográfica.

Os aspectos apresentados mostram que o cão tem como principal vantagem reproduzir as diversas fases da doença de Chagas, permitindo o monitoramento eletrocardiográfico e correlação com lesões do sistema excito-condutor do coração. Além disto, o cão tem sido muito utilizado pelos fisiologistas para o estudo eletrofisiológico do coração, o que permite uma sólida base para interpretação dos achados na doença de Chagas.

Como desvantagem, existe o fato de necessitar de um longo período de acompanhamento para que possa surpreender a fase crônica cardíaca, permanecendo os cães na fase indeterminada em alta percentagem dos casos.



59

60

Figura 57 – Miocardite difusa e focal em cão no 23º dia de infecção pelo *Trypanosoma cruzi*; presença de miócitos parasitados (setas); necrose focal de células miocárdicas com intenso infiltrado inflamatório; infiltrado intersticial mononuclear difuso – HE x 250

Figura 58 – Secções do miocárdio em cão cronicamente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*; miocardite crônica, observando-se septos fibrosos que dissociam as fibras cardíacas e difuso infiltrado mononuclear - Tricrômico de Masson x 100

Figura 59 – Secção do sistema excito-condutor do coração de um cão cronicamente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*, observando-se o feixe de His (FH) e sua bifurcação: RD (ramo direito) e RE (ramo esquerdo); infiltrado mononuclear difuso com dissociação das fibras por fino depósito colagênico, predominante no ramo direito - Tricrômico de Masson x 100

Figura 60 – Coração de cão cronicamente infectado: secção do sistema excito-condutor observando-se substituição dos miócitos no feixe de His por adipócitos e presença de infiltrado mononuclear difuso - Tricrômico de Masson x 100



9.7 Macaco

Maria da G3ria Bonecini-Almeida

V3rios animais t3m sido utilizados como modelos experimentais com o prop3sito de se obter um modelo que reproduza satisfatoriamente a doena de Chagas humana, como discutido por outros autores neste cap3tulo.

Evid3ncias acumuladas durante as 3ltimas d3cadas t3m indicado que primatas n3o humanos s3o modelos experimentais adequados para o estudo de aspectos imunopatog3nicos da doena de Chagas. Os g3neros *Callitrix*, *Saimiri*, *Cebus* e *Macaca* t3m sido estudados empregando-se diferentes cepas de *Trypanosoma cruzi*, formas evolutivas do parasito, bem como diversas vias de inocula3o.

Descreveremos brevemente alguns modelos experimentais em primatas n3o humanos, utilizados na tentativa de reprodu3o da doena de Chagas humana, e nos deteremos na descri3o minuciosa da infec3o em macacos rhesus (*Macaca mulatta*).

G3nero *Callitrix*

O g3nero *Callitrix* (*penicillata*) foi a primeira esp3cie de primatas n3o humanos utilizada como modelo experimental para a doena de Chagas, por Carlos Chagas em 1909. Estes animais desenvolveram satisfatoriamente a infec3o aguda, entre vinte e trinta dias ap3s o contato com triatom3neos infectados.

G3nero *Cebus*

Entre os primatas mais utilizados, at3 o momento, como modelo para a doena de Chagas humana, est3o os animais do g3nero *Cebus*, pela sua capacidade de reproduzirem as fases aguda e cr3nica da doena humana, al3m da facilidade de domestica3o e manuseio. Os primeiros trabalhos a utilizarem estes animais tinham por objetivo avaliar sua susceptibilidade 3 infec3o. Assim, Dorland (1943) demonstrou a presena de sinal de Romaa em animais infectados pela conjuntiva ocular por cepas de *T. cruzi* provenientes de isolados cl3nicos do Panam3, Venezuela e Estados Unidos (Texas e Calif3rnia), al3m da presena de miocardite discreta e difusa. Estudos posteriores realizados por Torres & Tavares (1958) n3o demonstraram um aumento progressivo nas les3es do mioc3rdio em animais submetidos a repetidas inocula3es por cepas de *T. cruzi* (Y, Nilma e Jovina).

Estudos comparativos foram realizados por Falasca et al. (1986), utilizando um 3nico in3culo ou repetidas inocula3es, com diferentes cepas do parasita – CA1, Colombiana e Tulahuen – (incluindo duas vias de inocula3o, conjuntiva e intraperitoneal, e diferentes cargas parasit3rias, 4×10^4 e 1×10^6), na tentativa de determinar a susceptibi-

lidade do macaco *Cebus* à infecção pelo *T. cruzi*. Estes autores determinaram assim que sete dos dez animais infectados pela cepa CA1 pela conjuntiva apresentaram parasitemia positiva e, independentemente da carga parasitária a que foram infectados, estes animais apresentaram alterações eletrocardiográficas (ECG) e dilatação do colo variáveis. Todos os animais infectados pelas cepas Colombiana e Tulahuen apresentaram parasitemia positiva, persistentes alterações de ECG, mas nenhum animal apresentou dilatação no colo. As alterações cardíacas e histopatológicas foram detectadas mais precocemente nos animais infectados pela cepa Colombiana.

O acompanhamento cinético da infecção chagásica em macacos *C. apella* foi realizado por Rosner et al. (1988) durante as 26 primeiras semanas de infecção, usando a cepa Y por via subcutânea. Estes autores notaram o aparecimento de sintomatologia compatível à fase aguda, como a presença de febre, perda de peso, parasitemia direta positiva, alterações eletrocardiográficas e radiológicas compatíveis com a doença humana. Contudo, nenhum animal apresentou chagoma de inoculação durante a fase aguda da infecção. A caracterização da miocardite crônica chagásica foi realizada após um período de doze e 48 meses de infecção, onde somente três animais apresentaram aumento cardíaco e a análise histopatológica mostrou uma miocardite difusa ou focal com infiltrado linfoplasmocítico (Rosner et al., 1989).

Gênero *Saimiri*

Estes pequenos primatas (*S. sciureus*) são encontrados infectados na natureza tanto por *Leishmania* como por *T. cruzi*. Na tentativa de caracterizar a evolução da infecção chagásica nestes animais, Pung et al. (1988a) os infectaram por via subcutânea utilizando formas tripomastigotas metacíclicas da cepa Brasil. O acompanhamento da fase aguda revelou a presença de parasitemia positiva, alterações prolongadas no eletrocardiograma, anticorpos específicos contra o *T. cruzi*, alterações hematológicas e resposta linfoproliferativa elevada contra antígenos do parasita. Pensando na possível interação na natureza entre o *T. cruzi* e *Leishmania b. braziliensis*, os mesmos autores (Pung et al., 1988b) estudaram o desenvolvimento da dupla infecção nestes animais. A prévia infecção pelo *T. cruzi* ou *L. b. braziliensis* não protege os animais contra a infecção heteróloga. Os animais desenvolveram quadro clínico semelhante à infecção primária.

Gênero *Macaca*

Quanto à sua homologia ao homem, o macaco rhesus (*Macaca mulatta*) está classificado na escala filogenética abaixo dos grandes primatas: gorilas, orangotangos e chimpanzés (de difícil utilização como modelo experimental, aquisição pelo alto custo financeiro e dificuldades no manuseio), e acima dos primatas do Novo Mundo (*Cebus*, *Saimiris* e *Callitrix*), como descrito por Martin & Leslie (1977), Finkelman & Scher (1979), Cossini et al. (1981), Neubauer et al. (1982) e Levitin et al. (1983). Por ser animal de médio porte, o que facilita seu manuseio, e por apresentar quadros clínicos que reproduzem as patologias humanas, o macaco rhesus tem sido considerado o modelo de escolha entre os primatas não humanos para se estudar diversas patologias como leishmaniose (Amaral et al., 1996) e HIV/Aids (Reimann et al., 1996; Dunn et al., 1996), o que facilita a extrapolação dos resultados obtidos nestes animais para moléstias humanas (Ostrow et al., 1990; Li et al., 1994).

Diversos autores têm estudado a infecção chagásica experimental em macacos rhesus. A fase aguda tem se mostrado semelhante à forma humana, relatando-se desenvolvimento de lesão de porta de entrada, parasitemia direta positiva, alterações hematológicas, sorologia específica positiva e alterações de ECG (Marsden et al., 1970, 1976; Seah, 1974; Miles et al., 1979).

Com os conhecimentos adquiridos pelo acompanhamento longitudinal da infecção em *C. apella* por Rosner et al. (1988), e pelo resultados obtidos pelos autores acima citados durante a fase aguda da infecção chagásica em macacos rhesus, nos propusemos a estudar a imunopatologia e a cinética da infecção chagásica experimental neste modelo. A proximidade filogenética aos seres humanos nos proporcionaria a utilização de reagentes contra antígenos celulares de superfície (CD4, CD8, CD14, CD19) (Reimann et al., 1994) e componentes da imunidade humoral, como frações do sistema complemento e anticorpos, para caracterizar as fases aguda e crônica da doença de Chagas humana.

A fase aguda em macacos rhesus tem se mostrado semelhante à forma humana, como mencionado anteriormente; assim, descreveremos brevemente os resultados obtidos por nós em macacos rhesus infectados subcutaneamente com formas tripomastigotas metacíclicas do *T. cruzi* (cepa Colombiana). A presença de chagomas de inoculação foi observada em nove dos treze animais infectados entre o terceiro e o 13º dia pós-infecção (p.i.). A lesão cutânea foi caracterizada como um eritema/pápula. Os linfonodos axilares estavam aumentados (palpáveis) em todos os animais infectados, sem a presença de hepatoesplenomegalia (Bonecini-Almeida et al., 1990). Análises histopatológicas demonstraram ectasia vascular, edema e infiltrado inflamatório histio-linfocitário difuso na derme papilar, enquanto que na derme reticular observou-se intenso infiltrado perivascular e perianexial com a presença de ninhos de amastigotas no músculo eretor do pêlo (Bonecini-Almeida et al., 1990). Fragmentos da lesão cutânea foram estudados por microscopia eletrônica de transmissão e observamos desorganização nas fibras de mielina e retração dos axônios nos nervos periféricos (Meirelles et al., 1990). Os monócitos/macrófagos presentes na lesão apresentavam grânulos de peroxidase, indicativo de ativação celular.

Nas primeiras cinco semanas pós-infecção os animais apresentavam-se apáticos, com perda de apetite e discreta perda de peso, sendo mais acentuada na terceira semana p.i. (em média 5,5 % de perda do peso corporal), retornando à normalidade a partir da nona semana p.i. A parasitemia direta foi detectada em todos os animais entre o 13º e o 22º dia p.i.; os níveis máximos de parasitemia foram detectados entre a quarta e a sétima semana, negatizando em todos os animais na décima semana p.i. Os parasitos foram isolados por hemocultura e/ou xenodiagnóstico por até quatro anos p.i., contudo em animais infectados com cepas isoladas de pacientes foi possível detectar parasitas circulantes por até vinte anos p.i. (dados não publicados, Dr. Francisco Laranja). Durante a fase aguda todos os animais apresentaram anemia caracterizada pela diminuição dos valores de hematimetria, hematócrito e hemoglobina entre a quinta e a sétima semana p.i., indicativa de anemia normocítica e normocrômica. Os números absolutos de leucócitos e linfócitos encontravam-se elevados ($p < 0,05$) entre a quinta e a 16ª semana p.i.

As alterações eletrocardiográficas e radiológicas foram caracterizadas como distúrbio de condução átrio-ventricular (7/9), anormalidade de repolarização da onda T (3/9), baixa voltagem de QRS (3/9) e bloqueio incompleto de ramo direito (2/9). Estes achados foram transitórios e desapareceram após a 20ª semana p.i. Na Figura 61, podemos verificar uma estreita correlação entre os picos de parasitemia direta e a presença das anomalias cardíacas nesses animais.

O esclarecimento dos mecanismos envolvidos na resposta imune ao *T. cruzi* tem sido a meta de investigação de diversos autores. Hoje, os resultados acumulados ao longo de várias décadas tornam evidente a participação de diferentes mecanismos, quer na defesa, ou na agressão, atuando direta ou indiretamente na interação parasito-hospedeiro. Anticorpos IgM anti *T. cruzi* atingiram níveis máximos na sétima semana p.i., e os anticorpos IgG na 12ª semana p.i. Estes últimos permaneceram presentes até o sexto ano de infecção, enquanto os anticorpos IgM já não eram mais detectáveis em quatro dos seis animais infectados na 28ª semana, como demonstrado na Figura 62. Observou-se uma elevação na concentração sérica de anticorpos IgG e IgM com níveis máximos atingidos entre a sexta e a oitava semana p.i., o que correspondeu a três vezes os valores observados nos animais controles não infectados (Figura 62). O desaparecimento de anticorpos específicos IgM e o aparecimento e persistência daqueles pertencentes à classe IgG é comportamento idêntico ao descrito na doença experimental e humana (Camargo & Amato Neto, 1974; WHO, 1974; Miles et al., 1979; Braun & Titto, 1985; Falasca et al., 1986). De modo interessante, também neste modelo experimental, altos níveis de anticorpos anti *T. cruzi* encontrados estão relacionados ao controle e diminuição do número de parasitas circulantes, como observado no modelo murino, sugerindo um papel protetor para estes

anticorpos (Krettl & Brener, 1982). Contudo, o aumento de IgM e IgG totais não é devido somente à síntese de anticorpos específicos para o *T. cruzi*, tendo sido detectados anticorpos antihemáceas de carneiro (heterólogos) e anti DNA (auto-anticorpos). Os primeiros mostraram não só cinética de produção similar à IgM total, como também revelaram sensibilidade ao tratamento pelo β -mercapto-etanol. Os auto-anticorpos, por sua vez, mostraram cinética que se assemelhou à de IgG total e, uma vez positivos, não se negativaram.

A detecção de anticorpos líticos no soro de animais infectados torna-se importante por ser considerada como evidência da persistência do parasito no organismo, constituindo evidência adicional da similaridade com a infecção humana (Krettl et al., 1979). Verificou-se durante a infecção experimental que todos os animais apresentavam anticorpos líticos detectáveis por períodos superiores a três anos de infecção. Um outro dado interessante foi observado durante o pico destes anticorpos (entre a quinta e a oitava semana), e a simultânea diminuição nos níveis de C3 e C4. Assim, parece bastante provável que os anticorpos líticos estejam colaborando com o consumo de complemento durante este período (Figura 63) e posterior eliminação da parasitemia circulante.

A acentuada leucocitose evidenciada, descrita também em seres humanos (Baruffa, 1975; Baruffa & Alcantara, 1983), correspondeu a aumento tanto de células B, T e monócitos (Figura 64); foram observados níveis máximos entre a quinta e a nona semanas p.i., coincidindo com outras alterações descritas anteriormente, como o aumento do número de parasitas circulantes, alterações no ECG e hipergamaimunoglobulinemia. O aumento no número absoluto de monócitos circulantes não apresentou associação significativa com qualquer outra alteração imunológica durante o curso da infecção chagásica nestes animais.

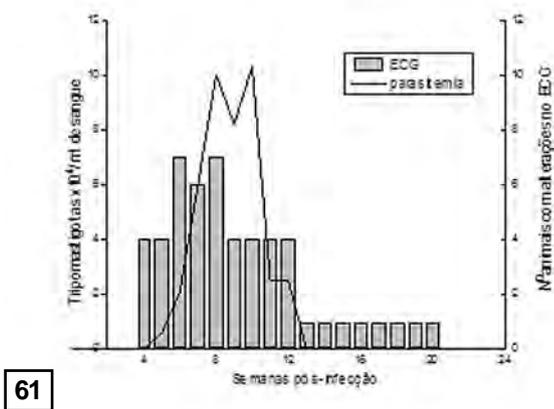
A linfocitose observada nestes animais foi devida tanto ao aumento do número de linfócitos T CD4⁺ quanto T CD8⁺, elevados até seis e onze vezes, respectivamente, em comparação aos animais não infectados, atingindo os valores máximos entre a segunda e a oitava semana p.i. (Figura 65). Associado à hipergamaimunoglobulinemia e ao aumento do número total de leucócitos, o aumento do número de células CD4⁺ e CD8⁺ em sangue periférico de animais infectados pode ser considerado como evidência da existência de ativação policlonal de células B e T neste modelo experimental como demonstrado no modelo murino (Minoprio et al., 1986) e mais recentemente na doença de Chagas humana (Grauert et al., 1993). O aumento das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ acompanhou o aumento e o pico de parasitemia circulante em animais sacrificados neste período. Foi possível observar a presença de maciço infiltrado mononuclear nas fibras cardíacas e a presença de numerosos ninhos de amastigotas, como descrito na fase aguda da doença de Chagas humana.

A capacidade dos linfócitos T periféricos de macacos rhesus infectados responderem *in vitro* a antígenos do *T. cruzi* foi demonstrada como sendo similar aos estudos realizados por Cetron et al. (1993). Observamos uma intensa imunossupressão tanto aos antígenos específicos como na resposta inespecífica à PHA, como pode ser observado na Figura 66.

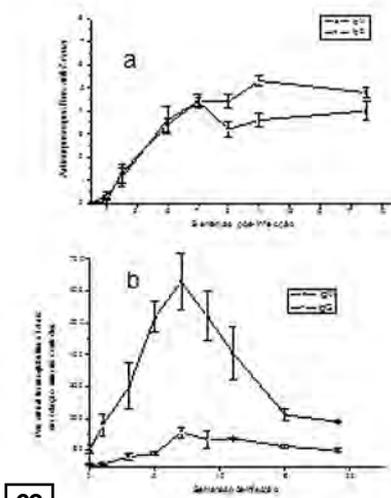
A imunidade mediada por células na infecção chagásica experimental está relacionada à ativação de linfócitos T CD4⁺ (Younes-Chennoufi et al., 1988), embora alguns autores citem a participação de células T CD8⁺ na lesão cardíaca experimental (Tartelon, 1991) e humana (Reis et al., 1993).

Podemos então, concluir que primatas não humanos são susceptíveis à infecção pelo *T. cruzi* e desenvolvem a doença diferentemente, dependendo da cepa do parasito, inóculo e via de inoculação a que foram submetidos durante a experimentação. Contudo, apresentam grande reprodutividade em relação ao desenvolvimento de alterações eletrocardiográficas e radiológicas, parasitemia patente, alterações hematológicas com anemia normocítica e normocrômica e leucocitose, alterações histopatológicas decorrente da presença do parasito em fibras cardíacas e finalmente imunossupressão. Assim, os primatas não humanos e em especial os macacos rhesus, devido à sua proximidade filogenética ao homem, poderão nos auxiliar a entender os mecanismos imunopatogênicos ocorridos durante a evolução da doença de Chagas humana, tanto na fase aguda como na fase crônica da infecção.

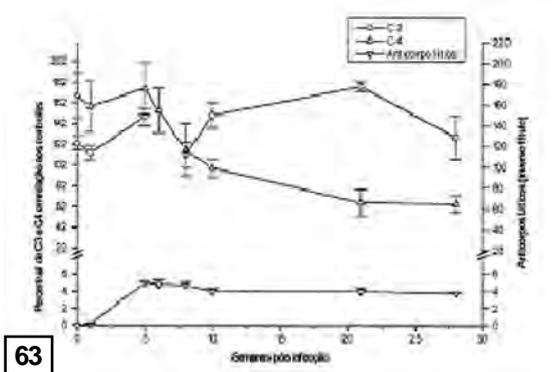
Agradecimentos – A Dra. Joseli Lannes Vieira pela revisão e discussão no preparo deste manuscrito.



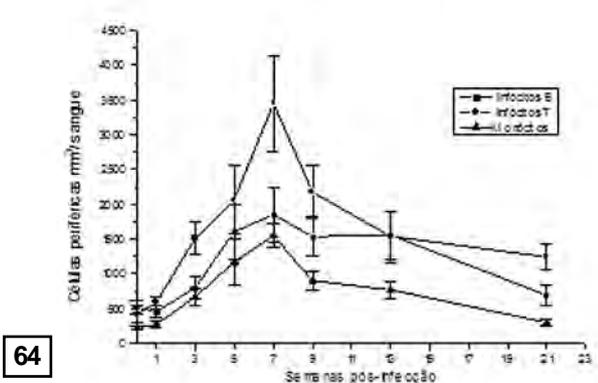
61



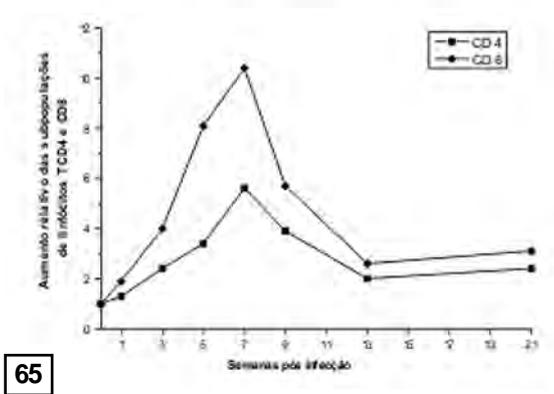
62



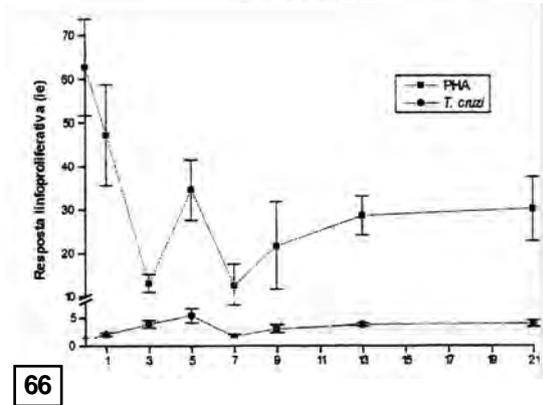
63



64



65



66

Figura 61 – Acompanhamento dos níveis de parasitemia direta (linha) e alterações eletrocardiográficas (barras) durante o curso da infecção chagásica aguda em macacos rhesus infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*
Figura 62 – Acompanhamento dos níveis anticorpos IgM e IgG anti *Trypanosoma cruzi* (A) e totais (B) durante o curso da infecção chagásica aguda em macacos rhesus infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*
Figura 63 – Acompanhamento dos níveis de anticorpos líticos e frações do complemento (C3 e C4) durante o curso da infecção chagásica aguda em macacos rhesus infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*
Figura 64 – Acompanhamento do número de linfócitos T, B e monócitos circulantes durante o curso da infecção chagásica aguda em macacos rhesus infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*
Figura 65 – Acompanhamento do número de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ circulantes durante o curso da infecção chagásica aguda em macacos rhesus infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*
Figura 66 – Acompanhamento da resposta linfoproliferativa perante antígenos do *Trypanosoma cruzi* e mitógeno durante o curso da infecção chagásica aguda em macacos rhesus infectados pela cepa Colombiana do *Trypanosoma cruzi*

Referências Bibliográficas

- ABELMAN, W. H. Experimental infection with *Trypanosoma cruzi* (Chagas' disease): A model of acute and chronic myocardiopathy. *Annals New York Academy of Sciences*, 166:137-153, 1969.
- ABRAHAMSOHN, I. A. & COFFMAN, R. L. *T. cruzi*: IL-10, TNF, IFN- γ e IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. *Experimental Parasitology*, 84:231-239, 1996.
- AGOSIN, M. & BADINEZ, O. Algunas de las características de la infección experimental en conejos. *Boletín de Informaciones Parasitológicas Chilena*, 4: 6-7, 1949.
- ALCÂNTARA, F. G. Sistema neuro-vegetativo do coração na moléstia de Chagas experimental. *Revista Goiana de Medicina* 7:111-126, 1961.
- ALCÂNTARA, F. G. Moléstia de Chagas experimental (manifestações viscerais). *O Hospital*, 66:625-633, 1964.
- ALCÂNTARA, F. G. & OLIVEIRA, J. A. M. Fase crônica da moléstia de Chagas em rato Wistar. Pesquisas quantitativas dos neurônios no plexo de Meissner. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6:204-206, 1964.
- AMARAL, V. F.; RANSATTO, V. A. O.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MOLINARO, E.; FERREIRA, F.; COUTINHO, S. G.; MCMAHON-PRATT, D. & GRIMALDI, G. *Leishmania amazonensis*: The Asian rhesus macaques (*Macaca mulatta*) as an experimental model for study of cutaneous leishmaniasis. *Experimental Parasitology*, 82:34-44, 1996.
- AMORIM, D. S.; MELO DE OLIVEIRA, J. A.; MANÇO, J. C.; GALLO JR., L. & OLIVEIRA, J. S. M. Chagas' heart disease: First demonstrable correlation between neuronal degeneration and autonomic impairment. *Acta Cardiologica*, 28:431-437, 1973.
- ANDRADE, L. O.; MACHADO, C. R.; CHIARI, E., PENA, S. D. & MACEDO, A. M. Differential tissue distribution of diverse clones of *Trypanosoma cruzi* in infected mice. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 100:163-172, 1999.
- ANDRADE, S. G. & SADIGURSKY, M. The conduction system of the heart in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*: histopathological lesions and electrocardiographic correlations. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82:59-66, 1987.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, V.; BRODSKYN, C.; MAGALHÃES, J. B. & BARRAL-NETO, M. Immunological response of Swiss mice to infection with different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 79: 397-407, 1985a.
- ANDRADE, S. G.; ANDRADE, Z. A. & SADIGURSKY, M. Combined treatment with a nitrofuranic and a corticoid in experimental Chagas' disease in the dog. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 29:773, 1980.
- ANDRADE, S. G.; CARVALHO, M. L.; FIGUEIRA, R. M. & ANDRADE, Z. A. Recuperação e caracterização dos tripanosomas inoculados em animais imunes. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 12:395-399, 1970.
- ANDRADE, S. G.; KLOETZEL, J. K.; BORGES, M. M. & FERRANS, V. J. Morphological aspects of the myocarditis and myositis in *C. callosus callosus* experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*: Fibrogenesis and spontaneous regression of fibrosis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 379-393, 1994.
- ANDRADE, S. G.; STOCKER-GUERRET, S.; PIMENTEL, A. S. & GRIMAUD, J. A. Reversibility of cardiac fibrosis in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*, under specific chemotherapy. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 86:187-200, 1991.
- ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M. & ANDRADE, S. G. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 18: 499-506, 1985b.
- ANDRADE, Z. A. The canine model of Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79 (Suppl.):77-83, 1984.
- ANDRADE, Z. A. & ROCHA SILVA, H. R. Parasitism of adipocytes by *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90:521-522, 1996.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; CORREA, R. & SADIGURSKY, M. Myocardial changes in acute *Trypanosoma cruzi* infection. Ultrastructural evidence of immune damage and the role of microangiopathy. *American Journal of Pathology*, 144:1403-1411, 1994.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G. & SADIGURSKY, M. Enhancement of chronic *Trypanosoma cruzi* myocarditis in dogs treated with low doses of cyclophosphamide. *American Journal of Pathology*, 127:467-473, 1987.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M. & MAGUIRE, J. H. Experimental Chagas' disease in dogs: A pathologic and ECG study of the chronic indeterminate phase of the infection. *Archives Pathology Laboratory Med*, 105:450-464, 1981.
- ANDRADE, Z. A.; ANDRADE, S. G.; SADIGURSKY, M. WENTHOLD, J. R.; HILBERT, S. L. & FERRANS, V. J. The indeterminate phase of Chagas' disease. Ultrastructural characterization of cardiac changes in the canine model. *American*

Journal of Pathology, 57:328-336, 1996.

- ANTUNEZ, M. I.; FEINSTEIN, R. E.; CARDONI, R. L. & GRONVIK, K. O. *Trypanosoma cruzi*: T cell populations in the Peyer's patches of BALB/C infected mice. *Experimental Parasitology*, 87:58-64, 1997.
- ARAÚJO, S. M. & CHIARI, E. Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83:175-181, 1989.
- ARAÚJO-JORGE, T. C.; LAGE, M. J. F.; RIVERA, M.; T.; CARLIER, Y. & VAN LEUVEN, F. *Trypanosoma cruzi*: Enhanced a-macroglobulin levels correlate to resistance of Balb/CJ mice to acute infection. *Parasitology Research*, 78:215-221, 1992.
- BARUFFA, G. *Diagnóstico da doença de Chagas*. 1975. Porto Alegre: AMRIGS, p. 127-137.
- BARUFFA, G. & ALCANTARA FILHO, A. Forma aguda da doença de Chagas no Rio Grande do Sul. Aspectos laboratoriais. *Revista Goiana de Medicina*, 29:9-15, 1983.
- BERALDO, P. S. S. *Sobre a infecção chagásica experimental no rato: estudo eletrocardiográfico seriado e funcional autonômico do coração, correlacionado à histopatologia*. 1987. Tese de Mestrado, Brasília: Universidade de Brasília.
- BESTETTI, R. B.; SOARES, E. G.; SALES-NETO, V. N.; ARAUJO, R. C. & OLIVEIRA, J. S. M. The resting electrocardiogram of *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 29:224-229, 1987.
- BONECINI-ALMEIDA, M. G.; GALVÃO-CASTRO, B.; PESSOA, M. H. R.; PIRMEZ, C. & LARANJA, F. Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. I - Clinical, parasitological, hematological and anatomo-pathological studies in the acute and indeterminate phase of the disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:163-171, 1990.
- BORGES, M. M.; ANDRADE, S. G.; PILATTI, C. G.; PRADO JR. J. C. & KLOETZEL, J. K. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus callosus* and Swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87:493-502, 1992.
- BORGES, M. M.; MELLO, D. A. & TEIXEIRA, M. L. Infecção experimental do *Calomys callosus* Rodentia Cricetidae com *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 16:233-242, 1982.
- BORGES, M. M.; VASSAO, R.; ANDRADE, S. G.; PEREIRA, C. A. & KLOETZEL, J. K. Interferon- γ levels during the course of *Trypanosoma cruzi* infection of *Calomys callosus callosus* Rodentia Cricetidae and Swiss mice. *Parasitology Research*, 81:498-504, 1995.
- BRAND, T.; TOBIE, E. J.; KISSLING, R. E. & ADAMS, G. Physiological and pathological observations on four strains of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Infectious Diseases*, 85:5-16, 1949.
- BRAUN, M. & TITTO, E. Respuesta inmune al *Trypanosoma cruzi*. Un enfoque de patogenia en la enfermedad de Chagas. *Acta Physiologica Pharmacologica Latinoamericana*, 35:1-47, 1985.
- BRENER, Z. Life cycle of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 13:171-178, 1971.
- CABEZA-MECKERT, P. & LAGUENS, R. Modelos experimentales. In: *Enfermedad de Chagas*. 1994. Buenos Aires: Doyma, Cap. 9, p. 129-140.
- CABEZA-MECKERT, P. M. & LAGUENS, R. P. Enfermedad congénita a la infección crónica del ratón con *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de la enfermedad de Chagas congénita. *Medicina (Buenos Aires)*, 40:40-45, 1980.
- CAMARGO, M. E. & AMATO-NETO, V. *Trypanosoma cruzi* IgM antibodies as serological evidence of recent infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 16:200-202, 1974.
- CARDONI, R. L.; RIMOLDI, M. T.; ESTEVA, M. & BRACCO, M. M. E. Humoral antibody response in BALB/C and Swiss mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*, 46:435-439, 1986.
- CARIOLA, J.; PRADO, R.; AGOSIN, M. & CHRISTEN, R. Susceptibilidad del hamster *Crycetetus auratus*, *Peromyscus Peromyscus maniculatus gambeli*, a la infección experimental por *Trypanosoma cruzi*, cepa Tulahuén. *Boletín de Informaciones Parasitológicas Chilena*, V:44-45, 1950.
- CARLIER, Y.; RIVERA, M. T.; TRUYENS, C.; GOLDMAN, M.; LAMBERT, P.; FLAMENT, J.; BAUWENS, D. & VRAY, B. Pregnancy and humoral immune response in mice chronically infected by *Trypanosoma cruzi*. *Infection & Immunity*, 55:2496-2501, 1987.
- CERISOLA, J. A. Chemotherapy of Chagas' disease infection in man. *PAHO Scientific Publication*, 347:34-47, 1977.
- CETRON, M. S.; BASILIO, F. P.; MORAES, A. P.; SOUSA, A. Q.; PAES, J. N.; KAHN, S.; WENER, M. & VOORHIS, V. Humoral and cellular immune response of adults from northeastern Brazil with chronic *Trypanosoma cruzi* infection: Depressed cellular immune response to *Trypanosoma cruzi* antigen among Chagas' disease patients with symptomatic versus indeterminate infection. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 49:370-382, 1993.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomiase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n.gen., n.sp.,

- agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1909.
- CHAGAS, C. Descoberta do *Trypanosoma cruzi* e verificação da tripanozomíase americana. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 15:67-76, 1922.
- CHAPADEIRO, E.; BERALDO, P. S. S.; JESUS, P. C.; OLIVEIRA JR., W. P. & JUNQUEIRA JR., L. F. Lesões cardíacas em ratos Wistar inoculadas com diferentes cepas do *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 21:95-103, 1988.
- CHAPADEIRO, E.; FLORÊNCIO, R. F. C.; AFONSO, P. C.; BERALDO, P. S. S.; JESUS, P. C. & JUNQUEIRA JR., L. F. Neuronal counting and parasympathetic dysfunction in the hearts of chronically *Trypanosoma cruzi*-infected rats. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 35:337-341, 1991.
- CHIARI, E.; TAFURI, W. L.; BAMBIRRA, E. A.; REZENDE, M. M.; RIBEIRO, T. D.; CASTRO, L. P.; SALGADO, J. A. & AMARAL DE PÁDUA, R. A. The rabbit as a laboratory animal for studies on chagasic disease. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22:207-208, 1980.
- CONTRERAS, V. T.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; BONALDO, M. C.; THOMAZ, N.; BARBOSA, H. S.; MEIRELLES, M. N. L. & GOLDENBERG, S. Biological aspects of the Dm28c clone of *Trypanosoma cruzi* after metacyclogenesis in chemically defined media. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 83:123-133, 1988.
- COSSINI, A. B.; BURTON, R. C.; KUNG, P. C.; COLVIN, R.; GOLDSTEIN, G.; LIFTER, J.; RHODES, W. & RUSSEL, P. S. Evaluation in primate renal allograft recipients of monoclonal antibody to human T-cell subclasses. *Transplantation Proceedings*, XIII:499-503, 1981.
- CULBERTSON, H. O. J. & KESSLER, W. R. Age resistance of mice to *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology*, 28:155-158, 1942.
- DALMASSO A. P. & JARVINEN J. A. Experimental Chagas' disease in complement-deficient mice and guinea pigs. *Infection & Immunity*, 28:434-440, 1980.
- DE TITTO, E. Bases genéticas. In: *Enfermidade de Chagas*. 1994. Buenos Aires: Doyma. Cap. 6, p. 75-86.
- DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 27:1-110, 1934.
- DIEGO, J. A.; PALAU, M. T.; GAMALLO, C. & PENIN, P. Are genotypes of *Trypanosoma cruzi* involved in the challenge of chagasic cardiomyopathy? *Parasitology Research* 84:147-152, 1998.
- D'IMPERIO-LIMA, M. R.; EISEN, H.; MINOPRIO, P.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Persistence of polyclonal B cell activation with undetectable parasitemia in late stages of experimental Chagas' disease. *Journal of Immunology*, 137:353-356, 1986.
- DORLAND, J. D. Infection in monkeys with strains of *Trypanosoma cruzi* isolated in United States. *US Public Health Report*, 58:1006-1010, 1943.
- DUNN, C. S.; BEYER, C. & AUBERTIN, A. M. High viral load and CD4 lymphopenia in rhesus and cynomolgus macaques infected by a chimeric primate lentivirus constructed using the env, rev, tat, and vpu genes from HIV-1 Lai. *Virology*, 223:351-361, 1996.
- EKSI, S.; WASSOM, D. L. & POWELL, M. R. Host genetics and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice: profiles and compartmentalization of IL-2, -4, -5, -10, and IFN- γ -producing cells. *Journal of Parasitology*, 82:59-65, 1996.
- FALASCA, A.; GRANA, D.; BUCCOLO, J.; GILLI, M.; MERLO, A.; ZOPPI, J. & MARESO, E. Susceptibility of *Cebus apella* monkey to different strains of *Trypanosoma cruzi* after single or repeated inoculations. *PAHO Bulletin*, 20: 117-237, 1986.
- FEDERICI, E. E.; ABELMAN, W. H. & NEVA, F. A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C3H mice infected with *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 13:272-280, 1964.
- FERRAZ DE CARVALHO, C. A.; MAIFRINO, L. B. M.; BORGES, N.; MARTINS, Z. O. & DE SOUZA, R. R. Comparative study on cardiac ganglia of chronic chagasic *C. callosus* and mice. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88 (Suppl.): 108, 1993.
- FIGUEIREDO, F. *Infeção experimental de coelhos com Trypanosoma cruzi: Aspectos de parasitologia, imunologia e patologia*. 1984. Tese de Mestrado. Ribeirão Preto: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo.
- FIGUEIREDO, F.; MACEDO, V. & TEIXEIRA, A. R. L. Experimental model for chronic Chagas' disease, 1979. *Anais do International Congress on Chagas' disease*, Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, p. 18.
- FINKELMAN, F. D. & SCHER, I. Rhesus monkeys B lymphocyte surface immunoglobulin: analysis with a fluorescence-activated cell sorter. *Journal of Immunology*, 122:1757-1762, 1979.
- GOMEZ L. E.; NASSER J. R. & BASOMBRIO M. A. Complete immunization against *Trypanosoma cruzi* verified in individual mice by complement-mediated lysis. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:55-61, 1996.
- GONÇALVES DA COSTA, S. C.; LAGRANGE, P. H.; HURTREL, B.; KERR, I. & ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of experimental Chagas' disease. I. Histopathological studies. *Annales d'Immunologie (Inst. Pasteur)*, 135:317-332, 1984.

- GONZÁLES-CAPPA, S. M.; KATZIN, A. M.; AÑASCO, N. & LAJMANOVICH, S. Comparative studies on infectivity and surface carbohydrates of several strains of *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*, 41:549-552, 1981.
- GRAUERT, M. R.; HOUDAYER, M. & HONTEBEYRIE-JOSKOWCIZ, M. *Trypanosoma cruzi* infection enhances polyreactive antibody response in an acute case of human Chagas' disease. *Clinical and Experimental Immunology*, 93:85-92, 1993.
- GUTTERIDGE, W. E.; COVER, B. & DVABORAK, M. A. Jax inbred mice in chemotherapeutic investigations of experimental Chagas' disease. *Annals of Tropical Medicine and Parasitology*, 72:329-335, 1978.
- HANSON, W. L. Immune response and mechanisms of resistance in *Trypanosoma cruzi*. *PAHO Scientific Publication*, 347:22-34, 1977.
- HAUSCHKA, T. S. Sex of host as a factor in Chagas' disease. *Journal of Parasitology*, 33:399-405, 1947.
- HAYES, M. M. & KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' disease: Kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *T. cruzi* infection. *Infection & Immunity*, 31:1117-1124, 1981.
- HENRIQUES-PONS, A.; CORREA A. F. S.; BATISTA M. M.; MARQUES C. S.; COTTA-DE-ALMEIDA V.; PERSECHINI P. M.; BISAGGIO R. C.; LIU, C. C.; COUTINHO, C. M. L. M. & ARAÚJO-JORGE T. C. Perforin knock-out mice infected with a highly virulent strain of *Trypanosoma cruzi* have normal patterns of parasitaemia but higher mortality rates and myocarditis. 1998. New Delhi: *Proc. 10th Int. Cong. Immunology*, p. 1007-1010.
- HOFT, D. F. Differential mucosal infectivity of different life stages of *Trypanosoma cruzi*. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 55:360-364, 1996.
- HOFT, D. F.; FARRAR, P. L.; KRATZ-OWENS, K. & SHAFFER, D. Gastric invasion by *Trypanosoma cruzi* and induction of protective mucosal immune responses. *Infection & Immunity*, 64:3800-3810, 1996.
- HOLSCHER, C.; KOHLER, G.; MULLER, U.; MOSSMANN, H.; SCHAUB, G. A. & BROMBACHER, F. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. *Infection & Immunity*, 66:1208-1215, 1998.
- HUDSON, L. Immunological consequences of infection and vaccination in South American trypanosomiasis. *Phil. Transaction Royal Society of London*, 307:51-54, 1984.
- HUNTER, C. A.; ELLIS-NEYES, L. A.; SLIFER, T.; KANALY, S.; GRUNIG, G.; FORT, M.; RENNICK, D. & ARAUJO, F. IL-10 is required to prevent immune hyperactivity during infection with *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Immunology*, 158:3311-3319, 1997.
- JOHNSON, P.; NEAL, R. A. & GALL, D. Protective effect of killed trypanosoma vaccine with incorporated adjuvant. *Nature*, 200:83-85, 1963.
- JUNQUEIRA JR, L. F. Modelos experimentais da doença de Chagas: Considerações críticas, dados obtidos e contribuições. O modelo representado pelo rato. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24 (Supl. 1):53-54, 1991.
- JUNQUEIRA JR, L. F.; BERALDO, P. S. S.; CHAPADEIRO, E. & JESUS, P. C. Cardiac autonomic dysfunction and neuroganglionitis in a rat model of chronic Chagas disease. *Cardiovascular Research* 26: 324-329, 1992.
- JURI, M. A.; FERREIRA, A.; RAMOS, A. & HOECKER, G. Non-lytic antibodies in H-2 controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi*. *Brazilian Journal of Medical Biology*, 23:685-695, 1990.
- KATZIN, A. M.; BRONZINA, A.; CASANOVA, M.; COSSIO, P. M.; SEGURA, E. L.; ARANA, R. M.; DEL PRADO, C. E. & GONZALEZ-CAPPA, S. M. Infección experimental del conejo con *Trypanosoma cruzi*. I. Estudios parasitológicos y serológicos. *Medicina (Buenos Aires)*, 37:507-508, 1977.
- KIERSZENBAUM, F. & BUDZKO, D. B. *Trypanosoma cruzi*: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in the absence of suppressor T cells. *Parasite Immunology*, 4:441-451, 1982.
- KIERSZENBAUM, F. & HOWARD, J. G. Mechanism of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: The importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *Journal of Immunology*, 116:1208-1215, 1976.
- KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living tripomastigote antibodies. *Journal of Immunology*, 128:2009-2012, 1982.
- KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARRINGTON, R. S. & NUSSENZWEIG, R. S. Membrane bound antibodies of bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. *Clinical Experimental Immunology*, 37:416-423, 1979.
- LAGUENS, R. P.; CABEZA-MECKERT, P. M. & GELPI, R. Chronic Chagas' disease in the mouse: I Electrocardiographic and morphological patterns of the cardiopathy. *Medicina (Buenos Aires)*, 41:35-38, 1981.

- LAGUENS, R. P.; CABEZA-MECKERT, P. M.; BASOMBRIÓ, M. A.; CHAMBÓ, J. G.; COSSIO, P. M.; ARANA, R. M. & GELPI, R. Infección crónica del ratón com *Trypanosoma cruzi*. Modelo experimental de doença de Chagas. *Medicina (Buenos Aires)*, 40:33-40, 1980.
- LANA, M.; CHIARI, E. & TAFURI, W. L. Experimental Chagas' disease in dogs. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 87:59-71, 1992.
- LARANJA, F. S. & ANDRADE, Z. A. Forma crônica da doença de Chagas no cão. *Arquivos Brasileiros de Cardiologia*, 35:377-380, 1980.
- LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; LIMA, M. T. & GATASS, C. R. *Trypanosoma cruzi*: Pan infectivity of CL strain during murine acute infection. *Experimental Parasitology*, 84:16-27, 1996.
- LEVTIN, N. L.; KING, N. W.; REINHERZ, E. L.; HUNT, R. D.; LANE, H. & SCHLOSSMAN, S. F. T lymphocyte surface antigens in primates. *European Journal of Immunology*, 13:345-347, 1983.
- LI, K.; NAGALLA, S. R. & SPINDEL, E. R. A rhesus monkey model to characterize the role of gastrin-releasing peptide (GRP) in lung development. Evidence for stimulation of airway growth. *Journal of Clinical Investigation*, 94:1605-1615, 1994.
- LIMA, M. T., LENZI, H. L. & GATASS, C. R. Negative tissue parasitism in mice injected with a non infective clone of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 81:6-12, 1991.
- LOPES, M. F.; CUNHA, J. M. T.; BEZERRA, F. L.; GONZALEZ, M. S.; GOMES, J. E. L.; SILVA, J. R. L.; GARCIA, E. S. & DOS REIS, G. A. Both chemically induced and triatomine-derived, metacyclic trypomastigotes cause the same immunological disturbances in the infected mammalian host. *Experimental Parasitology*, 80:194-204, 1995.
- LOPES, M. F.; NUNES, M. P.; HENRIQUES-PONS, A.; GIESE, N.; MORSE III, H. C.; DAVIDSON, W. F.; ARAÚJO-JORGE, T. C. & DOS REIS, G. Increased susceptibility of Fas ligand-deficient *gld* mice to *Trypanosoma cruzi* infection due to a Th2-biased host immune response. *European Journal of Immunology*, 29:81-89, 1999.
- LUZ, M. R. P.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Heterogeneity on the plasma levels of two acute phase proteins in mice from inbred strains during *Trypanosoma cruzi*-infection. *Parasitology Research*, 80:439-441, 1994.
- LUZ, M. R. M. P.; VAN LEUVEN, F. & ARAÚJO-JORGE, T. C. Heterogeneity on the synthesis of α -macroglobulins in outbred Swiss albino mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Research*, 81:662-667, 1995.
- MAGALHÃES J. B. & ANDRADE S. G. Investigation on the possibility of spontaneous cure of mice infected with different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 36:481-484, 1994.
- MARINHO, C. R.; D'IMPERIO LIMA, M. R.; GRISOTTO, M. G. & ALVAREZ, J. M. Influence of acute-phase parasite load on pathology, parasitism, and activation of the immune system at the late chronic phase of Chagas' disease. *Infection & Immunity*, 67:308-318, 1999.
- MARSDEN, P. D.; SEAH, S. K. K.; DRAPER, C. C.; PETTTTT, L. E.; MILES, M. A. & VOLLER, A. Experimental *Trypanosoma cruzi* infections in rhesus monkeys. II. The early chronic phase. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 70:247-251, 1976.
- MARSDEN, P. D.; VOLLER, A.; SEAH, S. K. K.; HAWKEY, C. & GREEN, D. Behavior of a Peru strain of *Trypanosoma cruzi* in rhesus monkeys. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 4:178-182, 1970.
- MARTIN, L. N. & LESLIE, G. A. Lymphocyte surface IgD and IgM in *Macaca* monkeys: Ontogeny, tissue distribution and occurrence on individual lymphocytes. *Immunology*, 33:865-872, 1977.
- MCCABE, R. E.; MEAGHER, S. & MULLINS, B. *Trypanosoma cruzi*: Explant organ cultures from mice with chronic Chagas' disease. *Experimental Parasitology*, 68: 462-467, 1989.
- MCCORMICK, T. S. & ROWLAND, E. C. *Trypanosoma cruzi*: Cross-reactive anti-heart autoantibodies produced during infection in mice. *Experimental Parasitology*, 69:393-401, 1989.
- MEIRELLES, M. N. L.; BONECINI-ALMEIDA, M. G.; PESSOA, M. H. R. & GALVÃO-CASTRO, B. *Trypanosoma cruzi*: Experimental Chagas' disease in rhesus monkeys. II. Ultrastructural and cytochemical studies of peroxidase and acid phosphatase activities. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 85:173-181, 1990.
- MELLO, D. A. *C. callosus callosus*, Renger, 1930 Rodentia-Cricetidae: Sua caracterização, distribuição, biologia, criação e manejo de uma cepa em laboratório. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76:611-69, 1984.
- MELLO, D. A. & BORGES, M. M. Primeiro encontro do *Triatoma costalimai* naturalmente infectado pelo *Trypanosoma cruzi*: Estudo de aspectos biológicos da amostra isolada. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 76:61-69, 1981.
- MELLO, D. A. & TEIXEIRA, M. L. Nota sobre a infecção natural do *C. callosus expulsus* Lund, 1841, Cricetidae-Rodentia, pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 11:561-564, 1977.
- MELLO, D. A.; VALIIN, E. & TEIXEIRA, M. L. Alguns aspectos do comportamento de cepas silvestres do *Trypanosoma cruzi* em camundongos e *Calomys callosus callosus* Rodentia. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 13:314-332, 1979.
- MELO, R. C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *Journal of Parasitology*, 64:475-482, 1978.

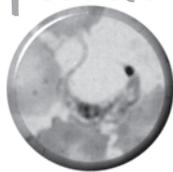
- MILEI, J.; MORALES, M. C.; BOLOMO, N. J.; BASOMBRIO, M. A. & COSSIO, P. M. Electrocardiographic and pathological correlation in chronic chagasic myocardialopathy in mice. *Medicina (Buenos Aires)*, 44:483-486, 1984.
- MILEI, J.; STORINO, R. A.; BEIGELMAN, R.; GRANA, D. & BASOMBRIO, M. A. Morphometry of skeletal muscle involvement in mice infected or preimmunized with live attenuated *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*, 51(6):529-532, 1991.
- MILES, M. A.; MARSDEN, P. D.; PETTI, L. E.; DRAPER, C. C.; WATSON, S.; SEACH, S. K. K.; HUTT, M. S. R. & FOWLER, J. M. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys. III. Electrocardiographic and histopathological findings. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 73:528-532, 1979.
- MINOPRIO, P.; BANDEIRA, A.; PEREIRA, P.; MOTA-SANTOS, T. A. & COUTINHO, A. Preferential expansion of Ly1-B and CD4⁺ CD8⁻ T cells in the polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. *International Immunology*, 1:176-184, 1989.
- MINOPRIO, P.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERT, B.; ANDRADE L.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ M. & COUTINHO, A. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lacks parasite specificity. *Scandinavian Journal of Immunology* 28:553-561, 1988.
- MINOPRIO, P.; COUTINHO, A.; SPINELLA, S. & HOSTEBERYE-JOSKOWICZ, M. Xid immunodeficiency imparts increased parasite clearance and resistance to pathology in experimental Chagas' disease. *International Immunology*, 3:427-436, 1991.
- MINOPRIO, P.; CURY-EL-CHEIKH, M.; MURPHY, E.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M.; COFFMAN, R.; COUTINHO, A. & O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- γ -dependent. *Journal of Immunology*, 151:4200-4208, 1993.
- MINOPRIO, P.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO-LIMA, M. R.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T and B cell responses. *Scandinavian Journal of Immunology*, 24:661-668, 1986.
- MINOPRIO, P.; ITOHARA, S.; HEISSER, C.; TONEGAWA, S. & COUTINHO, A. Immunobiology of murine *Trypanosoma cruzi* infection: The predominance of parasite-non-specific responses and the activation of TcR1 T cells. *Immunology Reviews*, 112:183-207, 1989.
- MOLINA, H. A.; MILEI, J.; RIMOLDI, M. T.; GONZÁLEZ-CAPPA, S. M. & STORINO, R. A. Histopathology of the heart conducting system in experimental Chagas disease in the mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 82:241-245, 1988.
- MORALES, M. C.; CARDONI, R. L.; RIMOLDI, M. T.; ESTEVA, M. & MILEI, J. Heart damage comparing three strains of mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*. *Medicina (Buenos Aires)*, 47:493-496, 1987.
- MOREIRA-SILVA, A.; RAMÍREZ, L. E.; VARGAS, M.; CHAPADEIRO, E. & BRENER, Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas' disease. II. Histopathological studies of the heart, digestive tract and skeletal muscle. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 91:199-202, 1996.
- NEUBAUER, R. H.; MARXHALONIS, J. J.; STRAND, B. C. & RABIN, H. Surface markers of B and T lymphoid cell lines identified by antibodies to human and simian lymphocyte antigen. *Journal of Immunogenetics*, 9:209-211, 1982.
- NICKELL, S. P.; HOFF, R. & BOYER, M. H. Susceptibility to acute *Trypanosoma cruzi* infection in autoimmune strains of mice. *Parasite Immunology*, 7:377-386, 1985.
- OSSIMANI, J. J. & GURRI, J. Infección experimental del hamster dorado *Mesocricetus auratus*. con algunas cepas uruguayas de *Trypanosoma cruzi*. *Archivos de la Sociedad Biología de Montevideo*, XVIII:73-78, 1954.
- OSTROW R. S.; MCGLENNEN R. C.; SHAVER, M. K. & FARAS, A. J. A rhesus monkey model for sexual transmission of a papillomavirus isolated from a squamous cell carcinoma. *Proceedings of the National Academy of Science (USA)*, 87:8170-8174, 1990.
- PACKCHANIAN, A. & ROBINSON, A. Electrocardiographic studies in experimental Chagas' disease in mice (*Mus musculus*). *Texas Reproductive Biological Medicine*, 16:363-379, 1958.
- PAKIANATHAN, D. R. & KUHN, R. E. *Trypanosoma cruzi* affects nitric oxide production by murine peritoneal macrophages. *Journal of Parasitology*, 80: 432-437, 1994.
- PIZZI, T.; AGOSÍN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. & NEGhme, A. Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de la laucha a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biologica*, 8-11:43-53, 1948.
- PIZZI, T.; RUBIO, M. D. & KNIERIN, F. T. Contribución al conocimiento de los mecanismos inmunitarios en la enfermedad de Chagas experimental de la rata. *Boletín Informaciones Parasitarias Chilenas*, 8:66-72, 1953.
- POSTAN, M.; BAILEY, J. J.; DVORAK, J. A.; MCDANIEL, J. P. & POTTALA, E. W. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in

- inbred mice. III. Histopathological and electrocardiographical responses to chronic infection. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 37:541-549, 1987a.
- POSTAN, M.; DVORAK, J. A. & MCDANIEL, J. P. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN- mice with two clones isolated from a common source. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 32:497-506, 1983.
- POSTAN, M.; MCDANIEL, J. P. & DVORAK, J. A. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice. II. Course of infection of C57BL/6 mice with single-cell-isolated stocks. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 33:236-238, 1984.
- POSTAN, M.; MCDANIEL, J. P. & DVORAK, J. A. Comparative studies of the infection of Lewis rats with four *Trypanosoma cruzi* clones. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 81:415-419, 1987b.
- PUNG, O. J.; HULSEBOS, L. H. & KUHN, R. E. Experimental Chagas' disease (*Trypanosoma cruzi*) in the Brazilian squirrel monkey (*Saimiri sciureus*): Hematological, cardiology, cellular and humoral immune response. *International Journal of Parasitology*, 18:115-120, 1988a.
- PUNG, O. J.; HULSEBOS, L. H. & KUHN, R. E. Experimental American leishmaniasis and Chagas' disease in the Brazilian squirrel monkey: Cross immunity and electrocardiographic studies of monkeys infected with *Leishmania braziliensis* and *Trypanosoma cruzi*. *International Journal of Parasitology*, 18:1053-1059, 1988b.
- RAMÍREZ, L. E. *O coelho como modelo experimental no estudo da doença de Chagas crônica*. 1984. Tese de Doutorado. Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- RAMÍREZ, L. E. & BRENER, Z. Evaluation of the rabbit as a model for Chagas' disease. I. Parasitological studies. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82:531-536, 1987.
- RAMÍREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E. & CHAPADEIRO, E. Infecção do hamster pelo *Trypanosoma cruzi*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24:119-120, 1991.
- RAMÍREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E. & CHAPADEIRO, E. *Trypanosoma cruzi* infection in hamsters. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24:119-120, 1996.
- RAMÍREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; SOARES JR, J. M. & CHAPADEIRO, E. The hamster *Mesocricetus auratus* as experimental model in Chagas' disease. Parasitological and histopathological studies in acute and chronic phases of *Trypanosoma cruzi* infection. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27:163-169, 1994.
- RAMÍREZ, L. E.; LAGES-SILVA, E.; SOARES JR, J. M. & CHAPADEIRO, E. Infecção experimental do hamster pelo *Trypanosoma cruzi*: Fase crônica. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 26:253-254, 1993.
- REED, S. G.; INVERSO, J. A. & ROTERS, S. B. Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infections are restored with interleukin 2. *Journal of Immunology*, 133:3333-3337, 1984.
- REIMANN, K. A.; LI, J. T.; VOSS, G. & LETVIN, N. L. An env gene derived from a primary human immunodeficiency virus tupe 1 isolates confers high *in vivo* replicative capacity to a chimeric simian/human immunodeficiency virus in rhesus monkeys. *Journal of Virology*, 70:3198-3206, 1996.
- REIMANN, K. A.; WAITE, B. A.; LEE-PARRITZ, D. E. & LETVIN, N. L. Use of human leukocyte-specific monoclonal antibodies for clinically immunophenotyping lymphocytes of rhesus monkeys. *Cytometry*, 17:102-108, 1994.
- REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES, S. J.; LOPES, E. R.; GAZZINELLI, D. G.; COLLEY, D.G. & MCCURLEY, T. L. Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: Presence of tumor necrosis factor- α cells and dominance of CD8⁺ lymphocytes. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 48:637-644, 1993.
- REVELLI, S. S.; AMERIO, N.; MORENO, H. S.; VALENTI, J. L.; BALBARRY, H. & MORINI, J. C. Enfermedad de Chagas crônica en la rata. Características serológicas, electrocardiográficas e histopatológicas. *Medicina (Buenos Aires)*, 40 (Sup.1):69-76, 1980.
- REVELLI, S. S.; BERRA, H.; VALENTI, J. L.; MORENO, H. S.; BERNASCARI, M.; POLI, H. & MORINI, J. C. Effect of reinfection the development of rats infected *Trypanosoma cruzi*. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 32: 260-268, 1990.
- REVELLI, S.; DIDOLI, G.; ROGGERO, E.; MORENO, H.; BERNABO, J.; WIETZERBIN, J. & BOTTASSO, O. Macrophage activity, IL-6 levels, antibody response and heart histology in rats undergoing an attenuated *Trypanosoma cruzi* acute infection upon treatment with recombinant interferon gamma. *Cytokines in Cellular and Molecular Therapy*, 4:153-159, 1998.
- REZENDE FILHO, J.; FIGUEIREDO, F. & TEIXEIRA, A. R. L. Megacolon syndrome in rabbits with chronic Chagas' disease. *Anais International Congress on Chagas' disease*, 1979. Rio de Janeiro, Instituto Oswaldo Cruz, p. 20.
- RIBEIRO, R. D. Novos reservatórios silvestres do *Trypanosoma cruzi*. *Revista Brasileira de Biologia*, 3: 429-537, 1973.
- RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; ROSSI, M. A.; LAUS, J. L.; SILVA, J. S.; SAVINO, W. & MENGEL, J. Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with *Trypanosoma cruzi*.

- Journal of Experimental Medicine*, 175:29-39, 1992.
- RIVERA-VANDERPAS, M. T.; RODRIGUEZ, A. M.; AFCHAIN, D.; BAZIN, H. & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: Variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta Tropica* 40:5-10, 1983.
- ROSNER, I. M.; SCHININI, A.; ROVIRA, T.; DE ARIAS, A.; VELÁSQUEZ G., MONZÓN, M. I.; MALDONADO, M.; FERRO, E. A. & GATEANO, R. Acute Chagas' disease in non-human primates. I. Chronology of clinical events, clinical chemistry, ECG, radiology, parasitemia and immunological parameters in *Cebus apella* monkey. *Tropical Medicine Parasitology*, 39:51-55, 1988.
- ROSNER, I. M.; BELLASAI, J.; SCHININI, A.; ROVIRA, T.; DE ARIAS, A. R.; VELÁSQUEZ G., MONZÓN, M.; MALDONADO, M.; GATEANO, R. & FRESCO, M. A. Cardiopathy in *Cebus apella* monkeys experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. *Tropical Medicine Parasitology*, 40:24-31, 1989.
- ROSSI, M. A.; GONCALVES, S. & RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. Experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/C mice. The potential role of intravascular platelet aggregation in its genesis. *American Journal of Pathology*, 114:209-216, 1984.
- ROSSI, M. A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. & GONÇALVES, S. Pathogenesis of the apical aneurysm in experimental *Trypanosoma cruzi* cardiomyopathy in BALB/C mice. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 80:990-991, 1986.
- ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H. & ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *Infection & Immunity*, 61:5129-5133, 1993.
- ROTTENBERG, M. E.; CARDONI, R. L.; SINAGRA, A.; RIARTE, A.; RODRIGUEZ-NANTES, I.; LAURICELLA, M. & SEGURA E. L. *Trypanosoma cruzi*: T-cell-dependent mechanisms of resistance during chronic infection. *Experimental Parasitology*, 73:127-136, 1991.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R.; MINOPRIO, P.; EISEN, H. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains *Trypanosoma cruzi*. *Parasite Immunology*, 11:385-395, 1989.
- SANTOS-BUCH, C. A. & TEIXEIRA, A. R. L. The immunology of experimental Chagas' disease. III. Rejection allogeneic heart cells *in vitro*. *Journal of Experimental Medicine*, 140:38-53, 1974.
- SANTOS-LIMA, E. C. & MINOPRIO, P. Chagas' disease is attenuated in mice lacking gd T cells. *Infection & Immunity*, 64:215-221, 1996.
- SCHLEMPER JR, B. R.; AVILA, C. M.; COURA, J. R. & BRENER, Z. Course of infection and histopathological lesions in mice infected with seventeen *Trypanosoma cruzi* strains isolated from chronic patients. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 16:23-28, 1983.
- SCORZA, C. & SCORZA, J. V. Acute myocarditis in rats inoculated with *Trypanosoma cruzi*: Study of animals sacrificed between the fourth and twenty ninth day after infection. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 14:171-177, 1972.
- SEAH, S. K.; MARSDEN, P. D.; VOLLER, A. & PETTTTT, L. E. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in rhesus monkeys: The acute phase. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 68:63-69, 1974.
- SEGURA, M. A.; MOLINA-DE-RASPI, E. & BASOMBRIQ, M. A. Reversibility of muscle and heart lesions in chronic, *Trypanosoma cruzi* infected mice after late trypanocidal treatment. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89:213-216, 1994.
- SHOEMAKER, J. P. & HOFFMAN JR, R. V. Possible stimulatory factors in brown adipose tissue in mice. *Experimental Parasitology*, 35:272-274, 1974.
- SILVA, A. A.; MARINO, A. P. M. P.; CABRAL, F. A.; SILVA, S. H.; SANTOS, T. F. Q.; SAVINO, W. & LANNES-VIEIRA, J. Acute and chronic experimental chagasic infection: Genesis of immunopatological alterations in central nervous system. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 90 (Suppl. I): 168, 1995.
- SILVA-BARBOSA, S. D.; COTTA-DE-ALMEIDA, V.; RIEDERER, I.; DE MEIS, J.; DARDENNE, M.; BONOMO, A. & SAVINO W. Involvement of laminin and its receptor in abrogation of heart graft rejection by autoreactive T cells from *Trypanosoma cruzi*-infected mice. *Journal of Immunology*, 159:997-1003, 1997.
- SILVA, J. C.; PIRMEZ, C.; MORGADO, M. G. & GALVÃO-CASTRO, B. Immunopathological aspects of experimental *Trypanosoma cruzi* infection: Correlation of immune complexes and other serological features with muscle lesions during the infection. *Parasite Immunology*, 7:457-466, 1985.
- SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; BRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D. & REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. *Journal of Experimental Medicine*, 175:169-174, 1992.
- SILVA, J. S.; VESPA, G. N. R.; CARDOSO, M. A. G.; ALIBERTI, J. C. S. & CUNHA, F. Q. TNF- α mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected γ -interferon-activated macrophages. *Infection*

- Infection & Immunity*, 63:4862-4867, 1995.
- SILVA, L. H. P. & NUSSENWEIG, V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folha Clínica Biológica*, 20: 191-207, 1953.
- SOUSA, M. A. & ALENCAR, A. A. On the tissular parasitism of *Trypanosoma cruzi* and strain in Swiss mice. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 26:316-321, 1984.
- STAROBINAS, N.; RUSSO, M.; MINOPRIO, P. & HONTEBEREY-JOSKOWICZ, M. Is TNF- α involved in early susceptibility of *Trypanosoma cruzi*-infected C3H/He mice? *Research on Immunology*, 142:117-122, 1991.
- TARTELON, R. L. The role of T cell population in experimental Chagas' disease. *Research Immunology*, 142:130-133, 1991.
- TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Today*, 1:7-9, 1995.
- TARLETON, R. L.; KOHLER, B. H.; LATOUR, A. & POSTAN, M. Susceptibility of β_2 -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. *Nature*, 356:338-340, 1992.
- TEIXEIRA, A. R. L.; FIGUEIREDO, F.; REZENDE FILHO, J. & MACEDO, V. Chagas' disease; a clinical, parasitological, immunological, and pathological study in rabbits. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 32:258-272, 1983.
- TEIXEIRA, A. R. L.; TEIXEIRA, M. L. & SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease - IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man. *American Journal of Pathology*, 80: 163-180, 1975.
- TEIXEIRA, V. P. A.; REIS, M. A.; ARAÚJO, M. B. M.; SILVEIRA, S. A.; REIS, L. & ALMEIDA, H. O. Comparação do parasitismo da veia central da supra-renal com o de outros tecidos em chagásicos crônicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 24:73-78, 1991.
- TORRES, C. M. & TAVARES, B. M. Miocardite no macaco *Cebus* após inoculações repetidas com *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 56: 55-119, 1958.
- TRISCHMANN, T. M. Natural and acquired resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Advances in Experimental Medicine and Biology*, 62:365-382, 1983.
- TRISCHMANN, T. M. Single locus in BXH-2 mice responsible for inability to control early proliferation of *Trypanosoma cruzi*. *Infection & Immunity*, 46:658-662, 1984.
- TRISCHMANN, T. M. & BLOOM, B. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi*. *Infection & Immunity*, 35:546, 1982.
- TRISCHMANN, T. M.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Experimental Parasitology*, 45:160-168, 1978.
- VATTUONE, M. H.; SZARFMAN, A. & GONZALEZ-CAPPA, S. M. Antibody response and immunoglobulin levels in humans with acute or chronic *Trypanosoma cruzi* infections (Chagas' disease). *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 76:45-47, 1973.
- WHO. Immunology of Chagas' disease. *Bulletin World Health Organization*, 50:459-472, 1974.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: Multiple genes influencing parasitemia and survival. *Infection and Immunity*, 36:637-644, 1982.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S., WATSON, J. & MANNING, J. E. Role of the H-2 haplotype in survival of mice after infection with *Trypanosoma cruzi*. *Infection & Immunity*, 44:351-354, 1984.
- YOUNES-CHENNOUFI, A.; SAID, G.; & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cell CD4⁺. *Transactions Royal Society of Tropical Medicine & Hygiene*, 82:84-89, 1988.

Capítulo 10



Planejamento de Experimentos e Escolha dos Modelos

10.1

Critério de Escolha para o Modelo de Hospedeiro Animal e da Cepa do Parasita

Solange L. de Castro & Tania C. Araújo-Jorge

A existência de vários modelos experimentais aplicados ao estudo do curso da infecção por *Trypanosoma cruzi* nos indica, claramente, que não há um único modelo de escolha, nem um modelo consensual e nem mesmo um modelo que possa ser definido como o mais vantajoso (ver Capítulo 9). A escolha do modelo a ser utilizado deve ser feita após análise de vários pontos, em especial a pergunta que se quer abordar no estudo. A depender do fenômeno em foco, existem modelos animais que o reproduzem de modo melhor ou pior. Além disso, a identificação de grupos de cepas de parasita circulantes exclusivamente no ciclo de transmissão silvestre e no ciclo domiciliar/peridomiciliar humano (Tibayrenc, 1995; Zingales et al., 1998) levanta a questão da relevância de se proceder a estudos de processos fisiopatológicos representativos da doença de Chagas humana, predominantemente com cepas circulantes no ciclo doméstico de contaminação humana, correlacionando, sob um ponto de vista antropocêntrico, a utilização de cepas do ciclo silvestre.

Em todos os casos, as vantagens ou desvantagens do uso de determinado modelo referem-se à morbidade (gênese de doença) e à mortalidade (grau de virulência apresentado pelo parasita naquele modelo), comparativamente à infecção humana. Nesse sentido, a principal desvantagem do modelo camundongo, que é a alta taxa de mortalidade na fase aguda, com lesões que são incomuns na infecção humana aguda, pode ser contornada com a combinação de uma linhagem mais resistente, um menor inóculo, uma cepa de parasita característica do ciclo doméstico isolada de paciente, ou de triatomíneo/reservatório no peridomicílio. Na realidade este raciocínio, que está bem comprovado no modelo do camundongo, é válido para qualquer espécie de mamífero que venha a ser utilizada. Foi o extenso estudo no modelo do camundongo, por um grande número de grupos de pesquisa e utilizando as mais variadas combinações de cepas de parasita e de linhagens hospedeiras, que permitiu a conclusão consensual de que cada par é um par (Tarleton, 1995), confirmado também no modelo do rato (Rivera-Vanderpas et al., 1983). Pontos de controvérsia quanto à validade de certo modelo para reproduzir determinados aspectos da doença humana devem ser analisados sob a mesma ótica que permitiu esse consenso para o caso do camundongo. Assim, o fato de alguns autores

reportarem o encontro, ou não, de megacólon ou de frequência maior ou menor de miocardite em coelhos infectados estudados por diversos grupos pode se relacionar com o uso de diferentes cepas do *T. cruzi* (ver Capítulo 9), ou de coelhos com diferentes *back-grounds* genéticos.

Dois pontos importantes a ressaltar são a existência de determinado fenômeno na espécie que se quer ter como modelo e a fase da doença que se quer reproduzir. Alguns aspectos da doença humana, como por exemplo, a presença de anticorpos naturais antigalactose e sua associação com a forma clínica “indeterminada” da doença de Chagas, só ocorrem em primatas, e não podem, portanto, ser estudados em nenhum outro modelo (ver Capítulo 4). Quanto à fase da infecção, a grande maioria dos estudos com experimentação animal se deteve apenas na fase aguda, mas é muito pequeno o número de trabalhos sobre esta fase na infecção humana, até mesmo pelo processo de controle da transmissão vetorial. O desafio de encontrar modelos animais adequados para o estudo da fase crônica, incluindo a forma indeterminada, permanece atual. Nesse sentido, o trabalho com animais de pequeno porte, especialmente roedores com vida curta (camundongo e rato), traz um facilitador, pois a frequência de obtenção de animais em fase crônica pode ser maior. Recentemente demonstrou-se que o hamster reproduz, do ponto de vista histopatológico, algumas das características mais importantes da doença de Chagas crônica, como miocardite com despopulação neuronal acompanhada de transtornos eletrocardiográficos, miosite, ganglionite e dilatação ou alongamento do cecum com distúrbios de motilidade. Por outro lado, a forma indeterminada parece ser a mais frequentemente observada no coelho infectado experimentalmente com *T. cruzi*.

É importante mencionar que aspectos da infecção por *T. cruzi* em mamíferos silvestres, como *Calomys callosus*, gambás e cuícas (ver Capítulos 3 e 9), podem ser de grande valia para a compreensão de mecanismos fisiológicos da manutenção do parasita em reservatórios silvestres, da evolução do equilíbrio parasita-hospedeiro, bem como de aspectos comparativos da patogênese e da susceptibilidade a quimioterápicos de cepas circulantes nos ciclos silvestre e doméstico.

A Tabela 1 busca traçar um quadro comparativo dos diferentes modelos descritos neste manual, indicando se o parâmetro já foi (+) ou não foi (-) descrito no modelo em questão. Na maioria dos casos todos os resultados podem ser correlacionados, com variações de frequência e de intensidade de ocorrência do fenômeno, a depender da cepa de parasita utilizada, da via e intensidade do inóculo.

A mensagem final que nos parece essencial a destacar é a de que ao iniciar o estudo da infecção por *T. cruzi* em um determinado modelo experimental, independente dos fatores que concorreram para a escolha daquele modelo, deve ser feita uma profunda revisão bibliográfica com a identificação de todos os trabalhos que já utilizaram aquela espécie e o levantamento dos resultados obtidos com diferentes cepas do parasita. É importante também o conhecimento mais completo possível do comportamento biológico e dos marcadores moleculares da cepa de parasita escolhida (ver Capítulo 10.2, cepas de eleição), saber em qual biotopo e zootopo a cepa se insere (Andrade & Magalhães, 1996), qual a linhagem, e se está agrupada em *T. cruzi* I ou *T. cruzi* II (ver Capítulo 10.2, e Anexo referente à nomenclatura de *T. cruzi*). Na tentativa de aumentar a massa de conhecimentos produzidos por diversos grupos de pesquisa com uma mesma cepa, a OMS escolheu o clone CL-Brener como clone de referência para o Projeto Genoma de *T. cruzi*. Provavelmente essa escolha vai gerar um certo volume de trabalho com este clone, mas a investigação sobre a heterogeneidade intra-específica que é característica deste microorganismo, certamente exigirá a confirmação de dados com cepas de características diferentes.

Tabela 1 – Quadro comparativo da reprodutibilidade de aspectos da doença de Chagas humana em diferentes modelos experimentais e de suas condições operacionais

Modelo animal	cdg	rat	coe	ham	cal	cão	mac
Aspecto da doença humana reproduzida							
Fase aguda							
Chagoma de inoculação	+	+	+	+	+	+	+
Parasitemia (v)	+	+	+	+	+	+	+
Sorologia anti <i>T. cruzi</i> positiva	+	+	+	+	+	+	+
Tendência à mortalidade (v)	a	b	b	b	b	B	b
Alterações eletrocardiográficas (v)	+	+	+	+	?	+	+
Miocardite à histopatologia (v)	+	+	+	+	+	+	+
Miosite à histopatologia (v)	+	+	+	+	+		
Pan-infectividade	+	+	+	+			
Fibrose	+	+	+	+	+	+	
Esplenomegalia e linfadenomegalia	+			+			+
Fase crônica - forma indeterminada							
Duração	c	c	?	?	?	l	l
Fase crônica cardíaca e/ou digestiva							
Cinética de desenvolvimento da fase crônica	r	r	d	d	-	d	d
Encontro de ninhos de amastigotas (v)	+	+	-	+	-	+	?
Alterações eletrocardiográficas (v)	+	+	+	+	?	+	+
Cardiopatia (v)	+	+	+	+	-	+	+
Formação de megas (v)	+	+	+	+	-	-	-
Megaesôfago	+	+	-	-	-	?	-
Alterações neurológicas	+	?	-	-	-	-	?
Fibrose miocárdica	+	+	+	+	-	?	?
Facilidade de manuseio	a	a	m	m	m	m	b
Facilidade de manutenção de colônias	a	a	a	a	m	n	n
Custo operacional	b	b	m	b	?	a	a

+: ocorre em algum par parasita-hospedeiro; -: negativo; v: variável com a cepa de *Trypanosoma cruzi* e/ou com a linhagem genética do animal e/ou com a intensidade do inóculo; r: rápida (seis a doze meses); d: demorada (> dois anos); s: sim; n: não; a: alta; b: baixa; m: média; c: curta (dois a seis meses); l: longa (anos).

Finalmente, fatores que podem não ser decisivos, mas que certamente são importantes, referem-se às condições operacionais. Estas vão desde a experiência prévia do grupo no uso de determinado modelo e a necessidade de incorporação de pessoal com experiência de manejo do animal a ser usado, até o custo, a disponibilidade de fornecimento e as condições laboratoriais e de infectório para manejo dos animais normais e infectados que comporão os grupos experimentais. As condições ambientais para a experimentação também podem ser limitantes ou decisivas para a escolha do modelo a ser empregado. Por exemplo, o trabalho com fêmeas requer a existência de salas especiais isoladas apenas para este gênero, pois a presença de machos na sala pode gerar sensações olfatórias que levem a alterações no ciclo estral das fêmeas, que por sua vez podem potencialmente interferir na sua imunidade inata. Já o trabalho com cães ou macacos implica condições laboratoriais e de infectório específicas para estes casos. As condições psicológicas da equipe para lidar com os animais também são fatores importantes, pois podem influir quando o pesquisador ou técnico precisar sacrificar fêmeas grávidas, cães ou macacos submetidos a longos períodos de observação.



Trypanosoma cruzi: Cepas de Eleição

Octavio Fernandes & David A. Campbell

Tradicionalmente o *Trypanosoma cruzi* apresenta como característica uma grande diversidade genética intra-específica, demonstrada por diferentes técnicas bioquímicas e moleculares, se tratando na realidade de um complexo heterogêneo de subpopulações. As análises realizadas por distintos métodos sempre procuraram correlacionar características genéticas com propriedades biomédicas do parasito.

Uma das primeiras metodologias aplicadas em diversos isolados, clones e cepas de *T. cruzi* foi o perfil de restrição do kDNA. Esta técnica agrupou determinadas populações dos parasitos através dos padrões apresentados pelos fragmentos de restrição do DNA mitocondrial, em grupos denominados esquizodemas (Morel et al., 1980; Morel & Simpson, 1980). O potencial desta metodologia foi explorado em diferentes contextos e conseguiu atestar que o hospedeiro vertebrado se encontra parasitado por uma população de *T. cruzi*, que pode ser selecionada por distintos filtros como hemocultura, xenodiagnóstico, cultura *in vitro* e mesmo a própria interação parasito-hospedeiro (Deane et al., 1984; Morel et al., 1986).

De forma consistente com os achados de heterogeneidade obtidos com os padrões de restrição do kDNA, Morel et al. (1984), Macina et al. (1987) e Solari et al. (1991), ao utilizarem a rede de DNA mitocondrial como sonda para tipagem, obtiveram resultados que discriminavam distintos grupos de isolados. Com o desenvolvimento das técnicas de DNA recombinante, regiões de hipervariabilidade puderam ser clonadas e utilizadas como sondas moleculares. Assim, as regiões variáveis dos minicírculos mostraram o seu relógio molecular veloz e consequente poder discriminatório (Macina et al., 1987).

A técnica de PCR veio contribuir para o estudo da heterogeneidade populacional de *T. cruzi*, principalmente por dispensar o cultivo prévio do parasito, que seleciona *in vitro* subpopulações do protozoário (Morel et al., 1986). Dessa forma, Sturm et al. (1989) amplificaram a região variável dos minicírculos (330 pb) e utilizaram os *amplicons* como substrato para digestão com endonucleases de restrição, produzindo um experimento esquizodema-like e obtendo padrões de bandas complexo. Avila et al. (1990), Brenière et al. (1992) e Britto et al. (1995), após amplificarem regiões variáveis de isolados de *T. cruzi*, realizaram experimentos de hibridização cruzada entre os *amplicons*, demonstrando que este segmento da molécula de minicírculo possui alta especificidade, revelando uma grande heterogeneidade entre os distintos isolados utilizados.

Macedo et al. (1992) descreveram o uso da técnica de *fingerprint* do DNA total do parasito, mostrando a sua capacidade de desvendar também a heterogeneidade presente dentro do *taxon*, possuindo uma boa correlação com a análise por esquizodemas.

Um dos alvos sempre procurados foi a tentativa de se correlacionar marcadores genéticos com propriedades biológicas e ou determinantes de patogenicidade ou formas clínicas.

Algumas destas abordagens de tipagem e agrupamento apresentam resultados tão heterogêneos que a sua aplicabilidade passou a ser questionada. Por exemplo, podemos citar a plasticidade existente entre os cariótipos moleculares de *T. cruzi*. Os resultados destes experimentos são variáveis e muitos fatores podem determinar diferentes padrões de migração de cromossomos ou localização de genes específicos. Relatos de amplificação gênica, expansão e contração teloméricas, elementos transponíveis (transposons) e aneuploidias poderiam eventualmente

justificar a extensa heterogeneidade encontrada ao utilizar-se esta metodologia, mesmo entre subclones de um mesmo ancestral clonal ou cepas isoladas de um único paciente (Gibson & Miles, 1986; Engman et al., 1987; Iovannisci & Beverley, 1989; Wagner & So, 1990; McDaniel & Dvorak, 1993).

Em estudos iniciais, a análise dos padrões eletroforéticos de enzimas pareceu ser muito promissora, no que diz respeito a associar distintos zimodemas com padrões de transmissão doméstico e silvestre. Assim, Miles et al. (1977), ao investigarem dezessete isolados do protozoário provenientes do município de São Felipe, Bahia, determinaram dois grupos distintos de zimodemas: o primeiro, composto por isolados de gambá e triatomíneos silvestres e o segundo formado pelos isolados humanos e de animais domésticos, como gatos, ratos e camundongos.

Este mesmo grupo de autores ampliou a classificação dos grupos isoenzimáticos, após estudar seis isolados humanos da região amazônica (Miles et al., 1978) e cerca de 250 isolados de diversas localidades brasileiras (Miles et al., 1980), definindo três grupos característicos: o primeiro e o segundo, como descrito em São Felipe, que passaram a denominar de Z1 e Z2, e o terceiro (Z3) também relacionado ao ciclo silvestre. Confirmando as correlações biológicas dos zimodemas com os padrões de transmissão, Ready & Miles (1979) mostraram, através de análise de taxonomia numérica, que Z1 é mais relacionado com Z3 que com Z2. Ainda respeitando esta tripla classificação, Flint et al. (1984) conseguiram definir anticorpos monoclonais que reagiam especificamente com Z1, Z2 ou Z3.

Acostumados com a tradicional polaridade de *T. cruzi*, formas finas ou grossas, fase aguda ou crônica, forma cardíaca ou digestiva, cepa Y ou CL, ciclo silvestre ou doméstico, era de se esperar que ficássemos com a classificação isoenzimática e imunológica de Z1+Z3 e Z2 (Brener & Andrade, 1979; Miles & Cibulski, 1986). Entretanto, poucos anos depois de estabelecido este padrão, alguns pontos discordantes começaram a aparecer. Tibayrenc et al. (1986) analisaram o padrão eletroforético de quinze enzimas em 121 isolados provenientes dos mais diferentes sítios, englobando as Américas do Norte, Central e do Sul. Neste estudo, os autores estabeleceram 43 zimodemas diferentes, e apesar de atestarem uma grande heterogeneidade intragrupo, se aventuraram em aglutinar os isolados em dois *clusters* distintos, exibindo um alto grau de polimorfismo genético interno.

O uso da técnica de PCR com iniciadores randômicos para gerar RAPDs (*random amplified polymorphic DNAs*), trouxe a possibilidade de se estudar vários *loci* em um único experimento. Assim, Tibayrenc et al. (1993) demonstraram uma grande correlação entre os ensaios de RAPD e os perfis eletroforéticos das enzimas, definindo igualmente os dois *clusters* supracitados.

Henriksson et al. (1996) relatam também uma certa correlação entre os padrões de cariótipo molecular e localização de distintos genes e os zimodemas de *T. cruzi*: Z1 e Z2. Pontuam que os isolados Z2 apresentam cromossomos maiores que cepas Z1 e afirmam que esta característica suporta a distância genética entre os dois grupos isoenzimáticos, podendo refletir um fenômeno de especiação dentro do *taxon T. cruzi*.

Fugindo um pouco do tradicional polimorfismo, Souto & Zingales (1993) estudaram o gene codificante para o rRNA 24Sa (subunidade maior) em vários isolados de *T. cruzi*. Utilizando a técnica de PCR como abordagem experimental, clonaram e seqüenciaram dois produtos distintos provenientes de diferentes isolados, conseguindo definir dois grupos dentro da *espécie T. cruzi*: grupo 1 (rDNA1) e grupo 2 (rDNA2). Após um estudo pormenorizado das seqüências dos genes de minixon de diferentes isolados de *T. cruzi* (Fernandes et al., 1998), constataram-se dois grupos distintos que possuíam concordância com os grupos descritos por Souto & Zingales (1993). Análise por RAPD dos distintos isolados tipados, tanto através da seqüência codificante para o rRNA 24Sa como para o gene de minixon, definiu duas linhagens principais em *T. cruzi*, ambas polimórficas e subdivididas em pequenos grupos: linhagem 1 e linhagem 2 (Souto et al., 1996), como mostrado na Tabela 2.

Tabela 2 – Tipagem de diversos estoques de *Trypanosoma cruzi* através da dicotomia presente nos genes de minixon e rRNA

Isolado (país)	Origem	Linhagem	Isolado (país)	Origem	Linhagem
Ana /BR	Homem	1	Cuíca cl1 /BR	Roedor	2
Basileu /BR	Homem	1	Cútia cl1 /BR	Roedor	2
C1 /BR	Homem	2	Esquilo cl1 /BR	Roedor	2
Esmeraldo cl3 BR	Homem	1	F /BR	Roedor	2
JM /BR	Homem	1	M226 /BR	Roedor	2
MAS cl1 /BR	Homem	1	G /BR	Gambá	2
MC /BR	Homem	1	Gambá cl1 /BR	Gambá	2
Tatiana /BR	Homem	1	Dm28 /VEN	Gambá	2
Sylvio X10 /BR	Homem	2	CL /BR	Triatom.	1
Y /BR	Homem	1	CL Brener /BR	Triatom.	1
CBB cl3 /CH	Homem	1	YuYu /BR	Triatom.	2
MN cl2 /CH	Homem	1	Tulahuen /CH	Triatom.	2
NR cl3 /CH	Homem	1	OPS 22 /VEN	Triatom.	2
CA 1 /ARG	Homem	1			

Ao tiparmos amostras de *T. cruzi* recém-isoladas de hospedeiros humanos e de triatomíneos de distintas localidades brasileiras (Amazonas, Minas Gerais, Paraíba e Piauí), observarmos que os isolados da Amazônia correspondem à linhagem 2, condizentes com o ciclo de transmissão silvestre, enquanto todos os outros isolados humanos do restante do país são linhagem 1 (ciclo doméstico). A nossa impressão é de estarmos tendo a oportunidade de presenciar um fenômeno ímpar, que seria a interação do hospedeiro humano com o ciclo silvestre, peculiar da Amazônia (Fernandes et al., 1998).

Partindo-se do conceito de heterogeneidade populacional de *T. cruzi*, até atingirmos, pelo conceito dicotômico trazido pela caracterização pelo gene ribossômico 24Sa ou de minixon, quais serão as cepas de eleição para se estudar *T. cruzi*? A resposta desta questão permeará o ponto específico de futuras investigações. O que pode ficar estabelecido é que a atual visão de dicotomia das distintas populações de *T. cruzi* nos indica a existência de duas unidades taxonômicas distintas dentro do *taxon*. Somente futuras correlações biomédicas e epidemiológicas poderão dar o aval a uma eventual separação de *T. cruzi* em mais de uma espécie. Em simpósio internacional recente (ver Anexos, Capítulo 20) foram adotadas recomendações para padronizar e uniformizar a denominação do isolado de *T. cruzi*, de modo a facilitar informações sobre sua origem (hospedeiro do qual foi isolado, ano de isolamento), a designação e numeração dada pelo laboratório que o isolou e o grupo de *T. cruzi* ao qual pertence. Assim, foi proposta a designação operacional, *T. cruzi* I e *T. cruzi* II, para isolados de parasitas com as características da Tabela 3. *T. cruzi* # está recomendado para a designação de qualquer isolado que não puder ser enquadrado completamente em I ou II, por ausência de uma caracterização completa, ou por se enquadrar em cepas aparentemente híbridas, como Zimodema 2b ou 3 (Miles et al., 1980, 1981), Zimodema B (Romanha et al., 1979), Tipo I (Andrade, 1974), Locus 1/2 (tipadas por rDNA 24Sa (Souto et al., 1996), clonadas como 39 (Tibayrenc et al., 1993), que aguardam estudos mais aprofundados. De um modo geral o *T. cruzi* I circula no ciclo silvestre e o *T. cruzi* II no ciclo doméstico de transmissão do *T. cruzi*.

Tabela 3 – Nomenclatura operacional para os isolados de *Trypanosoma cruzi* em dois grandes grupos proposta em abril de 1999 (ver Anexo, Capítulo 20)

Parâmetro	<i>T. cruzi</i> I	<i>T. cruzi</i> II
Zimodema 1 ou 2 ⁽¹⁾	1	2
Zimodema A ⁽²⁾		A
Biodema II ou III ⁽³⁾	III	II
Ribodema I, II ou III ⁽⁴⁾	II/III	I
Grupo 1 ou 2 ⁽⁵⁾	1	2
Linhagem 1 ou 2 ⁽⁶⁾	2	1

1. Miles et al., 1978; 2. Romanha et al., 1979; 3. Andrade, 1974;
4. Clark & Pung, 1994; 5. Tibayrenc et al., 1993; 6. Souto et al., 1996

Tabela 4 – Exemplo de nomenclatura dos isolados de *Trypanosoma cruzi* usados muito frequentemente em estudos de infecção experimental

Isolado (designação corrente)	Designação proposta (1999)
Y	MHOM/BR/00/Y (<i>T.cruzi</i> II)
Tulahuen	TINF/CH/00/Tulahen (<i>T.cruzi</i> I)
Colombiana	MHOM/CO/00/Colombia (<i>T.cruzi</i> I)
Sylvio -X10	MHOM/BR/78/Sylvio - X10 (<i>T.cruzi</i> I)
Dm28c	MDID/BR/82/Dm-28c (<i>T.cruzi</i> I)
Peru	MHOM/PE/00/Peru (<i>T.cruzi</i> #)
21-SF	MHOM/BR/00/12-SF (<i>T.cruzi</i> #)
Esmeraldo	MHOM/BR/77/Esmeraldo (<i>T.cruzi</i> II)
Berenice	MHOM/BR/62/Berenice (<i>T.cruzi</i> II)

No Projeto Genoma de *T. cruzi* foi escolhido o clone CL-Brener, tipado como linhagem 1, representativo do parasita circulante no ciclo doméstico, e capaz de reproduzir em animais experimentais o comportamento biológico majoritário do *T. cruzi* em pacientes chagásicos. Na Tabela 5 estão sumarizados dados básicos sobre a cepa CL e o clone CL-Brener, tal como descrito na referência do Projeto Genoma. Os experimentos comparativos entre a cepa parental e o clone CL-Brener conduziram a resultados semelhantes, exceto quanto às curvas de parasitemia de camundongos Balb/C com formas tripomastigotas metacíclicas, quando a parasitemia com a cepa parental indica níveis significativamente mais altos que o clone.

Tabela 5 – Características do clone CL Brener, adotado no Projeto Genoma

Parâmetro	Característica/Referência
Nome	CLONE F11F5, denominado CL-BRENER em homenagem ao Dr. Zigman Brener, na reunião de abril de 1994 para planejamento do Projeto Genoma de <i>Trypanosoma cruzi</i> (WHO/TDR, Rio de Janeiro, Brazil, 1994) (Zingales et al., 1997)
Depósito	Formas sanguíneas criopreservadas e depositadas no criobanco do Lab. de Doença de Chagas, C.Pq. René Rachou, Fiocruz
Cepa original	CL, isolada de <i>Triatoma infestans</i> coletado no Rio Grande do Sul, Encruzilhada, 1963 (Brener & Chiari, 1963 a,b)
Circulação	Ciclo doméstico natural
Clonagem	O clone CL-Brener foi isolado de um camundongo cronicamente infectado com a cepa CL, em 3/07/1987, e reclonado em 14/09/1987
Morfologia	Predomínio de formas largas após duas semanas de infecção, com formas finas na primeira semana (Brener, 1965)
Infectividade <i>in vivo</i>	Aumento gradual e constante da parasitemia na fase aguda, persistência de parasitemia baixa mas positiva na fase crônica (Brener, 1965, 1977; Araujo & Chiari, 1989)
Histotropismo	Pan-infectividade (Lenzi et al., 1996) com parasitismo preferencial por células musculares cardíacas e esqueléticas (Melo & Brener, 1978)
Resistência do hospedeiro	Agentes imunossupressores (irradiação, ciclofosfamida) induzem a reagudização em animais crônicos (Brener & Chiari, 1971)
Sensibilidade a complemento	Formas sanguíneas resistentes à lise direta, exceto quando opsonizadas por anticorpo específico (Krettl & Brener, 1976; Schotellius, 1926; Umekita et al., 1997)
Infecção e ciclo celular <i>in vitro</i>	Baixo nível de invasão em macrófagos; cinética lenta de invasão em células musculares cardíacas e esqueléticas (Alcantara & Brener, 1978; Meirelles et al., 1980, 1982, 1986; Bertelli & Brener, 1980, Araújo-Jorge & De Souza, 1984)
Sensibilidade à temperatura	Diferenciação intracelular de amastigotas para tripomastigotas ocorre a 33°C e é inibida a 37°C (Brener et al., 1976)
Crescimento em meio de cultivo	Crescimento fácil e rápido em meios monofásicos ou bifásicos, com diferenciação epimastigota-tripomastigota ocorrendo nos dois meios, tanto para a cepa quanto para o clone (Brener & Chiari, 1965)
Sensibilidade à quimioterapia	Muito susceptível a drogas usadas clinicamente na doença de Chagas (Filardi & Brener, 1987)
Perfil de ligação de lectinas	Sobretudo ConA e RCA (Araújo et al., 1980)
Zimodema	B (Romanha et al., 1979; Goldberg & Silva Pereira, 1983)
Esquizodema	Determinados tanto para a cepa quanto para o clone (Morel, 1980; Morel & Simpson, 1980)
Perfil protéico (extratos solúveis)	Eletroforese e Western blot indicaram perfil semelhante entre a cepa e o clone (Teixeira & Yoshida 1986; Zingales et al., 1997)
Perfil de PCR	Semelhança entre cepa e clone (Macedo et al., 1992; Vago et al., 1996; Brisse et al., 1998)



10.3

Planejamento de um Experimento com Infecção *In Vivo* pelo *Trypanosoma cruzi*

Tania C. Araújo-Jorge

Um experimento *in vivo*, no qual vão ser sacrificados animais, está sujeito aos princípios éticos preconizados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Cobeia (ver Anexo, Capítulo 20), precisa ser muito bem planejado. Para isso, sugerimos que seja seguido o roteiro de questões abaixo.

- Qual o *objetivo* do experimento? A definição clara da pergunta que o experimento visa responder, e o que se quer testar, vai definir os grupos a serem comparados. Quantos grupos experimentais serão formados?
- Qual o *modelo experimental (animal e parasita)* que melhor permite responder à pergunta formulada? Animal susceptível ou resistente? De que linhagem genética? Macho ou fêmea? Recém-nato, jovem ou adulto? Agrupados por idade, peso ou ambos? Que cepa de parasita se adequa à pergunta experimental? De baixa ou alta virulência? Com mortalidade na fase aguda ou crônica? Que estágio do *T. cruzi* será utilizado para o inóculo: epimastigota, tripomastigota metacíclico, tripomastigota sanguíneo, de cultura de células, ou amastigota? Que inóculo será utilizado? Por que via será administrado? Recomendamos a leitura do Capítulo 9 como subsídio para a escolha do modelo experimental.
- Qual o *número de animais necessários*? Quantos animais serão analisados por grupo? Os animais serão estudados individualmente durante todo o experimento ou serão sacrificados num certo número por dia pós-infecção? Sangue ou células serão obtidos e agrupados, ou não, em um *pool*? Nesse caso, qual o número ideal para compor o *pool*? Em que dia será coletado o material? Quantos animais por dia? Se forem utilizados animais isogênicos, para análises individuais cujos resultados serão avaliados em médias ou medianas, recomendamos no mínimo quatro animais por ponto. Para análises em *pool*, recomendamos no mínimo três animais por ponto. Para análise de animais não isogênicos, onde se espera maior variação individual, são necessários de oito a dez animais por ponto.
- Há *espaço e gaiolas* no biotério? Quantas gaiolas precisarão ser utilizadas? Há espaço no biotério para essas gaiolas? Por quanto tempo está previsto o acompanhamento desses animais e a conseqüente ocupação do espaço?
- Algum *tratamento experimental* será feito? Para o estudo da administração de drogas ou de anticorpos precisam ser feitos controles específicos referentes ao veículo de dissolução da droga, ou ao isotipo do anticorpo, respectivamente. As datas e as vias de administração do tratamento experimental precisam ser previamente definidas, em função de critérios objetivos como a farmacocinética do produto (velocidade de absorção, concentração ativa, velocidade de inativação ou remoção do produto da circulação e do órgão alvo, etc.). Todos esses detalhes devem ser previamente conhecidos, seja por revisão bibliográfica ou por ensaios experimentais preliminares ao experimento propriamente dito. No caso do teste de efeito de nifurtimox, Haberkorn & Gonnert (1972) estabeleceram que doses de 15 ou 10 mg/kg para homens adultos equivalem a doses de 180 or 120 mg/kg para camundongos ou ratos.

- Quais as *características detalhadas do pedido de animais*? Em razão da data prevista para a infecção e da idade ideal do animal quando da infecção, é preciso calcular a data ideal de nascimento, a data para chegada ao biotério de experimentação (pelo menos dez dias antes do início do experimento), e especificar no pedido a linhagem, o número, o sexo e a data de nascimento dos animais.
- Quais as providências necessárias para a *obtenção do inóculo na data prevista* para a infecção? Se for ser utilizado tripomastigota sanguíneo, há que se prever o número de animais a ser sacrificados no dia do inóculo, para que estejam no dia de pico da parasitemia. Se o inóculo será feito com tripomastigota metacíclico ou de cultura de células, os procedimentos de cultura deverão ser tomados com a antecedência correta para a obtenção dos parasitas no número e no estágio desejado.
- Qual o *código* do experimento? Sugerimos que seja dado um código global do projeto (de até quatro dígitos) e que os experimentos sejam numerados sequencialmente. Desse modo pode-se montar um diretório do projeto e arquivos ou planilhas que levem o nome dos diferentes experimentos para digitação dos dados obtidos (ver Anexo, Capítulo 20).

Na Tabela 6 estão listadas algumas das linhagens de camundongos mais utilizadas para estudos da doença de Chagas experimental e suas principais características genéticas. Na Tabela 2 são apresentados alguns dos isolados de *T. cruzi* mais utilizados, com sua origem e padrão de linhagem, segundo tipagem dos genes de minixon e rRNA.

Tabela 6 – Algumas linhagens de camundongos utilizadas para estudos da doença de Chagas experimental

Linhagem	Haplotipo	Complexo H-2						Outros <i>loci</i> genéticos			
		<i>K</i>	<i>Ab</i>	<i>Aa</i>	<i>Eb</i>	<i>Ea</i>	<i>D</i>	<i>Thy-1</i>	<i>CD5</i>	<i>CD8</i>	<i>CD45</i>
Linhagens comuns											
C57BL/6	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	<i>b</i>	2	2	2	2
C56BL/10	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	<i>b</i>	2	2	2	2
BALB/c	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	2	2	2	2
C3H/HeJ	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	2	1	1	2
CBA/J	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	2	1	2	2
DBA/2	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	2	1	1	2
AKR/J	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	1	2	1	2
ASW/Sn	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	-	<i>s</i>	2	2	2	nd
C57BR	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	2	2	2	2
Linhagens congênicas											
BALB.B	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	<i>b</i>	2	2	2	nd
BALB.K	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	2	2	2	nd
B10.BR	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	<i>k</i>	2	2	2	nd
B10.D2	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>d</i>	2	2	2	nd
B10.Q	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>q</i>	<i>q</i>	-	<i>q</i>	2	2	2	nd
B10.S	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	<i>s</i>	-	<i>s</i>	2	2	2	nd
C3H.SW	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	<i>b</i>	-	<i>b</i>	2	1	1	nd

Adaptado de Klein (1986) e de Klein et al. (1990)



10.4

Manutenção e Obtenção dos Diferentes Estágios Evolutivos em Laboratório

Helene Santos Barbosa

O *Trypanosoma cruzi* é um flagelado da Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, caracterizado por ter um único flagelo e uma única mitocôndria, na qual se situa o cinetoplasto, uma organela especializada que contém DNA. É de fácil identificação e deve ser apenas diferenciado de *Trypanosoma rangeli*, um flagelado não-patogênico que circula em humanos nas Américas Central e do Sul, transmitido por alguns vetores que também transmitem *T. cruzi*. Para uma revisão detalhada da biologia celular do parasita, que foge ao perfil desta publicação, referimos De Souza (1984, 1989).

Como discutido acima, *T. cruzi* não é uma população homogênea mas composta de um *pool* de cepas que circulam nos ciclos doméstico e silvestre. Essa variação se reflete na morfologia, na virulência, nas curvas de parasitemia e mortalidade e na sensibilidade a drogas. A composição antigênica já foi bem estudada para várias cepas por abordagens bioquímicas e imunoquímicas. Reações cruzadas e antígenos cepa-específicos já foram detectados. Sondas moleculares para seqüências conservadas tanto do DNA do cinetoplasto como do nuclear são usadas para a detecção do parasita por PCR e também vêm sendo aplicadas para a tipagem de cepas.

Todo o ciclo do *T. cruzi* pode ser estudado *in vitro*, pois é, entre os tripanosomas patogênicos, um dos mais fáceis de ser mantido em laboratório. Já foram descritos diversos métodos para a obtenção dos diferentes estágios do parasita e estes podem ser cultivados em meios artificiais acelulares não definidos, meios acelulares definidos e em vários tipos celulares. O estudo da ultra-estrutural entre as várias formas ou estágios evolutivos do parasita, aponta diferenças morfológicas à semelhança das observações em microscopia óptica (para revisão De Souza, 1984). A Figura 1 mostra aspectos morfológicos das diferentes formas do ciclo evolutivo do *T. cruzi* ao nível de microscopia óptica e eletrônica. Estas formas são identificadas pela posição relativa do cinetoplasto em relação ao núcleo.

- *Epimastigotas*: apresentam um longo e grande corpo, núcleo esférico, cinetoplasto (em forma de bastão) anterior ao núcleo, bolsa flagelar em posição anterior ao núcleo, com flagelo livre e presença de citóstoma. Podem ser cultivados em meio de cultura, sendo o meio LIT o mais utilizado.
- *Tripomastigotas metacíclicos*: apresentam corpo fino, núcleo fusiforme, flagelo ao longo de todo o corpo do parasita, cinetoplasto (em forma esférica) na extremidade posterior do parasita, conseqüentemente posterior ao núcleo. A metaciclo gênese, processo de transformação de formas epimastigotas em tripomastigotas metacíclicas, deve-se a um estresse nutricional imposto pelas condições físico-químicas da parte posterior do trato digestivo do inseto, e é um passo crucial durante o ciclo de vida do *T. cruzi*. Esse processo pode ser simulado em cultivo *in vitro* do parasita a 27°C, utilizando-se tanto meio complexo como meio quimicamente definido. A possibilidade de se obter grandes quantidades de tripomastigotas metacíclicos *in vitro* com propriedades biológicas similares às das formas derivadas do inseto facilita o estudo com *T. cruzi* quanto a antígenos, receptores de superfície estágio-específicas, expressão diferencial dos genes, mecanismos moleculares de regulação morfogenética, entre outros. Tripomastigotas derivados de metaciclo gênese natural também podem ser obtidos em laboratório, a partir da infecção de triatomíneos e da coleta da urina contaminada.

- *Amastigotas*: apresentam forma arredondada, com cinetoplasto em forma de bastão, um flagelo curto visível apenas à microscopia eletrônica e presença de citóstoma. Podem ser obtidas quando da ruptura de células infectadas ou da diferenciação *in vitro* em meio definido.
- *Tripomastigotas*: originários do sangue ou recém-liberados de células também podem ser obtidos em laboratório.

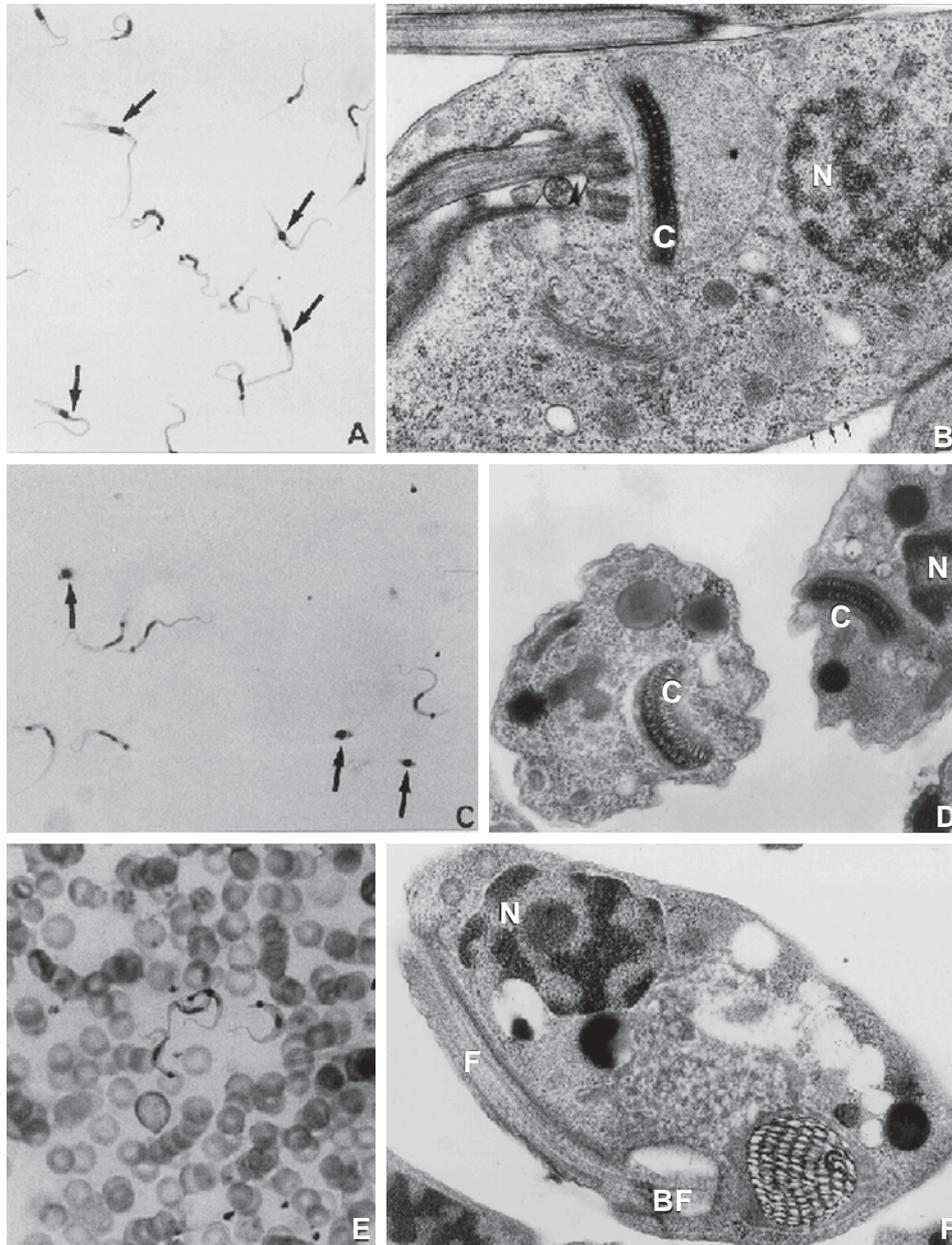


Figura 1 – Aspectos morfológicos das diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi* ao nível de microscopia óptica (A, C, E) e eletrônica (B, D, F). A: epimastigotas (setas) cultivadas em meio LIT apresentam forma alongada com cinetoplasto anterior ao núcleo. Algumas formas tripomastigotas podem ser vistas (*) tendo como caráter diferencial a presença de um cinetoplasto terminal ou subterminal, com núcleo alongado. B: epimastigotas apresentando núcleo (N), cinetoplasto (C) em forma de barra contido na matriz de uma mitocôndria (*), microtúbulos subpeliculares (setas), flagelo emergindo da bolsa flagelar, associado com o corpo basal (cabeça de seta). C: amastigotas, obtidas de cultura de células da linhagem J774G8 apresentam forma arredondada ou ovóides (setas) com cinetoplasto próximo ao núcleo. D: amastigotas apresentam forma arredondada ou oval com cinetoplasto em forma de barra e flagelo curto (não mostrado). E: tripomastigotas isoladas do sangue de camundongo infectado. Os parasitas têm a forma de C ou U, com extremidade afilada, o cinetoplasto grande e redondo com posição terminal ou subterminal, núcleo alongado e flagelo que corre ao longo do corpo do parasita sendo livre na extremidade. F: tripomastigotas apresentando cinetoplasto esférico (C) em forma de cesta com estrutura especial semelhante a cristas ordenadas horizontalmente dentro de uma mitocôndria, bolsa flagelar (BF) de onde emerge o flagelo (F) aderido ao corpo do parasita.

Todas as formas tripomastigotas, bem como as amastigotas, provenientes de diversas origens, mantêm sua capacidade de invasão em culturas de células de mamíferos, o que pode ser facilmente reproduzido *in vitro* em laboratório, tanto para fins de obtenção de parasitas e seus produtos metabólicos, como para fins de experimentação da interação parasito-célula. A penetração do *T. cruzi* pode levar de 5 minutos até 48 horas, a depender da origem do tripomastigota, da cepa do parasita e do tipo e da espécie da célula hospedeira. Durante a penetração há a formação de um vacúolo em torno do parasita, cuja membrana é lisada em até 20 horas. Livres no citoplasma da célula hospedeira, os tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, iniciando-se a fase de divisão celular, em ciclos reprodutivos consecutivos, até tomar todo o espaço disponível na célula, quando provavelmente, também por estresse nutricional, é induzida nova diferenciação para formas tripomastigotas que são liberadas quando a célula hospedeira é por fim lisada pelos parasitas.

Descreveremos a seguir os protocolos utilizados para a obtenção dos diversos estágios evolutivos do *T. cruzi*.

10.4.1 Cultivo de epimastigotas em meio LIT

Meio LIT (<i>liver infusion tryptose</i>)*	
NaHPO ₄ .7H ₂ O	11,6 g
NaCl	4 g
KCl	0,4 g
Glicose	2,2 g
Triptose	5 g
Caldo de infuso de fígado	5 g
Extrato de levedura	15 g
Hemina	25 mg/20 ml Tris Base 0,1 N
Soro fetal bovino	100 ml
Penicilina	200.000 U
Estreptomicina/gentamicina	50 mg
H ₂ O qsp	1.000 ml

*Camargo (1964)

- dissolver as substâncias, sob agitação, em aproximadamente 850 ml de H₂O destilada. Ajustar o pH para 7,2-7,5 com HCl. Adicionar o soro fetal bovino, completar o volume para 1.000 ml e inativar todo o meio a 68°C por 60 minutos. Filtrar sucessivamente, com membranas de 1,2 mm, 0,45 mm e 0,2 mm (não estéreis) e filtrar estéril com membrana de 0,2 mm;
- o meio deve ser distribuído em garrafas estéreis e mantido a 4°C (caso seja usado dentro de duas semanas) ou congelados a -20°C por vários meses. Para controle da esterilidade do meio, recolher duas alíquotas em tubos com roscas, deixando um a temperatura ambiente e outro na geladeira.

Inóculo e manutenção do parasita

Material

- estufa com controle de temperatura na faixa de 26-28°C
- erlenmeyer de 250 ml

Inoculação e crescimento

- o inóculo inicial em meio LIT deve ser de 7,5 x 10⁶ parasitas/ml em erlenmeyer com 50 ml de meio. As culturas de *T. cruzi* são mantidas de 26-28°C. Atenção especial deve ser dada à aeração da superfície/volume de meio. Sob estas circunstâncias não é necessária a agitação durante o cultivo;

- durante os primeiros quatro dias de cultivo ocorre a fase de multiplicação ou crescimento celular, emergindo então para a fase estacionária, quando a população alcança 15×10^8 parasitas/ml. Durante a fase logarítmica de multiplicação há predominância maciça de formas epimastigotas, sendo muito rara a presença de formas metacíclicas. O número de formas metacíclicas eventualmente introduzidas com o inóculo inicial permanece constante;
- quando a cultura atinge sua fase final de crescimento exponencial, em torno de 72-96 horas, o número de tripomastigotas metacíclicos aumenta alcançando seu nível mais alto, com $3-4 \times 10^7$ parasitas/ml;
- se as culturas forem mantidas permanentemente em fase logarítmica de crescimento pelo subcultivo diário, o pico de formas metacíclicas não ocorre e sua quantidade é insignificante. Se, por outro lado, os epimastigotas forem transferidos para um meio de cultura fresco no final da fase exponencial, mas antes de ocorrer evolução para formas metacíclicas, um pequeno número de metacíclicos pode ser encontrado no meio. Após a segunda passagem nestas condições, a proporção de metacíclicos decai;
- epimastigotas na fase logarítmica de crescimento ou no início do plateau podem ser usadas como inóculo para cultivar novas culturas.

10.4.2 Obtenção de tripomastigotas sangüíneos

Utilizam-se camundongos infectados e no dia em que a parasitemia é máxima para a cepa de *T. cruzi* em estudo, faz-se o sacrifício dos animais, sangria por punção cardíaca e separação dos tripomastigotas por centrifugação diferencial. Para se saber o dia em que os animais devem ser sacrificados é necessário o acompanhamento da parasitemia, feito através da sangria dos animais pela cauda (ver Capítulo 13). Uma vez estabelecidos os inóculos e o modelo experimental, a cinética de parasitemia é extremamente reprodutível, permitindo o conhecimento prévio do dia em que a parasitemia alcança seu pico. Para camundongos Swiss infectados com 10^5 tripomastigotas sangüíneos da cepa Y é no sétimo dia pós-infecção. Para cada par de linhagens de camundongo e de parasita esse dia precisa ser pré-estabelecido. O procedimento para inoculação e punção cardíaca dos animais no pico da parasitemia está no Capítulo 13. Descreveremos então o procedimento para separação e purificação dos tripomastigotas sangüíneos após a obtenção do sangue infectado.

Separação de tripomastigotas sangüíneos por centrifugação diferencial

Material

- câmara anestésica com éter
- placa de cortiça e agulhas
- citrato de sódio a 3.8%
- meio DME com 10% de soro fetal bovino
- seringas de 1 ml
- algodão ou gaze
- álcool a 70%
- isopor com gelo
- centrífuga clínica (de preferência refrigerada)
- banho-maria
- microscópio óptico
- câmara de Neubauer
- pipeta Pasteur
- micropipeta para 5-10 μ l

Método

- anestésiar os camundongos em câmara de éter e fixá-los com alfinetes em uma placa de cortiça;
- retirar, por punção cardíaca, com auxílio de uma seringa, o sangue com citrato de sódio a 3,8% (cerca de 0,4 ml)/camundongo; colocar o sangue infectado em tubos com rosca, conservando-os em gelo (4°C) durante a sangria; manter a seringa e a agulha com resíduos de sangue protegidos por algodão ou gaze embebidos em álcool a 70% no intervalo entre uma sangria e outra. Os animais deverão ser imediatamente armazenados em um saco plástico para posterior descarte, segundo as normas descritas no Capítulo 8;
- após a sangria de todos os animais, centrifugar a 1.200 rpm de 10-15 min e deixar em repouso na estufa a 37°C, por 15 min;
- retirar o sobrenadante e centrifugar a 3.500 rpm por 10-15 min;
- desprezar o sobrenadante e acrescentar cerca de 6 ml de meio DME contendo 10% de soro fetal bovino;
- colocar em banho-Maria a 37°C, para induzir a formação de grumo de plaquetas;
- retirar o grumo e centrifugar a 3.500 rpm de 10-15 min;
Obs: se não houver formação de grumo, centrifugar à baixa rotação (2.000 rpm/10 min).
- desprezar o sobrenadante e ressuspender o sedimento contendo os parasitas em 1 ou 2 ml de meio DME, fazer diluição de 1/100 e contar em câmara de Neubauer.
Obs: todo o material com sangue infectado deverá ser desprezado em um recipiente contendo solução desinfetante e nesta solução permanecer no mínimo por 24 h, para posterior lavagem.

10.4.3 Metaciclogênese *in vitro*

Composição e preparo dos meios TAU e TAU-3AAG

Meio TAU*	m M	g/l de meio
NaCl	190	11,10
KCl	17	1,26
MgCl ₂	2	0,407
CaCl ₂	2	0,294
Tampão fosfato pH 6,0	8	0,294
NaHCO ₃	0,6	0,005

*Contreras et al. (1985)

Para preparo do meio TAU3AAG, acrescentar

	mM	g/l de meio
Glicose	10	1,80
L-Prolina	10	1,17
Glutamato de sódio	50	8,45
Aspartato de sódio	2	0,31

Método

- manter epimastigotas em meio LIT com passagens semanais;
- ressuspender parasitas provenientes de meio LIT após seis a oito dias de cultivo, (percentual de tripomastigotas inferior a 5%) numa concentração de 5×10^8 parasitas/ml em um volume total de 10 ml de meio TAU;
- incubar por 2 h a 28°C;
- proceder a contagem dos parasitas (em meio TAU) para o inóculo em meio TAU3AAG, cuja concentração não

- deverá ultrapassar $3-5 \times 10^6$ parasitas/ml;
- incubar os parasitas em 10 ml de TAU3AAG em garrafas de cultura (25 cm^2); homogeneizar e deitá-las rapidamente;
- manter as garrafas sem agitação por três a quatro dias a 28°C , observando diariamente as garrafas em microscópio invertido;
- no quarto dia de incubação os parasitas são coletados virando-se a garrafa lentamente e evitando a contaminação com os epimastigotas presentes na nata que se forma principalmente na superfície do meio. Invertendo-se a garrafa, a nata, por tensão superficial, fica retida na parte inferior da mesma. Os tripomastigotas são recolhidos, centrifugados a 10.000 rpm a 5°C por 15 min e o sedimento contendo os parasitas é ressuspenso em 1 ml de meio de cultura (Contreras et al., 1985).

Avaliação da eficiência da metaciclologênese

- após 6 horas em meio TAU3AAG, uma drástica redução no número de parasitas pode ser observada em decorrência da adesão dos epimastigotas ao fundo (substrato) da garrafa. Após 24 horas (sem agitação) a cultura já apresenta três fases distintas: na parte inferior encontram-se várias formas epimastigotas aderidas ao substrato, à meia altura alguns tripomastigotas metacíclicos e na parte superior encontra-se uma nata onde vários epimastigotas estão fixados formando rosetas ou mesmo isolados. A percentagem de tripomastigotas vai aumentando à meia altura do meio até o quarto dia, proveniente da transformação de epimastigotas em tripomastigotas que resulta na sua liberação do substrato. Como nem todos os epimastigotas irão se aderir ao substrato, haverá sempre um percentual de epimastigotas ao final do ensaio;
- no quarto dia de incubação, a percentagem de formas tripomastigotas deverá estar na faixa de 80%. Alguns fatores podem interferir na metaciclologênese: (a) a idade das culturas em meio LIT; (b) o percentual de formas tripomastigotas e esferomastigotas em meio LIT (deverá ser inferior a 5%); (c) o inóculo de parasitas em meio TAU3AAG (concentração máxima de $5 \times 10^6/\text{ml}$); (d) a altura do meio nas garrafas durante a metaciclologênese (não deve ultrapassar 10mm); (e) ausência de agitação das garrafas (é importante permitir a adesão dos epimastigotas à superfície do frasco, à semelhança do que ocorre no intestino do barbeiro, para que ocorra a metaciclologênese).

10.4.4 Obtenção de tripomastigotas e amastigotas a partir de cultura de células

10.4.4.1 Preparo de meios

Meio DMEM*	
Meio liofilizado	10,15 g
Nitrato férrico	0,0001 %
Estreptomicina	100 U/ml
Penicilina	100 mg/ml
Soro fetal bovino	10 mL
H ₂ O DDD qsp	1 L

*Dulbecco's modified Eagle's medium

Preparo do meio

- trabalhar com 90% do volume de água destilada, que corresponde ao volume final do meio. Usar agitador magnético durante a mistura dos componentes;
- adicionar o conteúdo do frasco à água destilada, misturando na temperatura de 15 a 30°C ;
- completar o volume com água destilada e adicionar aos poucos NaHCO_3 (em pó), ajustando o pH do meio, para 0,2-0,3 abaixo do valor final desejado (7,2). Após ajuste do pH, manter o recipiente fechado até a filtragem

do meio;

- adicionar o nitrato férrico, os antibióticos e o soro fetal bovino;
- filtrar o meio com membrana de 0,2 mm de poro;
- distribuir em garrafas, podendo o meio estéril ser congelado;

Obs: o pH geralmente aumenta 0,1-0,3 após a filtração.

Meio 199	
Meio liofilizado	10,15 g
Estreptomicina	100 U/ml
Penicilina	100 mg/ml
Soro fetal bovino	10 ml
H ₂ O DDD qsp	1 l

Preparo do meio

- mesmo procedimento utilizado para o meio DMEM.

10.4.4.2 Linhagens celulares

- para obtenção de formas tripomastigotas será descrito o procedimento utilizado para células L-A9, uma linhagem celular de fibroblastos transformados;
- para obtenção de formas amastigotas será descrito o procedimento utilizado para células J774G8, uma linhagem celular semelhante a macrófago derivada de um célula reticular de sarcoma de camundongos Balb/C.

Manutenção de linhagens

- as células são cultivadas em frascos de vidro ou de plástico de 250 ml (inóculo 5×10^6 células por garrafa) a 37°C em meio DMEM ou 199 suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) a pH 7,2, sendo este trocado a cada dois dias;
- após seu crescimento, as células da linhagem L-A9 devem ser tripsinizadas por incubação por 1-3 min/37°C com solução contendo 0,1% tripsina, 0,02% verseno e PBS na razão 1:1:3. Esta incubação é interrompida pela adição de DMEM+5% SFB mantendo-se o tubo em banho de gelo. As células são então centrifugadas (1.000 g/5 min) e o sedimento ressuspenso em novo meio. Após contagem desta suspensão as células são plaqueadas;
- durante o crescimento da linhagem J774G8, algumas das células se destacam da superfície da garrafa. Essas células na fase líquida da cultura são usadas para iniciar as subculturas e como fonte para culturas novas.

10.4.4.3 Obtenção de tripomastigotas

Infecção das células L-A9 para obtenção de tripomastigotas (Carvalho & De Souza, 1983)

- a infecção é feita com tripomastigotas sanguíneas (ver item 13.3.2) ressuspenso em solução salina ou meio de cultura em razão parasita/célula hospedeira entre 3-5;
- os parasitas que não entram nas células hospedeiras nas primeiras 24 h de interação (37°C), são removidos por troca de meio;
- a depender da cepa de parasita utilizada, deverá previamente ser realizado um estudo cinético no período de dois a doze dias, para acompanhamento do ciclo do parasita, visando determinar o dia de liberação máxima de tripomastigotas no sobrenadante. Este monitoramento deve ser feito, diariamente, por plaqueamento das células, fixando-se as lamínulas em solução de Bouin e corando com solução de Giemsa
- utilizando-se a cepa Y, o isolamento de tripomastigotas é feito a partir da coleta do sobrenadante de células LA-9 após seis a sete dias de infecção;
- o sobrenadante é centrifugado a 500 g por 10 min e deixado a 37°C por 30 min; o sedimento que contém

células hospedeiras é desprezado. O sobrenadante é, a seguir, centrifugado a 1.000g por 10 min, para obtenção dos parasitas que devem ser ressuspensos em meio de cultura, e sua concentração ajustada para $1,5 \times 10^8$ células/ml;

- para manutenção da produção de tripomastigotas em cultura de células, os repiques são realizados com parasitas provenientes das próprias culturas.

Purificação de tripomastigotas com gradiente de metrizamida

- o sedimento final contendo parasitas e células hospedeiras é ressuspensão em 2 ml de meio 199 e colocado no topo do gradiente de metrizamida (0,01M tampão fosfato, pH 7,2 com 2% SFB) preparado em duas concentrações: 10 e 15%;
- o material é centrifugado a 1.000 g por 20 min em um rotor horizontal;
- os tripomastigotas puros são encontrados na interface de 10 e 15% do gradiente de metrizamida.

Avaliação de rendimento

- a linhagem LA-9 libera grande quantidade de tripomastigotas no sobrenadante após seis a sete dias de cultivo. Poucos amastigotas são vistos no sobrenadante dessas culturas. Com a utilização dessas células é possível se obter cerca de $6,5 \times 10^7$ parasitas por garrafa (250 ml). A purificação de amastigotas com metrizamida não interfere com a infectividade desses parasitas.

10.4.4.4 Obtenção de amastigotas

Infecção das células J774G8 para obtenção de amastigotas (Carvalho & De Souza, 1983)

- a infecção é feita com tripomastigotas sanguíneas (ver item 13.3.2) ressuspensos em solução salina ou meio de cultura na razão parasita/célula hospedeira entre 3-5;
- para o isolamento de amastigotas, o sobrenadante de células J774G8 está, seis a oito dias após a infecção, com formas tripomastigotas sanguíneas ou provenientes de cultura de células. O sobrenadante nesta fase contém aproximadamente >70% de amastigotas;
- procede-se à centrifugação do sobrenadante a 1.000 g por 5 min e ressuspende-se em meio 199 para a concentração de $1,5 \times 10^8$ parasitas/ml.

Purificação de amastigotas com gradiente de metrizamida

- o sedimento final contendo parasitas e células hospedeiras é purificado ressuspendendo-se este em 2 ml de meio 199; é colocado no topo do gradiente de metrizamida (0,01M tampão fosfato, pH 7,2 com 2% SFB) preparado em três concentrações: 15, 17 e 21%;
- o material é centrifugado a 1.000 g por 20 min em uma centrífuga clínica com rotor horizontal. Os amastigotas puros, após a centrifugação, são encontrados na interface de 15 e 17% do gradiente de metrizamida.

Avaliação de rendimento

- células J774G8 infectadas com tripomastigotas sanguíneos da cepa Y apresentam tendência de se romperem antes de começar a diferenciação de amastigotas para tripomastigotas. Após seis a sete dias de cultivo, grande quantidade de amastigotas é liberada no meio de cultura. Em algumas células o ciclo intracelular é completado e formas tripomastigotas são liberadas no meio. As células hospedeiras que permanecem intactas contêm muitos parasitas intracelulares com formas em divisão, que podem ser liberadas pela passagem em seringas com agulha. Esse método permite a obtenção de 2×10^7 parasitas/ml de meio de cultura. A purificação de amastigotas com metrizamida não interfere com a infectividade desses parasitas.

Referências Bibliográficas

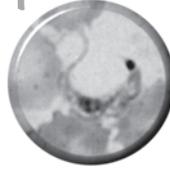
- ALCÂNTARA, A. & BRENER, Z. The *in vitro* interaction of *Trypanosoma cruzi* bloodstream forms and mouse peritoneal macrophages. *Acta Tropica*, 35: 209-219, 1978.
- ANDRADE, S. G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Baiano. *Revista de Patologia Tropical*, 3:65-121, 1974.
- ANDRADE, S. G. & MAGALHÃES, J. B. Biodemes and zymodemes of *Trypanosoma cruzi* strains: Correlations with clinical data and experimental. *Pathology*, 30: 27-35, 1996.
- ARAÚJO, F. G.; HANDMAN, E. & REMINGTON, J. S. Binding of lectins to the cell surface of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Protozoology*, 27:397-400, 1980.
- ARAÚJO, S. M. & CHIARI, E. Biological characterization of clones of the Y, CL and MR strains of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83:175-181, 1989.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. & DE SOUZA, W. Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta Tropica*, 41:17-28, 1984.
- AVILA, H.; GONÇALVES, A. M.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M. & SIMPSON, L. Schizodeme analysis of *Trypanosoma cruzi* stocks from South and Central America by analysis of PCR-amplified minicircle variable region sequences. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 12:175-188, 1990.
- BERTELLI, M. S. & BRENER, Z. Infection of tissue culture cells with bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology*, 66:992-997, 1982.
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. *Annals Tropical Medicine Parasitology*, 59:19-26, 1965.
- BRENER, Z. Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: Two types of parasite populations presenting distinct characteristics. Chagas' Disease. *Pan American Health Organization, Scientific Publications*, 347:11-21, 1977.
- BRENER, Z. & ANDRADE, Z. *Trypanosoma cruzi e doença de Chagas*. 1979. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo*, 5:220-224, 1963a.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. Observations on the chronic phase of experimental Chagas'disease in mice. *Revista Instituto Medicina Tropical São Paulo* 5:128-132, 1963b.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. Aspects of early growth of different *Trypanosoma cruzi* strains in culture medium. *Journal Parasitology*, 51:922-926, 1965.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. The effects of some immunosuppressive agents in experimental chronic Chagas disease. *Transactions Royal Society Tropical Medicine & Hygiene*, 65:629-636, 1971.
- BRENER, Z.; GOLGHER, R. R.; BERTELLI, M. S. & TEIXEIRA, J. A. Strain-dependent thermosensitivity influencing intracellular differentiation of *Trypanosoma cruzi* in cell culture. *Journal of Protozoology*, 23:147-150, 1976.
- BRENIÈRE, S. F.; BOSSENO, M. F.; REVOLLO, S.; RIVERA, M. T.; CARLIER, Y. & TIBAYRENC, M. Direct identification of *Trypanosoma cruzi* natural clones in vectors and mammalian hosts by polymerase chain reaction amplification. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 46:335-341, 1992.
- BRISSE S.; BARNABE C.; BANULS A. L.; SIDIBE I.; NOEL S. & TIBAYRENC, M. A phylogenetic analysis of the *Trypanosoma cruzi* genome project CL Brener reference strain by multilocus enzyme electrophoresis and multiprimer random amplified polymorphic DNA fingerprinting. *Molecular Biochemical Parasitology*, 92:253-263, 1998.
- BRITTO, C.; CARDOSO, M.A.; MONTEIRO VANNI, C. M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S. S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIRMEZ, C.; MOREL, C. M. & WINCKER, P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, 110:241-247, 1995.
- CAMARGO, E.P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. 1. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6:93-100, 1964.
- CARVALHO, T. U. & DE SOUZA, W. Separation of amastigotes and trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* from cultured cells. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 69: 571-575, 1983.
- CLARK, C. G. & PUNG O. J. Host specificity of ribosomal DNA variation in sylvatic *Trypanosoma cruzi* from North America. *Molecular Biochemical Parasitology*, 66:175-179, 1994.
- CONTRERAS, V. T.; MOREL, C. M. & GOLDENBERG, S. Stage specific gene expression precedes morphological changes during *Trypanosoma cruzi* metacyclogenesis. *Molecular Biochemical Parasitology*, 14:83-96, 1985.

- DE SOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology*, 86:197-283, 1984.
- DE SOUZA, W. Components of the cell surface of trypanosomatids. *Progress on Protozoology*, 3:87-184, 1989.
- DEANE, M. P.; SOUSA, M. A.; PEREIRA, N. M.; GONÇALVES, A. M.; MOMEN, H. & MOREL, C. M. *Trypanosoma cruzi*: Inoculation schedules and re-isolation methods select individual strains from doubly infected mice, as demonstrated by schizodeme and zymodeme analyses. *Journal of Protozoology*, 31:276-280, 1984.
- ENGMAN, D. M.; REDDY, L. V.; DONELSON, J. E. & KIRCHHOF, L. V. *Trypanosoma cruzi* exhibits inter- and intra-strain heterogeneity in molecular karyotype and chromosomal gene location. *Molecular Biochemical Parasitology*, 22:115-123, 1987.
- FERNANDES, O.; SOUTO, R. P.; CASTRO, J. A.; PEREIRA, J. B.; FERNANDES, N. C.; JUNQUEIRA, A. C. V.; NAIFF, R. D.; BARRET, T. B.; DEGRAVE, W.; ZINGALES, B., CAMPBELL, D. A. & COURA, J. R. Brazilian isolates of *Trypanosoma cruzi* from humans and triatomines classified into two lineages using mini-exon and ribosomal RNA sequences. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 58:807-811, 1998.
- FILARDI, L. S. & BRENER, Z. Susceptibility and natural resistance of *Trypanosoma cruzi* strains to drug used clinically in Chagas disease. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine & Hygiene*, 81:755-759, 1987.
- FLINT, J. E.; SCHECHTER, M.; CHAPMAN, M. D. & MILES, M. A. Zymodeme and species specificities of monoclonal antibodies raised against *Trypanosoma cruzi*. *Transactions Royal Society Tropical Medicine & Hygiene*, 78:193-202, 1984.
- GIBSON, W. C. & MILES, M. A. The karyotype and ploidy of *Trypanosoma cruzi*. *EMBO Journal*, 5:1299-1305, 1986.
- GOLDBERG, S. S. & SILVA PEREIRA, A. A. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. *Journal of Parasitology*, 69:91-96, 1983.
- HABERKORN, A. & GONNERT, R. Animal experimental investigation into the activity of nifurtimox against *Trypanosoma cruzi*. *Arzneimittel Forschung*, 22:1570-1581, 1972.
- HENRIKSSON, J.; ASLUND, L. & PETTERSSON, U. Karyotype variability in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 12: 108-114, 1996.
- IOVANNISCI, D. M. & BEVERLEY, S. M. Structural alterations of chromosome 2 in *Leishmania major* as evidence for diploidy, including spontaneous amplification of the mini-exon array. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 34:177-188, 1989.
- KLEIN, J. *Immunology: The science of self-nonsel discrimination*. 1986. New York: John Wiley & Sons.
- KLEIN, J.; BONTROP, R. E.; DAWKINS, R. L.; ERLICH, H. A.; GYLLENSTEN, U. B.; HEISE, E. R.; JONES, P. P.; PARHAM, P.; WAKELAND, E. K. & WATKINS, D. I. Nomenclature for the major histocompatibility complexes of different species: A proposal. *Immunogenetics*, 31:217-219, 1990.
- KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies to *Trypanosoma cruzi* infections. *Journal Immunology*, 116:755-760, 1976.
- LENZI, H. L.; OLIVEIRA, D. N.; LIMA, M. T. & GATASS, C. R. Pan infectivity of CL strain during murine acute infection. *Experimental Parasitology*, 84:16-27, 1996.
- MACEDO, A. M.; MARTINS, M. S.; CHIARI, E. & PENA, S. D. J. DNA fingerprinting of *Trypanosoma cruzi*: A new tool for characterization of strains and clones. *Molecular Biochemical Parasitology*, 55:147-154, 1992.
- MACINA, R. A.; ARAUZO, S.; REYES, M. B.; SANCHEZ, D. O.; BASOMBRIO, M. A.; MONTAMAT, E. E.; SOLARI, A. & FRASCH, A. C. C. *Trypanosoma cruzi* isolates from Argentina and Chile grouped with the aid of DNA probes. *Molecular Biochemical Parasitology*, 25:45-53, 1987.
- MCDANIEL, J. P. & DVORAK, J. A. Identification, isolation, and characterization of naturally-occurring *Trypanosoma cruzi* variants. *Molecular Biochemical Parasitology*, 57:213-222, 1993.
- MEIRELLES, M. N. L.; ARAÚJO-JORGE, T. C. & DE SOUZA, W. Interaction of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with chicken macrophages in vitro. *Parasitology*, 81:373-381, 1980.
- MEIRELLES, M. N. L.; ARAÚJO-JORGE, T. C.; MIRANDA, C. E.; DE SOUZA, W. & BARBOSA, H. S. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: Ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis in vitro. *European Journal of Cell Biology*, 41:198-206, 1986.
- MEIRELLES, M. N.; CHIARI, E. & DE SOUZA, W. Interaction of bloodstream, tissue culture-derived and axenic culture-derived trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* with macrophages. *Acta Tropica*, 39:195-203, 1982.
- MELO, R. C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *Journal Parasitology*, 64:475-482, 1978.
- MILES, M. A. & CIBULSKI, R. E. Zymodeme characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitology Today*, 4:94-97, 1986.
- MILES, M. A.; TOYE, P. J.; OSWALD, S. C. & GODFREY, D. G. The identification by isoenzyme patterns of two distinct stain-groups of *Trypanosoma cruzi*, circulating independently in a rural area of Brazil. *Transactions Royal Society Tropical. Medicine & Hygiene*, 71:217-225, 1977.

- MILES, M. A.; SOUZA, A.; POVOA, M.; SHAW, J. J.; LAINSON, R. & TOYE, P. J. Isozymic heterogeneity of *Trypanosoma cruzi* in the first autochthonous patients with Chagas' disease in Amazonian Brazil. *Nature*, 272:819-821, 1978.
- MILES, M. A.; LANHAM, S. M.; SOUZA, A. A. & PÓVOA, M. Further enzymic character of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. *Transactions Royal Society Tropical Medicine & Hygiene*, 74:221-237, 1980.
- MILES, M. A.; CEDILLOS, R. A.; POVOA, M. M.; DE SOUZA, A. A.; PRATA, A. & MACEDO, V. Do radically dissimilar *Trypanosoma cruzi* strains (zymodemes) cause Venezuelan and Brazilian forms of Chagas' disease? *Lancet*, 1:1338-1340, 1981.
- MOREL, C.M. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. *Proceedings National Academy of Science USA*, 77:6810-6814, 1980.
- MOREL, C. & SIMPSON, L. Characterization of pathogenic Trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprint of kinetoplast DNA minicircle. *American Journal Tropical Medicine & Hygiene*, 29 (Suppl.):1070-1074, 1980.
- MOREL, C.; CHIARI, E.; CAMARGO, E. P.; MATTEI, D. M.; ROMANHA, A. J. & SIMPSON, L. Strains and clones of *Trypanosoma cruzi* can be characterized by pattern of restriction endonuclease products of Kineoplast DNA minicircles. *Proceedings National Academy of Science USA*, 77:6810-6814, 1980.
- MOREL, C. M.; DEANE, M. P. & GONÇALVES, A. M. The complexity of *Trypanosoma cruzi* populations revealed by schizodeme analysis. *Parasitology Today*, 4:97-101, 1986.
- MOREL, C. M.; GONÇALVES, A. M.; SIMPSON, L. & SIMPSON, A. Recent advances in the development of DNA hybridization probes for the detection and characterization of *Trypanosoma cruzi*. *Memórias Instituto Oswaldo Cruz*, 79:51-53, 1984.
- READY, P. D. & MILES, M. A. Delimitation of *Trypanosoma cruzi* zymodemes by numerical taxonomy. *Transactions of the Royal Society for Tropical Medicine & Hygiene* 74:238-242, 1979.
- RIVERA-VANDERPLAS, M. T.; RODRIGUEZ, A. M.; AFCHAN, D.; BAZIN, H & CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi*: Variation in susceptibility of inbred strains of rats. *Acta Tropica*, 40:5-120, 1983.
- ROMANHA, A. J., SILVA PEREIRA, A. A., CHIARI E. & KILGOUR, V. Isoenzyme patterns of cultured *Trypanosoma cruzi*: Changes after prolonged subculture. *Comparative Biochemistry Physiology*, 62:139-142, 1979.
- SCHOTTELIUS J. Differentiation between *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma rangeli* by their different complement sensitivity. *Tropenmedizin und Parasitologie*, 33:147-150, 1986.
- SOLARI, A.; VENEGAS, J.; GONZALEZ, E. & VASQUEZ, C. Detection and classification of *Trypanosoma cruzi* by DNA hybridization with nonradioactive probes. *Journal of Protozoology*, 38:559-565, 1991.
- SOUTO, R. & ZINGALES, B. Sensitive detection and strain classification of *Trypanosoma cruzi* by amplification of a ribosomal RNA sequence. *Molecular Biochemical Parasitology*, 62: 45-52, 1993.
- SOUTO, R. P.; FERNANDES, O.; MACEDO, A. M.; CAMPBELL, D. A. & ZINGALES, B. DNA markers define two major phylogenetic lineages of *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 83:141-152, 1996.
- STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C.M. & SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: Use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular Biochemistry Parasitology*, 33:205-214, 1989.
- TARLETON, R. L. The role of T cells in *Trypanosoma cruzi* infection. *Parasitology Today*, 17:7-9, 1995.
- TEIXEIRA, M. M. & YOSHIDA, N. Stage-specific surface antigens of metacyclic trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* identified by monoclonal antibodies. *Molecular Biochemical Parasitology*, 18:271-282, 1986.
- TIBAYRENC M. Population genetics of parasitic protozoa and other microorganisms *Advances in Parasitology*, 36:47-115, 1995.
- TIBAYRENC, M.; NEUBAUER, K.; BARNABÉ, C.; GUERRINI, F.; SKARECKY, D. & AYALA, F. J., 1993. Genetic characterization of six parasitic protozoa: Parity between random-primer DNA typing and multilocus enzyme electrophoresis. *Proceedings National Academy of Science USA*, 90: 1335-1339.
- TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A. & AYALA, F. J., 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings National Academy of Science USA*, 83: 115-119.
- TIBAYRENC, M.; WARD, P.; MOYA, A. & AYALA, F. J., 1986. Natural populations of *Trypanosoma cruzi*, the agent of Chagas disease, have a complex multiclonal structure. *Proceedings National Academy of Science USA*, 83: 115-119.
- UMEKITA, L. F.; RAMOS, D. P. & MOTA, I. Clearance-inducing antibodies are responsible for protection against the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30:1191-1197, 1997.
- VAGO, A. R.; MACEDO, A. M.; OLIVEIRA, R. P.; ANDRADE, L. O.; CHIARI, E.; GALVÃO, L. M. C.; REIS, D. D.; PEREIRA, M. E. S.; SIMPSON, A. J. G.; TOSTES, S. & PENA, S. D. J. Kinetoplast DNA signatures of trypanosoma cruzi strains obtained directly from infected tissues. *American Journal of Pathology*, 149:2153-2159, 1996.

- WAGNER, W. & SO, M. Genomic variation of *Trypanosoma cruzi*: Involvement of multicopy genes. *Infection & Immunity*, 58: 3217-3224, 1990.
- ZINGALES, B.; PEREIRA, M. E.; OLIVEIRA, R. P.; ALMEIDA, K. A.; UMEZAWA, E. S.; SOUTO, R. P.; VARGAS, N.; CANO, M. I.; DA SILVEIRA, J. F.; NEHME, N. S.; MOREL, C. M.; BRENER, Z. & MACEDO, A. *Trypanosoma cruzi* genome project: Biological characteristics and molecular typing of clone CL Brener. *Acta Tropica*, 68:159-173, 1997.
- ZINGALES, B.; SOUTO, R. P.; MANGIA, R. H.; LISBOA, C. V.; CAMPBELL, D. A.; COURA, J. R.; JANSEN, A. M. & FERNANDES, O. Molecular epidemiology of American trypanosomiasis in Brazil based on dimorphisms of rRNA and mini-exon gene sequences. *International Journal of Parasitology*, 28:105-112, 1998.

Capítulo 11



Cuidados Especiais com Animais no Biotério de Experimentação

Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera, Celia V. P. Cardoso & Sebastião E. R. Couto

11.1 A Ética na Experimentação Animal

O animal não é um tubo de ensaio. É um ser vivo que sente e sofre. Precisa, acima de tudo, ser tratado com respeito quando vai dar a vida e a saúde para fins de experimentação científica. E apenas o estritamente necessário deve ser feito com os animais.

Esses princípios gerais nem sempre são seguidos e por isso, no Brasil e internacionalmente, existe um movimento crescente pela ética na experimentação animal, que procura definir uma legislação para normatizar e regular esse uso, bem como criar comitês de ética apropriados para o acompanhamento, supervisão e controle do cumprimento dessas regras (ver legislação no Capítulo 20, Anexos).

O bem-estar dos animais de laboratório é essencial, tanto para os próprios animais quanto para a validade das pesquisas, já que animais cujos estados fisiológicos e psicológicos são desconhecidos, ou submetidos a estresse, tornam os resultados das pesquisas não confiáveis e as aplicações médicas deficientes. E qual é o primeiro passo para conseguirmos proporcionar este ambiente de bem-estar aos animais de experimentação? É, sem dúvida, a educação.

A falta de conhecimento, muito mais que a crueldade deliberada, é a principal causa do sofrimento animal. O conhecimento da biologia, fisiologia, hábitos e necessidades da espécie que estivermos criando e/ou experimentando faz com que saibamos como tratá-los e que tenhamos uma atitude de respeito e consideração para com os animais. Assim conseguimos evitar a apreensão e o medo proveniente de um mau manejo.

Devemos refletir sempre que estamos trabalhando com seres sensíveis. A rotina não deve nos fazer perder a sensibilidade. Pressupõe-se que qualquer pessoa que trabalhe com esses animais (desde o encarregado da higienização até o mais prestigiado pesquisador) tenha treinamento adequado.

Essa postura inicial norteia nossa perspectiva no uso de camundongos, que são o modelo mais comumente eleito para fins de infecção experimental com *Trypanosoma cruzi*. No Anexo (Capítulo 20) incluímos os “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (Cobea), bem como versão do Anteprojeto de Lei que dispõe sobre a criação e o uso de animais para atividades de ensino e pesquisa e que está tramitando no Congresso Nacional. Cada vez mais as revistas especializadas exigem dos autores o compromisso moral e formal com essas normas éticas.

11.2 O Biotério de Experimentação

11.2.1 O ambiente

O animal de laboratório deve ser encarado para o experimento como um reagente biológico. Isso significa que tudo o que o circunda pode exercer influências diretas ou indiretas em suas características. A manutenção de condições ambientais estáveis está diretamente ligada à reprodutibilidade dos resultados obtidos no experimento.

O *local* de acondicionamento dos camundongos, classificados com padrão sanitário convencional, durante a experimentação deve ser *isolado* (sala ou biotério de experimentação). Nele devem ser mantidas constantes a *temperatura* (18 a 22°C) e a *umidade* (45 a 55%). São precisos, no mínimo, dois aparelhos de ar refrigerado, para serem ligados alternadamente dia e noite, sempre com o sistema de exaustão ligado para permitir troca de ar com o exterior. A *ventilação* (10 a 15 vezes/hora) deve ser adequada para a renovação regular do ar, trocas de calor e de produtos da respiração dos animais, remoção de poluentes, diluição de odores (principalmente a amônia) e dispersão das partículas bacterianas. Se possível o ar deve penetrar e sair por filtros, para que seja limpo, sem impurezas, poeiras e contaminantes.

Deve haver um *ciclo regular de luz* (claro/escuro), de preferência controlado por *timer* automático para 12/12 horas. Os camundongos têm hábitos noturnos (alimentação, acasalamento) e ficam em estado de sono, letargia e pouca atividade nos períodos de luz. Janelas ou vidraças devem ser evitadas na sala de experimentação porque dificultam o controle de claro/escuro e apresentam um espectro mais vermelho e menos violeta que eleva a carga térmica do ambiente.

Todos os tipos de estresse devem ser evitados. O ambiente deve ser calmo, *sem barulho* – principal causa de estresse dos animais. O maior perigo é representado pelos grandes ruídos, estampidos, ou barulhos cadenciados (ex.: martelar de pregos, ruído de centrífugas, impressoras, etc.). O ouvido humano não é um bom indicador para as condições de ruído dos animais, pois suas faixas de sensibilidade são muito diferentes. Sons agudos ou estridentes, de alta frequência, podem ser irritantes para os animais mas não para o experimentador. Já ruídos graves ou de baixa frequência podem passar despercebidos para os animais. As atividades de rotina da sala devem ser conduzidas com o mínimo de ruído possível. Outro fator importante de estresse é a manipulação dos animais por pessoas diferentes a cada dia, pois eles reconhecem e se acostumam com os indivíduos que se ocupam dos procedimentos de troca e manipulação regular. Além disso, quem lida com os animais de experimentação deve fazê-lo com cuidado e respeito. As pessoas têm odores próprios, que se somam aos odores de perfumes e desodorantes, que são reconhecidos pelos animais. Por isso, recomenda-se que toda manipulação com os animais seja feita sempre com o operador devidamente paramentado com guarda-pó, luvas, máscara e gorro para promover a sua proteção e segurança, além de diminuir o estresse dos animais com odores diversos.

O biotério de experimentação deve ter salas separadas por espécie hospedeira (camundongos, ratos, hamsters, etc.) e por agente patogênico (*T. cruzi*, *Leishmania*, *Toxoplasma*, etc.).

11.2.2 A construção física

O biotério de experimentação deverá ser projetado em um ambiente mais isolado, dotado de *barreiras sanitárias*, impedindo a contaminação para os laboratórios, ou para o exterior.

Devem existir *outras barreiras seguras* na sala, para evitar a fuga de animais, ausência de ralos, piso, teto e paredes íntegras e protetores nas frestas das portas, que só devem abrir no sentido da área não contaminada para a contaminada (ver Capítulo 8).

11.2.3 Higienização

- a cada novo experimento toda a sala de experimentação deve ser esterilizada com vapores de formol, pelo menos por 48 horas, com o ambiente todo vedado ou limpo com solução desinfetante;
- pelo menos a cada quinze dias toda a sala (piso, paredes e estantes) deve ser limpa com solução desinfetante à base de amônia quaternária ou iodo (de acordo com a recomendação do fabricante, considerando-se ainda o agente patogênico).

11.2.4 Cuidados especiais

- deve haver uma sinalização da sala, ou demarcação da área de trabalho com *T. cruzi*, com aviso de ACESSO RESTRITO (ver Capítulo 8);
- o equipamento de proteção (cujo uso é obrigatório) deve estar acessível a quem for trabalhar com os animais (ver Capítulo 8);
- na parte anterior à porta de entrada da sala deve haver capacho para limpeza de sapatos;
- deve-se entrar no biotério sempre paramentado, inclusive usando calçados próprios ou sapatilhas descartáveis, para não introduzir no ambiente dos animais em experimentação microorganismos que circulam no laboratório e na rua;
- todos os materiais de trabalho devem estar bem guardados para evitar que acumulem poeira.

11.3 Solicitação e Acondicionamento dos Camundongos nas Gaiolas

11.3.1 Previsão da solicitação dos animais

O número de animais a ser utilizado no experimento deverá obedecer ao planejamento experimental (ver Capítulo 10), e sempre prever um percentual de mortalidade que seja o comum no modelo de trabalho escolhido.

Para infectar camundongos adultos, eles devem ter no mínimo oito semanas. Seu peso nessa idade variará segundo a linhagem de camundongo escolhida para o experimento. Animais isogênicos de oito semanas costumam corresponder a um peso de 18 a 20 g. Já para animais não isogênicos esse peso costuma ser de 22 a 24 g.

O pesquisador deve enviar uma previsão ao biotério de criação e produção, relacionando espécie, cepa, sexo, idade, quantidade e o período de uso dos animais.

Os animais devem ser solicitados ao biotério duas semanas antes do início do experimento (portanto duas semanas mais novos do que a idade planejada para a infecção), para serem acondicionados ao ambiente de experimentação.

Ao fazer o cálculo para solicitação de camundongos para o experimento deve-se levar em conta os seguintes dados:

Linhagem e sexo do camundongo a ser utilizado: _____

Grupos experimentais	G1	G2	G3	Gn	Total
<ul style="list-style-type: none"> • sexo • número de animais/grupo • data ideal de nascimento • peso (g) • data para chegada ao biotério de experimentação • data prevista para a infecção 					

11.3.2 Preparo das gaiolas para os camundongos

Sempre que possível deve-se autoclavar as gaiolas a 121°C por 30 min. Quando esse procedimento não for possível, as gaiolas devem ser limpas com detergente neutro e imersas em solução desinfetante à base de amônia quaternária ou iodo.

Os bebedouros e bicos devem passar pelo mesmo procedimento que as gaiolas, podendo-se usar um sonicador no caso dos bicos.

CUIDADO: verificar se a tampa veda bem a gaiola e se não existem espaços de fuga para os camundongos. Manter todo o material limpo, bem acondicionado e separado de acordo com a espécie.

11.3.3 Ração, água e maravalha

- **ração:** deve ser distribuída nos comedouros na quantidade necessária para uma semana, evitando-se assim a contaminação ambiental, sobretudo por fungos. Comumente é colocado um recipiente com tampa com o volume adequado para a demanda semanal de ração que será consumida pelo biotério de experimentação. A ração deve ser balanceada, sem pó e com prazo de validade para consumo. Um camundongo consome 10 g de ração e ingere aproximadamente de 4 a 5 g, por dia;

Obs: existem rações apropriadas para serem autoclavadas sem perda nutricional, especialmente vitaminas; se a *ração comum* for autoclavada, deve ser adicionado complemento vitamínico na água. Pode-se também esterilizar a ração por aquecimento em forno de microondas em recipiente compatível com esse procedimento.

- **água:** filtrada, clorada e acidulada (HCl, pH 3,0). Um camundongo bebe cerca de 5 ml de água por dia (3 a 7 ml) e excreta 1 a 3 ml de urina por dia. Os bebedouros devem ser trocados, pelo menos, uma vez por semana. É imprescindível verificar se os bicos permitem a saída da água, se não estão entupidos ou vazando;
- **maravalha:** deve ser de boa qualidade, sem pó ou pedaços de madeira, e acondicionada em saco plástico autoclavável (tipo *steril-pack*), saco de papel kraft ou saco de tecido de algodão para ser autoclavada em porções suficientes para as trocas periódicas (semanais ou a cada dois ou três dias, a depender do número de animais por gaiola).

Obs: toda e qualquer substância ou material envolvido no microambiente ou na alimentação dos animais deve ser submetido ao mais rigoroso controle de qualidade (físico, químico e microbiológico) de que se possa dispor.

11.3.4 Acondicionamento dos camundongos nas gaiolas

A separação dos animais nas gaiolas deve ser aleatória, colocando-se um animal de cada vez em cada uma das gaiolas previstas para o experimento. Nas gaiolas pequenas (20 x 30 x 12 cm) pode-se acondicionar até dez animais e nas grandes (30 x 45 x 12 cm) até vinte, nesse caso com mais de um bebedouro.

Os camundongos devem ser pesados, individualmente, para se obter grupos de animais com peso homogêneo.

11.3.5 Ficha de identificação da gaiola

As fichas de identificação das gaiolas devem ser preparadas antes do experimento (sobretudo antes da infecção) e devem conter: o número da gaiola, o experimento e seu responsável, dados acerca dos animais como cepa, sexo, idade, peso, número de animais e acompanhamento da mortalidade, e dados sobre a inoculação como parasito, cepa, via, número de parasitas. Cuidados especiais devem ser tomados quanto à manutenção dessas fichas nas gaiolas, evitando-se eventuais trocas ou extravio das mesmas. Recomenda-se o uso de um envelope plástico para proteção das fichas dos respingos de água e da penetração de poeira para permitir plena legibilidade. O Anexo (Capítulo 20) traz modelos para a confecção de fichas.

11.3.6 Esquema de troca das gaiolas

Deve-se trocar uma gaiola de cada vez, para se evitar a mistura das fichas de identificação. A troca deve ser regular e normalmente ocorre duas ou três vezes por semana.

Procedimentos

- preparo de gaiola limpa com maravalha autoclavada;
- transferência e contagem dos animais; conferência do número de animais da gaiola, com o número marcado na ficha de identificação;
- transferência da ficha de identificação da gaiola;
- transferência da tampa com comida e água (completar a ração e a água quando necessário);
- autoclavação das gaiolas sujas no estado em que se encontram;
- remoção completa da maravalha suja da gaiola, já autoclavada, para um saco de lixo apropriado;
- quando não for possível a autoclavagem das gaiolas sujas, todo o material sujo deve passar pelo procedimento de desinfecção química (ver Capítulo 8).

11.3.7 Identificação do camundongo: vista dorsal

A identificação individual dos animais permite que os dados obtidos possam ser correlacionados. Nos animais albinos, de pelagem branca, o mais simples é a marcação por pintura com solução aquosa de ácido pícrico saturada. Nos animais de pelagem colorida é necessária a marcação por cortes ou perfurações nas orelhas. No Anexo (Capítulo 20) há um exemplo de marcação dos animais com o esquema proposto pela OPAS. Na Tabela 1 indicamos o esquema por nós utilizado. No Anexo temos outros esquemas de identificação individual dos animais.

Tabela 1 – Esquema sugerido de marcação de animais

Número do animal	Pintura com ácido pícrico (camundongos brancos)	Perfurações ou chanfraduras das orelhas (camundongos brancos, pretos ou cinzas)
1	Linha crânio-dorsal	1 pique na orelha direita (OD)
2	Orelha direita (OD)	1 pique na orelha esquerda (OE)
3	Orelha esquerda (OE)	2 piques OD
4	Pata dianteira direita (PDD)	2 piques OE
5	Pata dianteira esquerda (PDE)	3 piques OD
6	Pata traseira direita (PTD)	3 piques OE
7	Pata traseira esquerda (PTE)	1 + 2
8	Dorso	1 + 4
9	Cauda, base	1 + 6
10	Todo branco	sem corte

Outros números: combinações dos nove primeiros, dois a dois ou três a três

11.3.8. Análise dos animais antes da infecção

Não basta apenas a solicitação dos animais. Outros detalhes são importantes antes do dia da infecção: pesagem e marcação prévia dos animais, coleta de sangue para análise do perfil hematológico e para a separação de plasma anterior à data da infecção, entre outros, que estão descritos com detalhes nos Capítulos 12 e 13, pois são procedimentos que garantem tanto o agrupamento de animais com características semelhantes como a obtenção de dados prévios à infecção, para posterior comparação.

11.4 Cuidados com a Biossegurança no Descarte de Carcaças

As normas de biossegurança referentes ao descarte das carcaças de animais infectados devem ser de conhecimento de todos os que circulam pelo biotério de experimentação (ver Capítulo 8). Destacamos:

- os animais mortos, infectados, NÃO devem ser descartados no lixo comum;
- após o sacrifício dos animais, colocá-los em sacos plásticos bem vedados e incinerá-los;
- se o incinerador localizar-se longe do biotério, ou da sala de experimentação, as carcaças devem ser autoclavadas, ou sofrer outro processo de esterilização, antes de serem levadas ao incinerador, para evitar qualquer contaminação no percurso;
- quando a incineração não for possível, proceder à autoclavação das carcaças ou abrir os animais, expondo todas as vísceras, e mergulhá-los em solução de formalina a 4% por, pelo menos, 12 horas. Selar em saco plástico para, somente então, desprezá-los no lixo comum;
- as gaiolas sujas dos animais devem ser autoclavadas ou imersas em solução desinfetante, por pelo menos 4 horas, e depois lavadas com detergente neutro e novamente esterilizadas ou desinfetadas. A maravalha usada deve ser ensacada e incinerada ou autoclavada, antes do descarte.

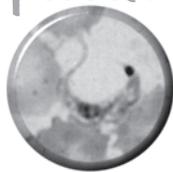
Atualmente utilizamos o seguinte o protocolo de descarte de carcaças de camundongos infectados:

- Os animais, após sangria ou dissecação, são formalizados (tratamento químico para desinfecção), colocados em sacos plásticos pretos (de lixo) e recobertos com formalina a 4%. O saco é vedado e levado ao recipiente de descarte de animais, localizado na capela de exaustão da sala central do departamento. Após 24 horas de contato com o formol, o saco com os animais pode ser descartado no lixo comum do prédio.

Referências Bibliográficas

- LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N.L.; MERUSSE, J. L. B. & NEVES, S. P. *Manual para técnicos em bioterismo*. 1996. São Paulo: CB/USP.
- FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. *Manual para técnicos em animais de laboratório*. 1994. Rio de Janeiro: CPNEMB/DEBI/BM.
- POOLE, T. B. *The UFAW handbook on the care and management of laboratory animal*. 1986. Harlow, Essex: Longman, 6th edition.
- LANE-PETTER, W. & PEARSON, A. E. G. *The laboratory animal - principles and practice*. 1971. London, New York: Academic Press.

Capítulo 12



Controle da Qualidade dos Animais antes da Infecção Experimental

Celia V. P. Cardoso, Marcos Antonio P. Marques, Tania C. Araújo-Jorge,
Solange L. de Castro & Maria Teresa Rivera

12.1 Padrões de Qualidade

Quanto mais eficientes forem as barreiras sanitárias do biotério, menores as chances de contaminação dos animais. Em função das barreiras disponíveis, podemos classificá-los em três grupos, de acordo com seu padrão sanitário, ou seja, quanto à microbiota (conjunto de formas de vida associadas, ou seja, vírus, bactérias, fungos e parasitos).

- *Convencionais* ou *holoxênicos*: animais que possuem microbiota indefinida por serem mantidos em ambiente desprovido de barreiras sanitárias rigorosas.
- *Livres de patógenos específicos* (*specific pathogen free/SPF*): animais que não apresentam microbiota capaz de lhes determinar doenças, ou seja, albergam somente microorganismos não patogênicos. Sua criação e/ou manutenção é realizada em ambientes protegidos por barreiras sanitárias rigorosas e também em isoladores.
- *Gnotobióticos*: animais que possuem microbiota associada definida e devem ser criados e/ou mantidos em ambientes dotados de barreiras sanitárias absolutas (isoladores). Em função da quantidade de microbiotas associadas ao animal, este pode ser classificado em

Axênico ou *germ free*: totalmente livre de microbiota

Monoxênico: contaminado deliberadamente com um tipo de microbiota

Dixênico: contaminado deliberadamente com dois tipos de microbiota

Polixênico: contaminado deliberadamente com vários tipos de microbiota.

A maioria dos biotérios de criação e produção faz controle sanitário dos animais e fornece o resultado de seus exames. Ao final deste capítulo, encontra-se, em anexo, a tradução de um certificado de saúde animal usado pelo biotério da Rockefeller University, para uma doação de animais transgênicos em 1996 (Anexo 12.1). Mesmo que eles indiquem que os animais são livres de patógenos específicos, é recomendado que se faça uma recheckagem em uma amostra dos animais recebidos para confirmação dos dados e para se evitar qualquer risco de contaminação. Animais com padrão microbiológico desconhecido devem ser considerados como infectados e devem ficar em quarentena, buscando-se identificar a presença ou não de algum microorganismo indesejável no biotério de experimentação. O Ministério da Agricultura controla toda a entrada de animais no país; no Anexo 12.2 está um formulário padrão de requerimento para autorização de importação de animais.

Quanto mais padronizado o animal for, melhor a reprodução do experimento nele realizado. A monitorização desses padrões é necessária não somente em biotérios de criação e produção, como também nos biotérios de experimentação. O estado de saúde dos animais tem que ser redefinido nas instalações de uso dos mesmos, em intervalos regulares, depois de recebidos do biotério de origem. Durante a experimentação ani-

mal só serão obtidas informações seguras se houver um controle sanitário sistemático e cuidadoso nos biotérios de experimentação com controle de qualidade dos animais. Esse controle sanitário vai depender do objetivo da pesquisa, das condições de alojamento (convencional, sob barreiras, isoladores ou microisoladores), do tempo de duração do experimento, da frequência de introdução de animais e outros materiais biológicos, da importância do patógeno específico, ou mesmo da probabilidade de interferência com a pesquisa.

Além das considerações relativas ao bem-estar dos animais, o principal alvo da monitoração sanitária *antes e durante* os experimentos é definir as condições de saúde dos animais para se avaliar a presença ou ausência de certos microorganismos, lesões e outras alterações como variáveis experimentais. Convém lembrar que a maioria das infecções em roedores é subclínica, podendo ocorrer modificações nos resultados dos experimentos devido a infecções naturais com ausência de doença clínica. Daí ser essencial a prevenção de infecções e não apenas a prevenção da doença.

Outros fatores exógenos, como por exemplo o meio ambiente, podem influenciar na susceptibilidade dos animais à pesquisa (ver Capítulo 11). A introdução de animais e outros materiais biológicos, particularmente quando de origem externa, exige a monitoração do ambiente para prevenir a introdução de agentes transmissíveis que possam influenciar na saúde do homem (agentes zoonóticos), ou de outros animais, ou nos resultados dos experimentos. É comum que mais pessoas tenham acesso aos biotérios de experimentação do que aos de criação, o que aumenta o risco de introdução de infecções por pessoal. A adoção de sistemas adequados de entrada, através de barreiras sanitárias, deve ser enfatizada para se manter o risco mínimo aceitável.

O emprego de um programa de *animais sentinelas* pode garantir a monitoração dos animais durante os experimentos de longa duração, como por exemplo, a avaliação da fase crônica da infecção por *Trypanosoma cruzi*. Os animais sentinelas são aqueles obtidos de colônias de criação de padrão microbiológico conhecido, introduzidos numa população de animais em experimentação, onde atuarão como “vigilantes” substitutos daquela população. Como regra geral, o controle sanitário é mais eficaz usando-se animais da mesma espécie e cepa da população residente. Devem ser submetidos a um minucioso exame antes de serem introduzidos nas salas dos animais em experimentação. E devem ter pelo menos dez semanas de idade, e mantidos dentro da sala por, no mínimo, quatro semanas. Os exames realizados nos sentinelas são os mesmos adotados no controle sanitário dos biotérios de criação e produção.

12.2 Avaliação Geral dos Animais antes da Infecção

Genericamente um animal saudável é aquele que não apresenta sinais ou sintomas de quaisquer doenças genéticas, neoplásicas, degenerativas, associadas ao desenvolvimento, nutricionais, tóxicas ou infectocontagiosas, de forma aguda ou crônica. O animal sadio tem funções normais, se alimenta, procria, é ativo e não estressado. Espera-se sempre obter um animal nestas condições.

Nas duas semanas de adaptação dos animais às condições ambientais da sala de experimentação, devem ser adotados outros procedimentos para garantir a sua higidez.

12.2.1 Inspeção geral

Para avaliação de lesões de pele, anotar as anormalidades e descartar os animais que apresentarem sinais de ferimentos ou lesões. Prolapso de reto evidente pode indicar infecções intestinais por diferentes agentes. Prurido excessivo pode indicar presença de infestações por ectoparasitas, especialmente sarna.

12.2.2 Pesagem e avaliação de idade

O cuidado de pesar todos os animais antes do experimento, além de permitir maior homogeneidade na população a ser utilizada, possibilita também a avaliação indireta de sua idade. É aconselhável que ao se escolher certa linhagem genética de camundongos, proceda-se ao estudo da curva de evolução ponderal dos dois sexos naquela cepa nas condições locais do experimento. Um exemplo pode ser observado para camundongos Swiss e C57BL/6 na Tabela 1 e na Figura 1.

Tabela 1 – Evolução ponderal em camundongos Swiss e C57BL/6 *

Idade semanas	Swiss				C57BL/6			
	Machos		Fêmeas		Machos		Fêmeas	
	Média	2sd	Média	2sd	Média	2sd	Média	2sd
3	13,0	2,0	12,9	2,0	12,1	2,8	9,3	2,6
4	18,0	3,0	16,0	2,2	14,4	2,2	10,4	4,2
5	21,0	3,2	18,0	2,2	18,9	3,2	14,4	4,6
6	23,1	3,2	19,1	2,0	19,4	4,0	16,3	3,8
7	25,6	3,6	19,5	2,0	20,2	4,4	17,3	3,0
8	26,0	3,8	20,0	1,8	21,8	4,8	18,0	3,0
9	27,4	3,4	20,8	2,0	22,7	4,8	18,8	2,4
10	28,1	3,0	22,0	2,0	23,6	5,4	19,9	2,2
11	28,7	3,6	22,3	2,2	24,2	5,4	20,9	2,2
12	29,3	3,8	22,6	2,2	24,7	5,2	21,6	2,4
13	nd	nd	nd	nd	25,5	5,2	22,4	3,2
14	nd	nd	nd	nd	25,7	5,0	22,6	3,0
15	nd	nd	nd	nd	25,7	5,2	22,6	3,2
16	nd	nd	nd	nd	25,6	5,4	22,3	2,8

* Resultados obtidos no Depto. de Ultra-estrutura e Biologia Celular, IOC

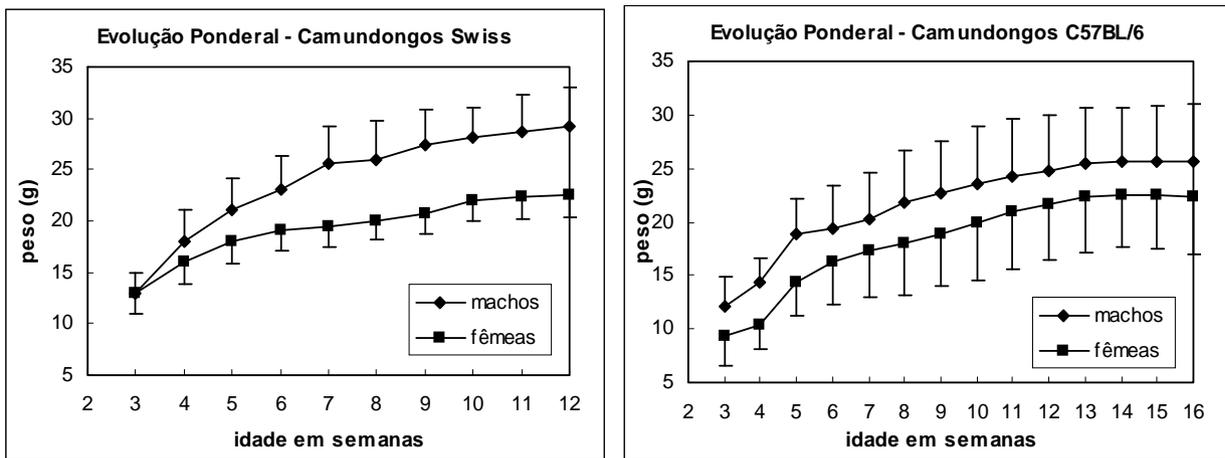


Figura 1 – Evolução ponderal de camundongos Swiss e C57BL/6. As barras representam dois desvios-padrão (correspondem a 95% da população)

12.3 Dados Hematológicos e Sorológicos

A coleta de sangue por um dos métodos que não impliquem sacrifício do animal (ver Capítulo 13), ou seja, sangria pela cauda ou por punção do plexo orbital, possibilita a análise de dados hematológicos (leucometria e hematócrito) que podem ser bastante úteis para a avaliação do grau de higidez da população a ser ensaiada, e a exclusão de animais que apresentem algum tipo de anormalidade no momento da infecção. De rotina, deve-se preparar um esfregaço sangüíneo (para avaliação da distribuição do percentual leucocitário). Colhem-se 5 ml de sangue total heparinizado para hematimetria e leucometria (contagem de hemácias na diluição de 1/50.000, e para contagem de leucócitos na diluição de 1/500), e ainda um capilar com cerca de 60 µl de sangue que será centrifugado para medida do hematócrito e obtenção de plasma. O plasma pode ser congelado para dosagem posterior de todos os parâmetros bioquímicos (por exemplo proteínas de fase aguda, citocinas ou enzimas indicadoras de lesão tissular) e sorológicos (por exemplo, dosagem de diversos isotipos de imunoglobulinas totais e específicas) de interesse ao experimento.

12.3.2 Contagem diferencial de leucócitos

A contagem diferencial dos leucócitos tem por finalidade estabelecer o valor percentual de cada tipo de leucócito no sangue circulante, para depois, conhecendo-se o total de leucócitos circulantes, conhecer-se o total de cada tipo de leucócito. Para isso, utiliza-se um esfregaço de sangue periférico feito da amostra colhida para o hemograma. O esfregaço é corado (ver adiante) e examinado ao microscópio com objetiva de imersão a óleo (100 X). A melhor região do esfregaço para contagem é aquela mais próxima de seu final, chamada de cauda. O examinador deve estabelecer um padrão para correr a lâmina, em movimentos verticais ou horizontais, mas tomando o cuidado de não passar mais de uma vez sobre a mesma área. Conta-se cem células, anotando-se o tipo de cada uma, utilizado-se contadores mecânicos ou elétricos.

Procedimento

- preparar o esfregaço;
- corar pelo método Panóptico de Pappenheim (May-Grunwald-Giemsa), com kit comercial Panóptico Rápido LB (Laborclin) cinco imersões (1 segundo cada) seqüenciais nas três soluções do kit; lavar com água deionizada; secar ao ar;
- solução nº 1: triarilmetano 0,1% (nocivo ao organismo);
- solução nº 2: xantenos 0,1%;
- solução nº 3: tiazinas 0,1%;
- contar cem leucócitos ao longo de toda a lâmina.

12.3.3 Leucometria (contagem do número de leucócitos)

A identificação de leucocitose é um parâmetro essencial para a avaliação das condições de saúde do animal antes e durante a infecção experimental. A contagem é facilmente feita e deve ser um procedimento de rotina. O sangue é diluído na proporção de 1:20 com líquido diluidor de Turk, que hemolisa as hemácias e cora o núcleo dos leucócitos pelo azul de metileno.

Material

- pipeta de 1 ml graduada a 0,01 ml
- frasco tipo penicilina com tampa de borracha
- papel de filtro ou algodão

- câmara de Neubauer
- conta-gotas ou tubo capilar
- microscópio

Procedimento

- pipetar 0,4 ml do líquido diluidor no frasco de penicilina;
- adicionar ao frasco 20 µl de sangue. A diluição é de 1:20;
- agitar suavemente por 1 min;
- encher o retículo da câmara de Neubauer com conta-gotas ou tubo capilar, deixando repousar por 1 min para sedimentação das células;
- focalizar a preparação com pequeno aumento no microscópio para observar a distribuição uniforme dos leucócitos;
- fazer a contagem de todos os leucócitos encontrados nos quadrados laterais da câmara de Neubauer, ou seja, 0,4 mm²;
- após a soma das contagens dos leucócitos, multiplicar o resultado obtido por 50.

12.3.4 Hematimetria (contagem do número de hemácias)

A contagem de hemácias pode ser dispensada, pois o valor do hematócrito já fornece um bom indicador da presença ou não de anemia nos animais, dado mais importante para o descarte ou não de animais antes do experimento.

12.3.5 Hematócrito

Também conhecido como volume globular, o hematócrito mede a relação entre os glóbulos vermelhos e o plasma. Em outras palavras, mede a percentagem do sangue ocupada por eritrócitos. Valores abaixo do normal indicam anemia; acima, indicam poliglobulia.

Descreveremos abaixo a técnica do microhematócrito por ser de maior rapidez e utilizar uma pequena quantidade de sangue.

Procedimento

- homogeneizar a amostra, e em seguida encher de sangue aproximadamente $\frac{3}{4}$ do tubo capilar;
- fechar uma das extremidades. Para isso, há duas maneiras: coloca-se o dedo indicador sobre a extremidade sem sangue, para evitar vazamento e introduz-se o tubo alguns milímetros em massa de modelar; ou encosta-se a extremidade sem sangue numa chama, fechando o tubo a fogo;
- colocar o tubo na centrífuga apropriada e rodar conforme indicado pelo fabricante do aparelho (geralmente, 5 min);
- fazer a leitura na tabela de leitura de microhematócrito.

12.3.6 Parâmetros hematológicos normais obtidos para camundongos Swiss

Os dados da Tabela 2 podem ser utilizados como indicativos para camundongos, mas devem ser repetidos com a cepa a ser utilizada como modelo experimental. Referem-se a camundongos Swiss utilizados em um trabalho desenvolvido no INCQS/Fiocruz, em 1988.

Tabela 2 – Hemograma completo

Série branca parâmetro	Machos (n = 40) Intervalos normais ¹	Fêmeas (n = 48) Intervalos normais
Leucócitos totais/mm ³	3500 a 9500	5.000 a 8.000
Linfócitos (%)	76,1 a 81,0	72,0 a 77,0
Neutrófilos (%)	18,1 a 23,0	16,0 a 21,0
Monócitos (%)	3 a 4	3 a 4
Basófilos (%)	0	0
Eosinófilos (%)	0 a 1	0 a 1
Bastão (%)	0 a 1	0 a 1
Série vermelha parâmetro	Machos Intervalos normais ¹	Fêmeas Intervalos normais
Peso (g)	32,1 a 36,0	26,1 a 30,0
Hematócrito (%)	46,0 a 51,0	44,1 a 51,0
Hemáceas/mm ³ n=11 e 39	5.10 ⁶ a 7.10 ⁶	5.10 ⁶ a 7.10 ⁶
Hemoglobina (g%) n=11 e 16	12,0 a 13,9	12,1 a 15,0
VGM (m ³) n=11 e 16	48,0 a 53,0	57,1 a 68,5
HGM (mmg) n=11 e 16	16,0 a 20,0	18,1 a 22,0
CHGM (%) n=11 e 16	29,0 a 34,0	35,1 a 39,0

n: número de animais analisados; ¹ intervalo de maior frequência

Referências Bibliográficas

- FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS (FELASA). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and habbit breeding colonies. *Laboratory Animals* 28:1-12, 1994.
- FEDERATION OF EUROPEAN LABORATORY ANIMAL SCIENCE ASSOCIATIONS (FELASA). FELASA recommendations for the health monitoring of mouse, rat, hamster, gerbil, guinea pig and rabbit experimental units. *Laboratory Animals* 30:193-208, 1996.
- INSTITUTE OF LABORATORY ANIMAL RESOURCES. Committee on Infectious Diseases of Mice and Rats. *Infectious Diseases of Mice and Rats*. 1991. Washington DC: National Academy Press.
- LUCA, R. R.; ALEXANDRE, S. R.; MARQUES, T.; SOUZA, N. L.; MERUSSE, J. L. B. & NEVES, S. P. *Manual para técnicos em bioterismo*. 1996. São Paulo:ICB/USP.

Anexo 12.1

Exemplo de certificado de saúde usado por biotério na Rockefeller University, USA

Tradução:

Relatório de Vigilância de Saúde de Roedores
Centro de Pesquisa em Animais de Laboratório, Box 2
Av. York 1230 (64a. e York), New York, New York, 10021-6399
(212) 327-8534

PAINEL DE SAÚDE: (realizado a cada dois meses para cada sala de roedores) inclui:

Virologia: (Sorologia - ELISA); vírus sendai, vírus de hepatite de camundongos (MHV), vírus minuto de camundongos (MVM) e coriomeningite linfocítica de camundongo (LCM), GD V11, diarreia epizootica de camundongos infantis (EDIM), vírus de pneumonia de camundongo (PVM), ectromelia, vírus polioma, vírus K, adenovírus de camundongo (Maden), Reo 3

Parasitologia: ectoparasitas artrópodes, endoparasitas helmínticos

Microbiologia: *Mycoplasma pulmonis* (Sorologia - ELISA)

Resultados - Sala 302

Painel principal (oito vírus) (out./dez.) / Painel estendido (12 vírus) (fev.)

Mês	Sorologia	Parasitologia
Out 1995	Negativo	Negativo
Dez 1995	Negativo	Negativo
Fev 1996	Negativo	Negativo

Sala: 302

Mês: outubro, dezembro 1995, fevereiro 1996

Cepa sentinela: CD-1 (Charles Rivers)

Sexo: fêmea

Seis camundongos sentinelas são colocados em gaiolas sem tampa e disseminados em cada sala nas diferentes estantes e expostos à ração de diferentes gaiolas contendo animais agrupados por idade, cada qual numa gaiola. Três camundongos são sacrificados para avaliação sentinela.

Comentários

Estes camundongos (Chau-Ching Liu) foram recentemente transferidos da sala 302 para as alas 228 A e B, que foram positivas para PVM em junho de 1995. Os camundongos originalmente vieram da Universidade do Sudeste da Califórnia e tinham uma história de positividade sorológica para MVM. Desde junho de 1995 estes animais estiveram SPF para os patógenos mencionados. Foi feito um teste direto dos camundongos desta colônia que foram enviados a outras instituições e foi também demonstrado o estado SPF.

Durante o último ano houve uma tentativa audaciosa de tornar as instalações centralizadas do biotério inteiramente SPF, pela implementação de procedimentos SPF estritos através de todas as salas de roedores com gaiolas de microisolamento e câmaras de fluxo laminar utilizadas, bem como seguindo os movimentos dos animais de acordo com seu estado de saúde. Além disso, todas as instalações foram tratadas por vários meses com ivermectina para traças e cupins e nossos sentinelas foram basicamente negativos no último ano. Todas as salas de camundongos na colônia primária em todo o prédio no presente momento tiveram pelo menos três avaliações de saúde negativas consecutivas (num período de seis meses).

Uma vez que os resultados destes testes são de animais sentinelas e não de testes diretos nos animais que serão embarcados, é sempre aconselhável uma quarentena nos animais quando do recebimento e um teste diagnóstico nas suas próprias instalações antes de introduzi-los numa colônia SPF.

Assinado: Patologista Responsável

Anexo 12.2

Formulário padrão para requerimento de importação de animais

Ao
Ministério da Agricultura
Secretaria de Produção Animal (SPA)
Secretaria de Defesa Sanitária (SDSA)

REQUERIMENTO DE AUTORIZAÇÃO DE IMPORTAÇÃO DE ANIMAL VIVO, SÊMEN, EMBRIÕES E OVOS FÉRTEIS (exceto para eqüídeos)

Senhor secretário da SDSA/Senhor secretário da SPA

Solicito autorização para importação da mercadoria adiante caracterizada, de acordo com o disposto na Resolução Concec nº 149/87 e na Portaria nº 49/87 do Sr. ministro da Agricultura, para o que prestamos as informações que se seguem:

1. IMPORTADOR

Nome: _____
(instituição)

Endereço: _____

Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____

Telefones: _____
(Dr. _____, pesquisador responsável)
(Dr. _____, veterinário responsável)
(Sr. _____, funcionário do serviço de importação)

2. CARACTERIZAÇÃO DA MERCADORIA A SER IMPORTADA

Espécie: _____ (camundongos) Quantidade: _____

Finalidade: [] Reprodução [] Abate [] _____

No caso de sêmen ou embrião: [] Comercialização [] Uso em rebanho próprio

País de procedência: _____ País de trânsito: _____

Exportador: _____
(nome do estabelecimento e localização)

3. TRANSPORTE

Meio de transporte: _____ Local de embarque: _____

No caso de transporte aéreo: [x] vôo de linha regular, misto ou carga
[] vôo fretado (*charter*)

Local de preferência para desembarque: Rio de Janeiro, RJ

4. DESTINO DOS ANIMAIS

Estabelecimento: _____ - _____
(instituição) (laboratório)

(setor)

Endereço: _____

Município: _____ Estado: _____

5. LOCAL PARA REALIZAÇÃO DE QUARENTENA OU ISOLAMENTO E PREMUNIÇÃO (quando requerida)

Estabelecimento: _____ - _____
(instituição) (laboratório)

(setor)

Endereço: _____
Município: _____ Estado: _____
Veterinário responsável: _____
Endereço: _____
Telefone: _____ Fax: _____

6. DOCUMENTOS ANEXOS

- Fatura proforma
- Certificado de registro genealógico e/ou genealogia, com dados oficiais de desempenho zootécnico dos genitores, de performance individual e/ou da progênie
- Relação dos animais
- Licença de importação do IBDF (original + quatro cópias)
- Licença de importação da Sudepe (original + quatro cópias)

7. CONTATO PARA ESCLARECIMENTOS E OUTROS FINS

O importador Outro - Nome: _____
Endereço: _____
Cidade: _____ Estado: _____ CEP: _____
Telefone: _____ Fax: _____ E-mail: _____

(Local e data)

Assinatura do importador ou seu representante autorizado

DECLARAÇÃO INSTITUCIONAL

Declaramos que a _____ (Instituição) está importando matrizes das linhagens isogênicas de camundongos (*Mus musculus*) abaixo relacionadas, que se destinam a reprodução para expansão de uma colônia dessa cepa, de modo a produzir o número de animais necessários para a realização de experimentos de _____ (natureza dos experimentos), no laboratório _____ (identificação do setor usuário). Esses animais se caracterizam por _____ (descrever o tipo de animal, deficiências genéticas, etc.) e serão utilizados para _____ (objetivo do trabalho). Serão portanto usados exclusivamente em atividades de pesquisa básica, em experimentos que visam a elucidar _____.

Informamos que os animais são certificadamente isentos de doenças específicas de roedores, portanto em perfeito estado de higiene, e que o Laboratório _____ (local de destino dos animais), onde serão mantidos os animais, possui instalações adequadas para o desenvolvimento de trabalhos com animais de laboratório, propiciando a obtenção de resultados confiáveis na pesquisa biomédica.

Especificação dos animais

Linhagem	Quantidade	Sexo	Obs.	

Local e data

Assinatura do responsável na instituição

Tradução

CENTRO DE PESQUISA DE ANIMAIS DE LABORATÓRIO
UNIVERSIDADE _____

Endereço: _____

Certificado de Saúde Animal

Embarque de animais Data: _____
 De: Pesquisador cedente : _____
 Universidade/Instituição : _____
 Endereço : _____
 Para: _____

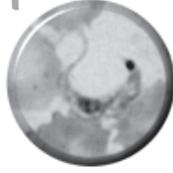
Conteúdo embarcado:	Número	Espécie	Cepa	Sexo	Cor
	3	camundongo	C57BL6	fêmeas	preta
	3	camundongo	C57BL6	machos	preta

Declaração de saúde dada pelo veterinário: os animais descritos acima foram examinados e encontram-se em aparente boa saúde e visualmente livres de evidência de doenças transmissíveis de significado de saúde pública. Estes animais são destinados a uso somente em pesquisa. Estes animais ou seus produtos não podem ser usados para fins comerciais.

Assinado: Diretor do Biotério cedente

Problemas com o embarque? Por favor, chame o Departamento de Serviços Veterinários pelos tels. _____

Capítulo 13



Sangria de Animais e Preparo de Inóculos para Infecção Experimental

Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera, Solange L. de Castro & Marcos Antônio P. Marques

13.1 Métodos de Sangria

Tanto para a análise hematológica dos animais antes da infecção (ver Capítulo 12) como para se obter o sangue que será usado no preparo do inóculo, pode-se proceder tanto por sangria total do animal infectado, por punção cardíaca, como por sangria parcial, pela cauda ou plexo orbital. O sangue deverá ser colhido em anticoagulante e diluído em solução salina fisiológica.

USAR LUVAS, MÁSCARA E GUARDA-PÓ DE MANGAS COMPRIDAS

13.1.1 Sangria pela cauda

Objetiva preparar lâmina para contagem de parasitemia, esfregaço para contagem leucocitária, medida do hematócrito e coleta de plasma.

Material

- caixa de contenção do animal
- tesoura de ponta fina e afiada
- algodão
- capilares heparinizados para microhematócrito e borracha de sucção do capilar
- massa plástica para vedação do capilar
- suporte plástico para capilar com marcação milimetrada
- lâminas de vidro para esfregaço sangüíneo
- fósforos
- tubos de microcentrífuga
- caneta de diamante
- centrífuga de microhematócrito
- caixas de descarte de material com as soluções desinfetantes apropriadas.

Procedimento

- identificar os capilares, as lâminas e os tubos que serão utilizados para o recolhimento de sangue dos diferentes camundongos;
- colocar o camundongo na caixa de contenção, com a cauda para fora;
- com uma das mãos, massagear a cauda no sentido da base para a ponta e segurar na ponta;
- com a tesoura na outra mão, cortar 1 mm ou menos da ponta da cauda;
- recolher uma gota para o preparo de esfregaço, que deve ser feito imediatamente por uma segunda pessoa. Caso seja feita a contagem de hemáceas ou leucócitos basta recolher uma gota do sangue sobre placa de Petri que será então utilizada para o procedimento de diluição e contagem;
- segurar a cauda do animal com as duas mãos e tornar a repetir o massageamento da base para a ponta, até aparecer nova gota, que será recolhida no capilar heparinizado (atenção: a ponta do capilar que contém a heparina geralmente é marcada com vermelho). Basta encostar a ponta heparinizada do capilar na cauda do animal e o sangue é transferido naturalmente para o seu interior;
- colocar o capilar horizontalmente sobre o suporte milimetrado e repetir o procedimento do item quinto acima (recolher uma gota para o preparo do esfregaço...) até encher o capilar do volume necessário (cada mm de capilar corresponde a 1 µl de sangue);
- ao final, colocar verticalmente o capilar sobre a massa plástica para vedá-lo;
- cauterizar a cauda do camundongo com fósforo;
- centrifugar o capilar em centrífuga de microhematócrito;
- ler o hematócrito contra régua própria ou régua simples de marcação milimetrada, caso o volume retirado seja menor que 70 µl de sangue;
- colocar o capilar sobre um suporte e riscar com a caneta diamante logo acima do creme leucocitário;
- quebrar o capilar em suas partes de plasma e células e transferir o plasma para um tubo de microcentrífuga, com o bulbo apropriado;
- congelar o plasma para análises posteriores.

No caso de trabalho com animais infectados, ao invés de vedar o capilar verte-se o sangue diretamente num tubo de microcentrífuga para a contagem de parasitas e o preparo da diluição do inóculo. Pode-se colher também diretamente o sangue no tubo de microcentrífuga, mas para que não coagule é necessário molhar a ponta da cauda com anticoagulante (heparina).

13.1.2 Sangria por punção do plexo orbital

Nos pequenos animais de laboratório a punção de uma veia é delicada, não permitindo a retirada de uma quantidade considerável de sangue e é difícil a sobrevivência do animal quando obtemos uma quantidade significativa de sangue. É preferível recorrer à técnica preconizada por Hoffmann, que consiste em punccionar o plexo orbital existente nos mamíferos, entre o glóbulo ocular e o fundo da cavidade orbitária.

Material

- tubos capilares heparinizados
- tubos de microcentrífuga
- colírio anestésico (cloridrato de proximetacaína 0,5%)

Procedimento

- a contenção do animal é realizada pela região cervical, de modo que automaticamente provoque uma estase venosa na região cefálica, provocando a exteriorização do glóbulo ocular;

- após a exteriorização do glóbulo ocular deve-se instilar uma pequena gota do colírio anestésico;
- introduzir o tubo capilar verticalmente entre o glóbulo ocular exposto e o fundo da cavidade orbitária;
- realizar uma ligeira pressão acompanhada de movimentos de rotação do tubo capilar;
Obs: assim que o plexo orbital é puncionado, o sangue preenche espontaneamente o tubo capilar. O relaxamento da pressão exercida sobre a região cervical, utilizada para conter o animal, faz cessar consideravelmente o fluxo sanguíneo.
- transferir o sangue recolhido para um tubo de microcentrífuga, previamente identificado.
Obs: a técnica de punção do plexo orbital pode ser novamente realizada 72 h após a primeira punção.

13.1.3 Sangria por punção cardíaca

Material

- placa de cortiça com quatro agulhas para fixação do animal
- câmara de anestesia (vidro de boca larga, com tampa, e algodão no fundo)
- éter etílico para anestesia
- tubos de microcentrífuga
- pissete com álcool
- seringas de 1 ml com agulhas de ponta fina e curta (13X4,5)
- anticoagulante (heparina ou citrato de sódio 3,8%)
- caixas de descarte de material com as soluções desinfetantes apropriadas

Procedimento

- colocar o camundongo infectado na câmara anestésica;
- preparar a seringa com anticoagulante enquanto o animal está sendo anestesiado: 0,1 ml de citrato de sódio 3,8% para cada 3 ml de sangue ou molhar a seringa com heparina;
- fixar o camundongo na placa, em posição de cruz;
- segurar a seringa com a mão direita (para dextros) e puncionar sobre o terceiro espaço intercostal (esquerdo) do camundongo;
- inserir a agulha de modo a perceber a perfuração da pele e do pericárdio;
Obs: o sangue jorrará assim que a agulha estiver dentro do ventrículo esquerdo do coração.
- aspirar lentamente com o embolo até completar 1 ml;
- retirar a seringa, descartar a agulha no recipiente apropriado e colocar o sangue no tubo de microcentrífuga;
- sacrificar o animal, caso não tenha ocorrido sua morte, através de overdose do anestésico ou por deslocamento cervical;
- descartar o animal em saco plástico mergulhando-o em formol 4%.

13.2 Inoculação

13.2.1 Escolha da via de inoculação

Diversas vias de inoculação podem ser usadas para a infecção por *Trypanosoma cruzi*, sendo mais comuns a subcutânea (SC) e a intraperitoneal (IP). Todas dão o mesmo resultado, com alguma diferença na cinética da parasitemia. A infecção também se transmite por inóculo via oral, mas não há muitos estudos comparando a resposta usando diferentes vias com diferentes modelos experimentais.

13.2.2 Cálculo e preparo do inóculo

Inóculo/animal

- mínimo: 10^2 (próximo ao fisiológico)
- médio: 10^3 a 10^4
- alto: 10^5 a 10^8

Material

- solução estoque de parasitas
- diluente: solução salina fisiológica (NaCl 0.85%), Alsever, etc.
- seringa de 1 ml

Preparo do inóculo intraperitoneal

Obs: recomenda-se dobrar o volume necessário para se trabalhar com folga.

Exemplo: para infecção de vinte animais com 10^4 /animal em 200 ml, necessita-se de 4 ml (vinte animais x 200 ml) (utilizar o dobro, 8 ml, como dito acima) de um inóculo na concentração de 5.10^4 /ml

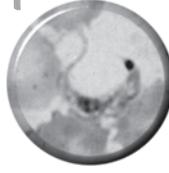
- sendo, por exemplo, a solução estoque de parasitas = 40.10^5 parasitas/ml, deve-se diluir esta suspensão
- fórmula para diluição $V_1N_1 = V_2N_2$
- $\text{vol} \times 400.10^4 = 8 \times 5.10^4$
- $\text{vol} = 0,1$ ml
- preparo da diluição = 0,1 ml da sol. estoque de parasitas + 7,9 ml diluente

Obs: no caso de inoculação SC, os cálculos devem ser feitos para um volume de 100 ml, ou seja, 10^4 /animal em 100 ml, necessitando-se de 4 ml (utilizar o dobro 8 ml, como dito acima) de um inóculo na concentração de 10×10^4 /ml.

Referências Bibliográficas

- CARVALHO, W. F. *Técnicas Médicas de Hematologia e Imunohematologia*. 1983. Cooperativa Editora e de Cultura Médica, Ltda.
- GARCIA-NAVARRO, C. E. K. & PACHALY, J. R. *Manual de Hematologia Veterinária*. 1994. Editora Vanela.
- HOFFMANN, G. *Les animaux de laboratoire*. 1963. Paris: Vigot Frères.
- RULIER, J. & PARODI, A. *Laboratoire et diagnostic en Médecine Vétérinaire*. 1968. Paris: Vigot Frères.

Capítulo 14



Avaliação de Parâmetros Parasitológicos e de Mortalidade

Solange L. de Castro, Tania C. Araújo-Jorge, Maria Teresa Rivera & Angela C. V. Junqueira

A detecção de parasitas no sangue periférico é a prova definitiva da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. A identificação individual da parasitemia, positiva ou negativa, patente ou subpatente, bem como sua quantificação, além de consistirem na prova parasitológica diagnóstica concreta da infecção, podem indicar o grau de equilíbrio em que se encontra a relação parasita-hospedeiro, refletindo a infectividade da cepa de parasita, o grau de parasitismo tissular e a intensidade do efeito da resposta imune específica articulada contra o parasita. No estudo experimental, além da análise individual, os parâmetros de percentual de mortalidade ou sobrevida cumulativa, tempo de sobrevida e tempo para mortalidade de metade dos animais, permitem uma medida do grau de resistência de uma dada população de hospedeiros a uma dada cepa de parasitas, ou o efeito de uma terapia ou imunoterapia.

14.1 Parasitemia Direta em Camundongos Infectados com *T. cruzi*

O acompanhamento da parasitemia dos camundongos infectados é indispensável tanto para se fazer a passagem da cepa do *T. cruzi* para sua manutenção em animais no laboratório, como para inferir a modulação da infecção por diferentes tratamentos. Vem sendo utilizada desde os primeiros trabalhos experimentais em doença de Chagas. Inicialmente qualitativa (positividade ou negatividade de encontro do parasita em gota espessa ou esfregaço sangüíneo, tal como feito para humanos até hoje), passou a parâmetro semiquantitativo, expresso em cruces ou em parasitas por campo microscópico, e foi posteriormente padronizada para expressão em número de parasitas por ml de sangue (Pizzi et al., 1998). A parasitemia é um parâmetro individual, colhido a partir da análise de cada um dos animais do grupo experimental, e que pode ser expressa em razão do tempo (*curva de cinética de parasitemia*) ou em razão de seu nível máximo (*parasitemia máxima*). Com um mínimo de seis animais pode-se trabalhar com as médias ou medianas obtidas em cada grupo. Como os valores de parasitemia comumente não apresentam distribuição normal, o tratamento estatístico dos dados obtidos é, em geral, feito através de métodos não paramétricos, ou então por métodos paramétricos (teste t, qui-quadrado ou análise de variância) sobre o logaritmo calculado com os dados originais (ver Capítulo 19).

No Capítulo 20 temos um modelo de coleta de dados de parasitemia e no Capítulo 19 um exemplo de elaboração de planilha para cálculo de parasitemia pelo método de Pizzi-Brener e também por contagem em câmara de Neubauer.

USAR LUVAS, MÁSCARA E GUARDA-PÓ DE MANGAS COMPRIDAS**Material**

- caixa de retenção do animal
- ponteiras descartáveis em suporte apropriado
- tesoura de ponta fina e afiada
- micropipeta para 5 µl
- placa de Petri com tampa
- fósforos
- algodão
- lâminas (ou câmaras de Neubauer)
- solução de lise de hemáceas: cloreto de amônia a 0.85% em água
- lamínulas de 20 x 20 mm ou 18 x 18 mm
- frasco lavador com álcool
- microscópio óptico
- tubos de microcentrífuga (ou microplaca com tampa) com solução de lise
- caixas de descarte de material com as soluções desinfetantes apropriadas

Método de Pizzi-Brener

- colocar o camundongo infectado na caixa de retenção, com a cauda para fora;
- com uma das mãos, massagear a cauda no sentido da base para a ponta e segurar na ponta;
- com a tesoura na outra mão, cortar 1 mm ou menos da ponta da cauda deixando o sangue correr formando uma gota. Sobre a placa de Petri, colocar a primeira gota, que será desprezada (ou utilizada para fazer uma lâmina de esfregaço sangüíneo), e colocar a seu lado a segunda gota. Manter a cauda do camundongo segura até que seja cauterizada;
- deixar a tesoura sobre algodão embebido em álcool e pegar a micropipeta com ponteira para 5 µl;
- tomar 5 µl da segunda gota que está sobre a placa de Petri e depositá-la sobre a lâmina e desprezar a ponteira na cuba apropriada. Imediatamente recobrir com a lamínula, deixando espalhar naturalmente o sangue sem qualquer pressão. Se o espalhamento não ficar bom, repetir o procedimento em outra lâmina;
- acender um fósforo e tocar com a base da chama (não com a ponta) no ponto de corte da cauda do animal até cauterizar. Soltar então o camundongo;
- desprezar o fósforo num vidro apropriado, com cuidado para não encostar em nada que contenha álcool;
- levar ao microscópio, sob objetiva de 40x, e contar o número de parasitas móveis em cinquenta campos aleatoriamente observados, cobrindo toda a área da lamínula;
- calcular o número de parasitas por ml de sangue de acordo com o procedimento descrito no item 14.2;
- no caso de parasitemias muito altas (maior que trinta) parasitas por campo), pode ser feita uma diluição inicial em solução de lise. Nesse caso, deve-se preparar o tubo eppendorf com o volume apropriado de solução de lise: 20 µl ou 45 µl, respectivamente para uma diluição de 1/5 ou 1/10 (p/5 µl de sangue). Em todos os casos é fundamental definir qual a diluição utilizada, para correção posterior do número de parasitas.

Obs: pode-se utilizar câmaras de Neubauer para a contagem. Nesse caso encher a câmara com o sangue diluído e hemolisado, contar os quatro quadrantes, calcular a média do número de parasitas por quadrante e multiplicar pela diluição e pelo fator da câmara (10^4).

Cálculo do número de parasitas/ml

Os parasitas serão quantificados em número de parasitas/campo microscópico, observados por toda a área da lamínula. Portanto, essa área vai diferir com lamínulas de dimensões diferentes. Além disso, o aumento com que o material será observado dependerá do jogo de lentes, assim, a área do campo deverá ser *calculada para cada microscópio*.

Ao final, será preciso aplicar um fator de multiplicação para que aquele número médio observado por campo seja extrapolado para toda a área da lamínula (que corresponde ao volume de 5 µl de sangue adicionado), corrigido pela diluição e extrapolado para 1 ml (200 x).

Cálculo do fator de correção

Procedimento

1. Medir o diâmetro (d) do campo microscópico com o qual se vai fazer as contagens. Utilizar para isso uma lâmina micrométrica colocada na platina do microscópio ou então uma objetiva micrométrica.
2. Calcular a área de um campo microscópico observado

	Área do campo observado $A_c = \pi r^2 \text{ mm}^2$	Área da lamínula $A_l = \text{lado}^2 \text{ mm}^2$
	exemplo	tamanhos de lamínula
d= X mm r= d/2 mm	0,42 mm 0,21 mm $A_c = 0,138474 \text{ mm}^2$	18 x 18 mm 20 x 20 mm $A_l = 324 \text{ mm}^2$ $A_l = 400 \text{ mm}^2$

$$\pi = 3,14$$

3. Calcular a concentração de parasitas no sangue (usar fator de correção): por exemplo para a lamínula de 20 x 20 mm sob objetiva cujo campo microscópico mede 0,42 mm de diâmetro

Sendo n = nº de parasitas contados em cinquenta campos, calcular sucessivamente:

- n' = nº de parasitas em 1 campo (corresponde a área $A_c = 0,138474 \text{ mm}^2$) ($n' = n / 50$)
- n'' = nº de parasitas em toda a lamínula (corresponde a área $A_l = 400 \text{ mm}^2$)

$$n'' \text{ parasitas} = \frac{n' \times 400}{0,138474} = n' \times 2888,6289 = n' \times 2,89 \times 10^3$$

Obs: n'' corresponde ao número de parasitas totais na lamínula em um volume de 5 µl

- n''' = concentração de parasitas, i.e., nº de parasitas em 1.000 µl (como temos o número em 5 µl, para calcular parasitas no volume de 1.000 ml – 200 x maior – (temos que multiplicar por 200)

$$n''' = n'' \times 200 = n' \times 2,89 \times 10^3 \times 200$$

$$n''' = n' \times 578 \times 10^3 = n' \times 57,8 \times 10^4$$

- assim, o fator = $57,8 \times 10^4$ (só válido para aquele microscópio onde foi contada a lâmina), com a mesma objetiva – mesmo aumento – no qual foi medida a área do campo, para lamínula 20 x 20 e para um volume de sangue 5 µl)
- desta forma, basta multiplicar o número de parasitas/campo por 57,8 e teremos a concentração de parasitas no sangue expressa em 10^4 parasitas/ml
- uma vez calculado o fator de multiplicação a ser usado, pode-se construir uma tabela para anotação direta do valor absoluto na planilha de coleta de dados (ver Capítulo 20).

Se a amostra de sangue tiver sido diluída, multiplicar ainda pela diluição:

Exemplo: contagem de duzentas parasitas em cem campos, amostra diluída 1:20 (fator = $57,8 \cdot 10^4$)

Parasitas em 50 campos	Parasita/campo	Parasita/ml (10^4 p/ml)	Parasita/ml (10^6 p/ml)
200	4	$4 \times 57,8 \times 20 = 46,24$	46,2

4. Expressar em logaritmo de base 10

Exemplo: $\log_{10} 46,2 \cdot 10^6 = 6 + \log_{10} 46,2 = 6 + 1,664 = 7,664$

14.2 Parasitemia por Amplificação Parasitária: Hemocultura, Xenodiagnóstico e PCR

Métodos indiretos como a hemocultura e o xenodiagnóstico são os procedimentos mais utilizados para a avaliação parasitológica em situações de baixos níveis de parasitemia, especialmente em humanos ou em animais experimentais submetidos à quimioterapia ou à imunoterapia. Como a evidenciação do parasita, através de testes parasitológicos, é a forma definitiva de caracterização da infecção ativa, devido à escassez de tripomastigotas circulantes, estes métodos indiretos são necessários tanto na fase aguda assintomática como nas fases indeterminada e crônica. Na fase aguda da doença, quando sintomática, a detecção do parasita é relativamente fácil e pode ser realizada pelo exame direto do sangue.

É praticamente consenso que se adote mais de um procedimento técnico no isolamento e/ou detecção do *T. cruzi* tanto em indivíduos nos quais se suspeita a infecção, bem como em animais experimentalmente infectados e reservatórios. Os parâmetros parasitológicos indiretos mais empregados são o xenodiagnóstico (Brumpt, 1914) e a hemocultura (Freitas, 1947). Mais recentemente introduziu-se a denominada reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction* - PCR), que consiste na síntese enzimática, *in vitro*, de milhões de cópias a partir de um segmento específico de DNA do parasita (Saiki et al., 1985; Mullis & Faloona, 1987).

A seguir serão descritas essas três técnicas empregadas com mais frequência no diagnóstico e isolamento do *T. cruzi* em amostras biológicas.

Para a realização da técnica de hemocultura, devido aos excelentes resultados obtidos por Chiari et al. (1979) e de Luz et al. (1994a,b), tem-se adotado o procedimento básico destes autores.

14.2.1 Hemocultura

Material

- frasco de meio LIT para lavagem
- micropipeta para 10 μ l
- tubos com meio LIT (5, 15 ou 50 ml)
- ponteiras descartáveis em suporte apropriado
- sangue heparinizado do animal ou paciente recolhido em tubo de centrífuga
- lâminas
- centrífuga clínica
- lamínulas de 20 x 20 mm ou 18 x 18 mm
- câmara de fluxo laminar
- caixas de descarte de material com as soluções desinfetantes apropriadas

- estufa incubadora B.O.D. (*biochemical oxygen demand*) a 28°C
- frasco lavador com álcool
- pipetas Pasteur estéreis
- microscópio óptico

Meio de cultivo

Utilizar o meio *liver infusion tryptose* (LIT) formulado por R. Yaeger e introduzido por E. P. Camargo (Camargo, 1964). Este meio é rico em componentes e tem apresentado bons resultados no cultivo de formas sangüíneas de *T. cruzi* (ver Capítulo 10)(Chiari et al., 1979; Luz et al., 1994a,b). Após a filtração, o meio é alíquotado em tubos de vidro refratário com tampa de rosca ou em frascos plásticos estéreis; sendo dois frascos submetidos à prova de esterilização, um lote fica no laboratório para ser empregado na rotina de cultivo de amostras do *T. cruzi* e o restante estocado a 4°C até o momento do uso. Para cada amostra a ser testada deve-se prever seis tubos de cultura.

Obtenção do sangue

- no caso de camundongo, promover a sangria por punção do seio orbitário (Kimura, 1993). No caso de pacientes, coletar em condições assépticas 30 ml de sangue venoso de cada indivíduo, através de tubo *vacutainer* contendo heparina sódica ou outro anticoagulante;
- no mesmo dia da coleta, o volume obtido de sangue deverá ser centrifugado em uma centrífuga clínica a 2.500 rpm por 15 min.

Processo de cultivo

Todo o procedimento deve ser realizado dentro de uma capela de fluxo laminar ou em uma sala asséptica que contenha bico de Bunsen, para evitar contaminação no momento da retirada do plasma e da lavagem da papa de hemáceas com o meio de cultura.

- após a centrifugação do sangue, retirar o plasma, que é aproveitado para sorologia, e adicionar à camada de hemáceas e leucócitos igual quantidade de meio LIT;
- promover-se uma nova centrifugação a 2.500 rpm por 20 min;
- a seguir, remover o sobrenadante, e distribuir o sedimento (hemácea e leucócitos) em seis tubos, contendo 2 ml de LIT, ou em dois tubos de plástico (50 ml) com 6 ml de meio;
- transferir os tubos semeados para uma estufa incubadora B.O.D. regulada a 28°C; os tubos devem ser homogeneizados uma vez por semana.

Período e forma de leitura

- realizar a leitura retirando-se alíquotas de 10 µl da suspensão de cada tubo e examinando-as aos 45, 60, 90 e 120 dias após o cultivo, entre lâmina e lamínula, ao microscópio ótico binocular com aumento de 400x;
- após a última leitura, os tubos que permanecerem negativos devem ser centrifugados a 2.500 rpm por 15 min para que o sedimento seja reexaminado (Bronfen et al., 1989);
- independente da comprovação de *T. cruzi* em um tubo, a pesquisa do parasita deve continuar sendo efetuada nos outros tubos provenientes do mesmo sangue, com objetivo de avaliar indiretamente a parasitemia no animal.

14.2.2 Xenodiagnóstico

Este teste parasitológico é ainda muito empregado em humanos e animais sob suspeita de atuarem como

reservatórios.

Material

- ninfas de III ou IV estágio do triatomíneo escolhido (cinco ou dez para cada caixa, a depender do uso em animais ou humanos, respectivamente)
- caixas de madeira para os triatomíneos se alimentarem
- frascos para manutenção das ninfas após a alimentação
- solução anestésica para o animal em estudo
- galinha para alimentação dos insetos aos 23 dias após o teste
- material de dissecação (duas pinças, tesoura e bastão de vidro, lâminas escavadas)
- lâminas
- lamínulas de 22 x 22 mm
- solução de PBS 0,01M
- micropipeta de 5 ml
- ponteiras descartáveis em suporte apropriado
- caixas de descarte de material com as soluções desinfetantes apropriadas
- frasco lavador com álcool
- microscópio óptico

Espécie de triatomíneo empregada

Não existe um consenso sobre qual ou quais espécie(s) vetora(s) devam ser empregadas no xenodiagnóstico. Nossa experiência tem demonstrado bons resultados na utilização da espécie *Panstrongylus megistus*, como também a importância na aplicação de uma segunda espécie, devido à diferença de susceptibilidade ao parasita entre os diferentes vetores, bem como aumento da sensibilidade (CNPq, 1974; Junqueira et al., 1989a,b; Pereira et al., 1996).

Aplicação de ninfas

- escolhida a espécie, separar quarenta ninfas de III ou IV estágio, deixar as mesmas em jejum de duas a três semanas, e acondicioná-las em quatro recipientes de madeira cobertos com filó na parte superior, conforme proposto por Schenone et al. (1968), e colocar sobre a face interna do antebraço de cada indivíduo durante 30 min (Schenone et al., 1968; Salgado, 1969; Cerisola et al., 1974; CNPq, 1974);
- no caso de animais de pequeno porte, como por exemplo camundongo e cobaia, este número deve ser reduzido para cinco exemplares; aconselha-se também imobilizar os mesmos através de uso de mesa de contenção apropriada ou anestesiá-los com ketamina ou cloridrato de tiletamina associada com cloridrato de zolazepam. Aconselha-se a mesma conduta para macacos;
- verificar o número de ninfas que se alimentaram em cada recipiente, antes de transferi-las para frascos maiores, desprezando aquelas que não ingerirem sangue. Considerar como ninfas alimentadas somente aquelas que, através da observação, apresentarem abdome distendido, independente da intensidade. Conforme Freitas (1947), deve-se conservar para o exame apenas os exemplares que sugaram sangue, independente da quantidade sugada;
- até o momento da leitura do xenodiagnóstico, manter os triatomíneos a temperatura e umidade ambientes. Aos 23 dias, contados a partir da aplicação, submetê-los a uma única alimentação em *Gallus gallus* (galinha). Segundo Dias (1933, 1940b), essa alimentação é importante para a manutenção do *T. cruzi* no vetor. Também Perlowagora-Szumlewicz & Muller (1982, 1987, 1988, 1990) demonstraram que a alimentação adicional com sangue de ave doméstica, após a infecção inicial, foi capaz de aumentar a densidade parasitária em cinco das oito espécies de triatomíneos testadas.

Leitura do xenodiagnóstico

- o exame das ninfas (Figura 1) deve ser realizado aos 30 e 60 dias ou apenas uma leitura aos 45 dias após a aplicação dos exemplares (Salgado, 1969; Perlowagora-Szumlewicz & Muller, 1987);
- obter fezes dos triatomíneos por compressão abdominal. Observar inicialmente o *pool* de fezes obtidas de duas a três espécimes e, em caso positivo, verificar através de um novo exame individual, o número de exemplares positivos
- as ninfas do *pool* de fezes em que não se detectar formas de *T. cruzi* devem ser reexaminadas individualmente, dessa vez por dissecação total de seu trato digestivo. O procedimento de dissecação consiste na retirada de todo o trato digestivo, com auxílio de duas pinças e uma tesoura, e no seu maceramento, empregando-se um bastão de vidro;
- cada conteúdo biológico (fezes e trato digestivo) obtido é depositado sobre uma lâmina, à qual acrescenta-se 5 µl de salina tamponada, pH 7,2, e cobre-se com lamínula 22 x 22 mm (Figura 1);
- essa leitura em duas fases permite que se preserve para estudos posteriores os triatomíneos que apresentem de início o conteúdo fecal positivo e, por sua vez, a dissecação torna possível detectar formas de *T. cruzi* que não estejam sendo eliminadas nas fezes (Salgado, 1969; Fuente et al., 1985). Em áreas endêmicas onde ocorra concomitantemente a espécie *T. rangeli* recomenda-se o exame da hemolinfa para diagnóstico diferencial;
- proceder a leitura ao microscópio óptico binocular com um aumento de 400x, percorrendo todos os campos em busca de formas evolutivas do *T. cruzi*.

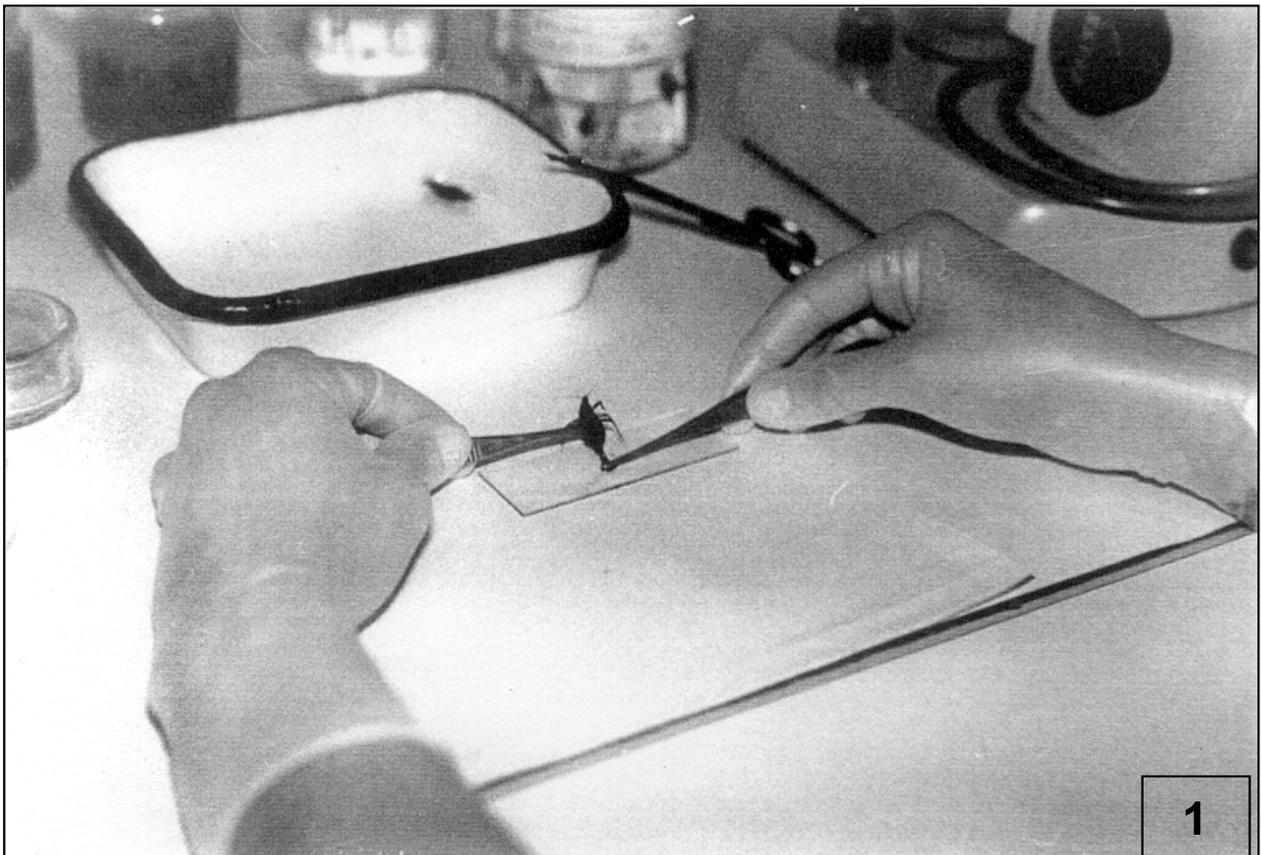


Figura 1 – Exame individual pela técnica de dissecação de um triatomíneo

14.2.3 PCR (diagnóstico molecular)

Devido à sua alta sensibilidade dentre as técnicas propostas, a PCR contribui de forma importante na detecção desse protozoário na fase crônica da doença de Chagas. A reação de PCR tem sido empregada com sucesso na detecção do *T. cruzi* em triatomíneos e camundongos (Moser et al., 1989), em sangue (Sturm et al.,

1989) e soro (Russomando et al., 1992) de pacientes chagásicos. O segmento alvo de DNA do parasita tem sido o DNA genômico ou o DNA cinetoplástico. Em ambas as circunstâncias, enfocam-se os segmentos altamente repetidos no DNA do parasita, o que amplia muito as chances de detecção do *T. cruzi*, ou parte de seu DNA nos materiais biológicos.

Método 1: Iniciadores para amplificar um segmento de kDNA

Na Fiocruz, vários laboratórios têm trabalhado em epidemiologia da doença de Chagas em diversas regiões do Brasil como Minas Gerais, Paraíba, Piauí e Amazonas. Em todas essas regiões, dados de diagnóstico molecular foram obtidos através da técnica de PCR, amplificando-se a região variável da molécula de minicírculo, um dos componentes da rede de DNA mitocondrial deste protozoário (Figura 2). A escolha deste alvo foi proposital, uma vez que essa região se encontra repetida quatro vezes por molécula circular e estas estão presentes em cerca de 10.000 cópias por célula (Degraeve et al., 1988; Sturm et al., 1989).

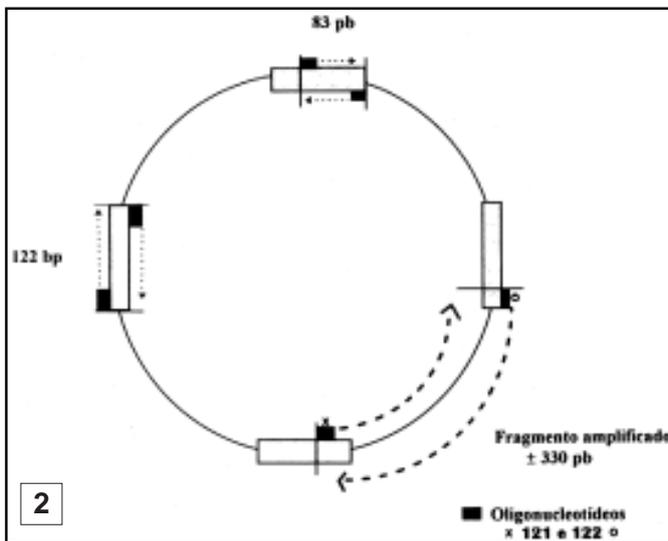


Figura 2 – Representação esquemática do minicírculo de *Trypanosoma cruzi*, mostrando a disposição simétrica das quatro regiões constantes (retângulos sombreados) e as duplas de oligonucleotídeos iniciadores específicos para PCR

O protocolo que se segue foi introduzido por Britto et al. (1993, 1995a,b) e Wincker et al. (1994a,b, 1997) e empregado para amplificação do DNA de *T. cruzi* em amostras de sangue e material fecal de triatomíneo; fez-se uso também do procedimento em amostras de líquido, cultura e fragmento mumificado de tecido. É o protocolo em uso atualmente no Depto. de Medicina Tropical do IOC.

Material

- tubos de polipropileno para coleta de sangue com solução de guanidina-EDTA
- placa de aquecimento a 70°C
- frasco com água deionizada
- banho-maria a 100°C com água fervente
- aparelho de PCR DNA Thermal Cycler 480 (para os ciclos térmicos)
- solução de fenol-clorofórmio 1:1 (v/v)
- tampão Taq Polymerase 10x
- solução de clorofórmio saturado
- Mg Cl₂ 25 mM
- solução de acetato de sódio a 3M
- nucleotídeo dATP 10 mM

- etanol absoluto
- nucleotídeo dCTP 10mM
- recipiente de isopor com gelo moído para banho de gelo
- nucleotídeo dGTP 10mM
- nucleotídeo dTTP 10 mM
- congelador a -20°C
- oligonucleotídeos 121 100 ng/μl
- micropipeta para 100, 10 e 5 μl
- oligonucleotídeos 122 100 ng/μl
- ponteiras descartáveis em suporte apropriado
- pérolas de parafina purificada
- microcentrífuga
- tubos para microcentrífuga
- cuba de eletroforese pequena
- enzima Taq Polymerase 2,5 U
- marcador de peso molecular φx174 DNA Hae III
- agarose NUSieve GTG
- soluções tampão para eletroforese
- agarose SeaKem GTG – FMC
- fonte de eletroforese
- Tris
- azul de bromofenol
- ácido bórico
- glicerol
- EDTA
- brometo de etídeo
- transiluminador UV com sistema fotográfico

Coleta da amostra a ser amplificada

- a amostra é transferida para um frasco de polipropileno contendo igual volume da solução de 6 M guanidina HCl + 200 mM EDTA (ácido etilenodiaminotetracético) pH 8,0. No caso da mostra ser sangue de indivíduo suspeito, retirar 10 ml por punção venosa, com auxílio de *vacutainer* sem anticoagulante e homogeneizar em um tubo contendo 10 ml de guanidina-EDTA. Este volume deverá ser reduzido no caso de animais de pequeno porte;
- a solução guanidina-EDTA permite que o sangue possa ser estocado por um prazo de trinta dias em temperatura ambiente, até o momento de ser transferido para o laboratório onde será processado (Avila et al., 1991). Estocar o material a 4°C até a etapa seguinte.

Isolamento do DNA do sangue coletado

Tem-se utilizado como alvo várias seqüências de DNA do parasita para a PCR. Neste protocolo a estratégia de amplificação são os minicírculos da rede de kDNA, que existem em grande quantidade, cerca de 5-20 x 10³ minicírculos de 1,42 Kb (kilobases) por *T. cruzi* (Degraeve et al., 1988; Sturm et al., 1989). Esse elevado número e a presença nas seqüências de nucleotídeos de regiões conservadas minirrepetidas permitem que apenas 0,1% dos minicírculos contidos em um único parasita seja suficiente para a visualização após a PCR (Sturm et al., 1989).

Clivagem física

Com objetivo de promover a linearização e conseqüente liberação dos minicírculos concatenados na rede de kDNA (Britto et al., 1993), os tubos contendo sangue + guanidina-EDTA deverão ser parcialmente imersos em água e fervidos por 15 minutos.

Extração

- realizar em duplicata, a partir dessa etapa, todos os procedimentos, e a cada série de cinco amostras extraídas, incluir um sangue de indivíduo comprovadamente negativo. Isso permite um monitoramento da presença de contaminantes durante as etapas da PCR (Wright & Wynford-Thomas, 1990; Kitchin & Bootman, 1993);
- para a extração do DNA de cada amostra de sangue fervido, retirar duas alíquotas de 100 µl. Cada alíquota deverá ser submetida a um processo de desproteinização empregando fenol-clorofórmio na proporção de 1:1 (v/v); clorofórmio saturado;
- precipitar a fase aquosa obtida, acrescentando-se 10% de acetato de sódio a 3 M (300 mM de concentração final), mais dois volumes de etanol e deixar 15 min em banho de gelo;
- passado esse tempo, centrifugar (centrífuga modelo 5415C, Eppendorf ou similar) o volume total a 12.000 rpm por 15 min;
- desprezar o sobrenadante e colocar o tubo contendo o sedimento sobre uma placa de aquecimento, regulada para 70°C, por um período suficiente para que evapore toda a parte líquida (gotículas de etanol) (normalmente 5 min são suficientes);
- ressuspender o sedimento em 50 µl de água deionizada (Sambrook et al., 1989) e estocar a -20°C até o momento da amplificação.

Amplificação do DNA extraído

No caso de se utilizar o procedimento *hot start*, reação de amplificação *in vitro*, os componentes químicos empregados deverão ser adicionados em duas fases, com uma separação física entre elas promovida por uma pérola de parafina especialmente formulada pela Perkin-Elmer Cetus Instruments (USA). A qualidade desse procedimento está em promover uma melhor especificidade e precisão das amplificações realizadas em amostras com baixas concentrações de seqüências-alvos, evitando a hibridização de iniciadores (*primers*) e as seqüências não-alvo (*mis-priming*), bem como a extensão de *primers* complementares que tendem a se hibridizar um ao outro (*primer dimerization*), gerando um produto amplificado inespecífico (Chou et al., 1992).

Pré-amplificação

Antes dos ciclos térmicos, os reagentes da reação são adicionados em duas fases:

1ª fase ou fase inferior

As quantidades fornecidas a seguir e na próxima fase correspondem a valores empregados em apenas uma reação de amplificação, ou seja, 7,5 µl de DNA ressuspendido.

- em um tubo de microcentrífuga, acrescentam-se os seguintes produtos

	µl
H ₂ O deionizada	11,3
Tampão Taq Polymerase 10x	4,0
Mg Cl ₂ 25 mM	13,5
Nucleotídeo dATP 10 mM	1,8
Nucleotídeo dCTP 10mM	1,8
Nucleotídeo dGTP 10mM	1,8
Nucleotídeo dTTP 10 mM	1,8
Oligonucleotídeos 121 100 ng/µl	2,0
Oligonucleotídeos 122 100 ng/µl	2,0
Total	40,0

- após homogeneização, transferir os 40µl da mistura anterior para um tubo apropriado, que possibilita a troca rápida de temperatura, e introduzir uma pérola de parafina purificada (*Ampliwax PCR Gem 100* - Perkin-Elmer);
- a seguir, com a finalidade de liqüefazer a parafina, incubar o tubo a 80°C durante 5 min com auxílio de uma placa de aquecimento;
- deixar o tubo esfriar a temperatura ambiente até a parafina se solidificar.

Utilizar os oligonucleotídeos 121 (5'-AAATAATGTACGGG(T/G)GAGATGCATGA-3') e 122 (5'-GGTTCGATTGGGGTTGGTGTAATATA-3') que apresentam a característica de se ligarem em um trecho das quatro regiões constantes dos minicírculos de *T. cruzi* e promoverem a amplificação em direção à região variável (Sturm et al., 1989) (Figura 3). Desta forma, a variabilidade genética das seqüências de minicírculos das populações de *T. cruzi* não interfere na hibridização dos oligonucleotídeos.

2ª fase ou fase superior

- em outro tubo de microcentrífuga adicionar os três últimos componentes da reação

	µl
H ₂ O deionizada	23,5
Tampão Taq Polymerase 10x	3,5
Enzima Taq Polymerase 2,5 U	0,5
Total	27,5

- promover a mistura dos elementos e a seguir transferir os 27,5 µl totais para o tubo que já contenha a fase inferior e a camada de *ampliwax*. A este acrescentar 7,5 µl de DNA ressuspendido.

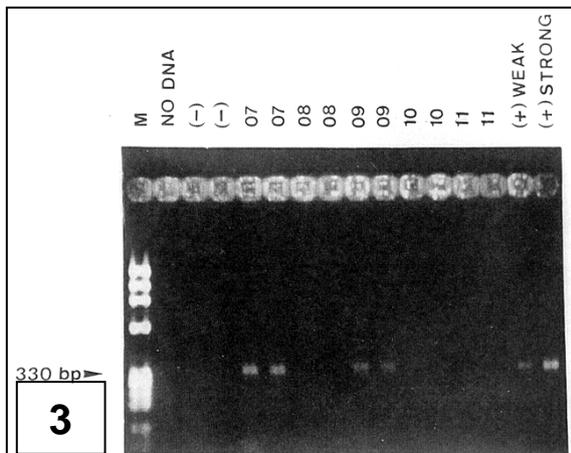


Figura 3 – Detecção de DNA por gel de agarose. O DNA foi extraído de amostras de sangue de indivíduos de área endêmica para doença de Chagas com sorologia positiva (linhas 7 a 11). M = marcadores de peso molecular; NO DNA e (-) são controles negativos; (+) *weak*, *strong* são controles positivos fraco e forte reatores

Ciclos térmicos

- introduzir os tubos, contendo os componentes das fases 1 e 2, no aparelho modelo DNA Thermal Cycler 480 (Perkin-Elmer Cetus Instruments ou similar), programado para seguir os seguintes ciclos de temperatura e tempo

Dois ciclos iniciais	98°C	1'
	64°C	2'
33 ciclos intermediários	94°C	1'
	64°C	1'
Um ciclo final	72°C	10'

Nestas condições de amplificação, a hibridização dos oligonucleotídeos iniciadores e a extensão da fita de DNA se processam entre as temperaturas de 64 e 94°C e no mesmo espaço de tempo, encurtando, com isso, a reação de amplificação para o tempo de 2h10m. A temperatura mínima de 64°C cria uma situação de alta estrigência, permitindo que os *primers* se liguem a seqüências totalmente complementares. Isso conduz a uma alta especificidade da reação. O último ciclo, de 10 minutos de duração, tem como objetivo complementar produtos de parcial extensão (Rofls et al., 1992).

Controle

A cada série de cinco amplificações em duplicata, incluímos duas alíquotas de amostras comprovadamente negativas (previamente relatado no item Extração) e mais duas positivas. A inclusão dessas amostras de sangue ou de outro material biológico, comprovadamente negativas, possibilita um controle rigoroso da contaminação, uma das maiores limitações do emprego da PCR como método de diagnóstico. Por outro lado, os controles positivos servem para avaliar a qualidade dos reagentes (Wright & Wynford-Thomas, 1990) e do próprio processo de extração, como também estimar a qualidade da reação pela intensidade relativa das bandas.

Para detectar a presença de contaminantes nos componentes da reação, introduziu-se no protocolo um tubo contendo a fase inferior e superior, mas sem produto extraído (Wright & Wynford-Thomas, 1990; Erlich et al., 1991).

Visualização do produto de reação

Para a separação e posterior identificação dos fragmentos de base resultantes da amplificação, empregar a técnica de eletroforese em gel de agarose NUSieve, por ser mais prática do que em gel de poliacrilamida além de apresentar uma resolução na faixa de peso molecular a ser visualizada (Moser et al., 1989; Avila et al., 1991, 1993).

Eletroforese

- em uma pequena cuba de eletroforese (modelo Submarine mini-gel - Sigma ou similar), adicionar 200 ml de agarose (uma parte de agarose NUSieve GTG, e outra parte de agarose SeaKem GTG - FMC BioProducts) a 2% (Mullis et al., 1986);
- após solidificação da agarose, banhar a mesma em tampão TBE 1x (tris-ácido bórico, EDTA) pH 8,3 e a seguir introduzir as alíquotas a serem corridas;
- a ordem de aplicação deverá ser a seguinte:
 - na primeira canaleta: 15 µl do marcador de peso molecular ϕ x174 DNA Hae III (Sigma)
 - nas canaletas seguintes: 15 µl de cada amostra + 2 µl do corante azul de bromofenol;
- após ocupar todas as canaletas, promover uma corrida de aproximadamente 1h30min a 70V (volts), utilizando uma fonte com duas entradas e duas saídas.

Obs: tampão de aplicação: 0,25% azul de bromofenol + 0,25% xileno-cianol FF + 30% glicerol em água.

Revelação

- corar o gel por 15 min sob um misturador (*Rocker Platform* RP-50 Elmeco ou similar) à temperatura ambiente em 5 µg/ml de brometo de etídeo diluído em tampão TBE 1x e descorar por mais 15 min em água destilada;
- passado esse tempo, transferir o gel para um transiluminador de luz ultravioleta e o fotografar para futura análise (sistema fotográfico marca Polaroid).

Obs: a visualização de uma única banda de peso molecular 330 pb indicará a presença de kDNA de *T. cruzi* amplificado, PCR positiva (Sturm et al., 1989).

Amplificação do DNA da β -globina

Nos casos em que a amostra biológica apresentar PCR negativa, realizar uma nova amplificação, empregando iniciadores específicos para o gene da β -globina humana. Essa nova amplificação permite controlar a qualidade da extração do DNA e saber se o resultado negativo não é devido a fatores inibitórios presentes no sangue (Rolfs et al., 1992).

Utilizar o mesmo protocolo citado nas etapas anteriores, exceto os oligonucleotídeos que serão substituídos por PCO3 (5'-ACACAACACTGTGTTCACTAGC-3') e PCO4 (5'-CAACTTCATCCACGTTACACC-3') (Saiki et al., 1985). O número de ciclos térmicos também deverá ser alterado para 25.

Cuidados a serem tomados durante a execução da técnica de PCR

Vários procedimentos deverão ser seguidos para evitar a contaminação das amostras submetidas a PCR (Wright & Wynford-Thomas, 1990; Sarkar & Sommer, 1990; Kitchin & Bootman, 1993):

- executar o isolamento e a amplificação do DNA em capela (*Tamer Template Tm* 14500 - Coy Corporation ou similar) e câmara de fluxo laminar (modelo 10557 - EACI ENVIRCO - Environmental Air Control Inc. ou similar) individualizadas;
- empregar materiais de consumo novos (não reciclados);
- distribuir os reagentes em pequenas alíquotas, incluído o kit com a enzima;
- utilizar apenas ponteiras protegidas com uma barreira de filtro;
- empregar tubos de microcentrifuga (modelo *Safe-lock* de 1,5 ml e 0,5 ml - Eppendorf ou similar) que apresentem um sistema de lacre para evitar extravasamento das amostras durante a homogeneização;
- todo o material permanente, incluindo os aparelhos, deverão ser “limpos” com hipoclorito de sódio e submetidos à luz ultravioleta. Utilizar as lâmpadas ultravioletas (UV) do aparelho *Stratalinker* (modelo 1800 - Stratagene) para degradação de DNA exógeno. De preferência processar todas as etapas em salas com sistema de UV no teto;
- durante toda a execução da técnica, usar luvas, que deverão ser trocadas e descartadas a cada amostra processada
- realizar o manuseio do produto amplificado em uma sala em separado, com equipamentos também individualizados e geralmente por um profissional que não tenha trabalhado na extração e preparação dos reagentes;
- na etapa da pré-amplificação, todos os tubos com os reagentes deverão ser deixados em banho de gelo até o momento de serem introduzidos na máquina de amplificação.

Método 2: Amplificação de fragmento de DNA nuclear

Extração de DNA

- isolamento de DNA de sangue total ou de soro de paciente chagásico;
- a 100 μ l de soro adicionar 200 μ l de água destilada, 50 μ l de sarkosyl a 30% e 1,5 μ l de proteínase K a 20 mg/ml. Incubar este homogenato a 60°C por 1 h;
- adicionar 30 μ l de dodecil sulfato de sódio a 10% e homogeneizar;
- extrair o DNA das amostras com fenol/clorofórmio, adicionar 20 μ g de glicogênio e precipitar com etanol;
- suspender o sedimento de DNA em 50 μ l de água e submetê-lo a PCR;
- alternativamente, para obtenção de DNA de soro de pacientes chagásicos poderá ser utilizada a precipitação térmica das proteínas do soro;
- centrifugar e pesquisar o DNA do parasita no sobrenadante, via PCR.

Reação de PCR

- a reação é realizada em 10 µl, contendo 1/100 do DNA total isolado dos 100 µl do soro ou sangue total, 250 µM de cada um dos desoxinucleosídeos trifosfatos, 10 pmoles de cada um dos *primers* e 0,2 U de Taq DNA polimerase. Os *primers* utilizados são os descritos por Diaz et al. (1992);
- a mistura de reação deve ser protegida contra evaporação por uma camada de óleo mineral (20 ml) e submetida a 25 ciclos de amplificação num termociclador;
- o perfil de temperatura para a desnaturação do DNA, anelamento dos *primers* e cópia e extensão do segmento são os seguintes, respectivamente: 95°C por 60 segundos (com um tempo inicial de 300 s a 95°C), 53°C por 90 s e 73°C por 120 s (com uma incubação final a 73°C por 300 s);
- 1-2 µl dos produtos de amplificação são separados por eletroforese em gel de agarose ou acrilamida e corados por brometo de etídeo ou nitrato de prata, respectivamente;
- o produto de amplificação esperado é um segmento de DNA de 188 pares de base;
- para se precaver de possíveis contaminações, controles internos devem sempre corridos em cada passo e amostras de soro de indivíduos normais sempre incluídas em cada partida de preparação de DNA
- este DNA obtido e estocado é usado como controle na amplificação por PCR
- um controle com todos os reagentes à exceção do DNA, também deve ser incluído em todas as partidas de amplificação. Devem também ser incluídos soros ou sangue total de pacientes com leishmaniose.

14.3 Índice de Infectividade

Esse parâmetro é calculado para a avaliação do grau de virulência e infectividade de um certo isolado de *T. cruzi*, num determinado inóculo. Com infecção de um grupo mínimo de dez animais, calcula-se o percentual de camundongos que apresentaram parasitemia positiva em qualquer dia após à infecção (número de animais que apresentaram parasitemia positiva/número total de animais inoculados, multiplicado por cem).

14.4. Parasitismo Tissular

O estudo do parasitismo tissular implica, necessariamente, no sacrifício do animal experimental; portanto, não é uma rotina a ser seguida. Quando necessário é feito pela análise de cortes histológicos de tecidos fixados ou criopreservados, nos quais os parasitas são identificados por coloração ou por reação imunocitoquímica. Quantifica-se então (a) o percentual de campos microscópicos contendo ninhos de amastigotas e/ou (b) o número de ninhos de amastigotas por área (mm²) de corte estudado. Neste caso, conta-se o número de ninhos em dez a cinquenta campos e após realizar o mesmo procedimento para quantificar a área do campo microscópico (ver item 14.1), expressa-se o resultado em ninhos/mm². Pela técnica de imunofluorescência (Capítulo 15) esse procedimento fica facilitado.

Um detalhado estudo de Hanson & Robertson (1974) mostrou que durante a fase aguda da infecção por *T. cruzi* a densidade de parasitas nos vários órgãos correlaciona-se perfeitamente com a curva de parasitemia, especialmente no coração.

14.5 Parâmetros Populacionais de Mortalidade

14.5.1 Mortalidade cumulativa

Esse parâmetro é calculado a partir da observação diária de quantos animais morrem após a infecção, indicando a cinética dessa mortalidade. É expresso sempre em percentual do número total de animais com os quais o experimento foi iniciado, excluindo-se aqueles que tiverem apresentado alguma alteração nos parâmetros de higidez (hematócrito e/ou contagem leucocitária diferencial anormais, ou problemas dermatológicos detectáveis). Pode ser expresso como percentual de mortalidade (a curva sobe) ou de sobrevida (a curva desce).

O Capítulo 20 mostra um modelo de coleta de dados para cálculo de taxas de sobrevida. A Figura 7 do Capítulo 19 mostra uma curva de mortalidade típica.

14.5.2 M_{50}

Este parâmetro M_{50} representa o dia em que morreram 50% dos animais de experimentação. É calculado a partir da planilha de mortalidade, tal como a mostrada no Capítulo 20. É comumente utilizado ao se comparar resultados de grupos de animais submetidos a diferentes gradações de um mesmo procedimento, tal como diferentes inóculos, diferentes concentrações de drogas, etc.

14.6 Parâmetros Individuais de Mortalidade e Sobrevida

14.6.1 Tempo de sobrevida

O tempo de sobrevida também é um parâmetro individual. Refere-se ao dia anterior ao da verificação da morte do animal. A análise deste parâmetro é feita *apenas com o conjunto dos animais que morrem* durante o curso do experimento. Geralmente é expresso como tempo média de sobrevida ± 1 desvio padrão ou como intervalo mínimo e máximo. Alguns autores preferem expressar variações no tempo de sobrevida como frequência (%) em relação a intervalos de tempo definidos (por exemplo semanas). Isso implica correlacionar cineticamente quando a maioria dos animais morre frente a um determinado inóculo de uma determinada cepa, exprimindo também qual a taxa de sobrevida após o tempo de estudo. Consideram-se sessenta dias como um prazo razoável para se assumir que o animal entrou na fase crônica da infecção, podendo ou não desenvolver a sintomatologia da fase crônica.

Referências Bibliográficas

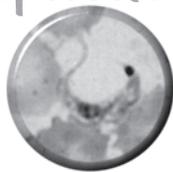
- AVILA, H. A.; PEREIRA, J. B.; THIEMANN, O.; PAIVA, E.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. M. & SIMPSON, L. Detection of *Trypanosoma cruzi* in blood specimens of chronic chagasic patients by polymerase chain reaction amplification of kinetoplast minicircle DNA: Comparison with serology and xenodiagnosis. *Journal of Clinical Microbiology*, 31:2421-2426, 1993.
- AVILA, H. A.; SIGMAN, D. S.; COHEN, L. M.; MILLIKAN, R. C. & SIMPSON, L. Polymerase chain reaction amplification of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast minicircle DNA isolated from whole blood lysates: Diagnosis of chronic Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 48:211-222, 1991.

- BIRCH, D.E.; KOLMODIN, L.; LAIRD, W. J.; MCKINNEY, N.; WONG, J.; YOUNG, K.K.Y.; ZANGENBERG, G.A. & ZOCCOLI, M. A. Simplified hot start PCR. *Nature*, 381:445-446, 1996.
- BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; MONTEIRO-VANNI, C. M.; HASSLOCHER-MORENO, A.; XAVIER, S. S.; OELEMANN, W.; SANTORO, A.; PIRMEZ, C.; MOREL, C. M. & WINCKER, P. Polymerase chain reaction detection of *Trypanosoma cruzi* in human blood samples as a tool for diagnosis and treatment evaluation. *Parasitology*, 10:241-247, 1995a.
- BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; RAVEL, C.; SANTORO, A.; BORGES-PEREIRA, J.; COURA, J. R.; MOREL, C. M. & WINCKER, P. *Trypanosoma cruzi*: parasite detection and strain discrimination in chronic chagasic patients from northeastern Brazil using PCR amplification of kinetoplast DNA and nonradioactive hybridization. *Experimental Parasitology*, 81:462-471, 1995b.
- BRITTO, C.; CARDOSO, M. A.; WINCKER, P. & MOREL, C. M. 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. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 88:171-172, 1993.
- BRONFEN, E.; ROCHA, F. S. A.; MACHADO, G. B. N.; PERILLO, M. M.; ROMANHA, A. & CHIARI, E. Isolamento de amostras do *Trypanosoma cruzi* por xenodiagnóstico e hemocultura de pacientes na fase crônica da doença de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84:237-240, 1989.
- BRUMPT, E. O xenodiagnóstico. aplicação ao diagnóstico de algumas infecções parasitárias e em particular á trypanosomose de Chagas. *Anais Paulista de Medicina e Cirurgia*, 3:97-102, 1914.
- CAMARGO, E. P. Growth and differentiation in *Trypanosoma cruzi*. I. Origin of metacyclic trypanosomes in liquid media. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 6:93-100, 1964.
- CERISOLA, J. A.; ROHWEDDER, R. W.; SEGURA, E. L.; DEL PRADO, C. E.; ALVAREZ, M. & MARTINI, G. J. W. *El Xenodiagnóstico*. 1974. Buenos Aires: Instituto Nacional de Diagnóstico e Investigación de la Enfermedad de Chagas "Dr. Mario Fatała Chaben", 111 p. (Monografía).
- CHIARI, E.; DIAS, J. C. P.; LANA, M. & CHIARI, C. A. Hemocultures for the parasitological diagnosis of human Chagas' disease in the chronic phase. In: *Anais Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*. 1979. Rio de Janeiro, 1979. Abstracts N1-N5.
- CHOU, Q.; RUSSELL, M.; BIRCH, D. E.; RAYMOND, J. & BLOCH, W. Prevention of pre-PCR mis-priming and primer dimerization improves low-copy-number amplifications. *Nucleic Acids Research*, 20:1717-1723, 1992.
- CNPq - CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO e TECNOLÓGICO. Epidemiologia da Doença de Chagas. Objetivos e Metodologia dos Estudos Longitudinais. Relatório Técnico n° 1, 1974.
- DEGRAVE, W.; FRAGOSO, S. P.; BRITTO, C.; VAN HEUVERSWEYN, H.; KIDANE, G. Z.; CARDOSO, M. A. B.; MUELLER, R. U.; SIMPSON, L. & MOREL, C. M. Peculiar sequence organization of kinetoplast DNA minicircles from *Trypanosoma cruzi*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 27: 63-70, 1988.
- DIAS, E. 1940. Chagas' disease: a comparative study of the susceptibility of four natural vectors to the experimental development of *Schizotrypanum cruzi*. In: *Third International Congress for Microbiology. New York, Abstracts of Communications*, p.164, 1939. Report of Proceedings, p. 421. 1940a apud DIAS, E., 1940c. Xenodiagnósticos Seriados em Caes Infectados com Amostras Venezuelanas de *Schizotrypanum cruzi*. *Brasil-Medico*, 52: 859-861.
- DIAS, E. *Estudos sobre o Schizotrypanum cruzi*. Tese, Doutorado em Medicina. 1933. Rio de Janeiro: Faculdade de Medicina da Universidade do Rio de Janeiro
- DIAS, E. Técnica do xenodiagnóstico na moléstia de Chagas. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 35:335-342, 1940b.
- DIAZ, C.; NUSSENZWEIG, V. & GONZALEZ, A. An improved polymerase chain reaction assay to detect *Trypanosoma cruzi* in blood. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, 46:616-623, 1992.
- ERLICH, H. A.; GELFAND, D. & SNINSKY, J. J. Recent advances in the polymerase chain reaction. *Science*, 252:1643-1651, 1991.
- FREITAS, J. L. P. *Contribuição para o Estudo do Diagnóstico da Moléstia de Chagas por Processos de Laboratório*. 1947. Tese, Doutorado em Parasitologia. São Paulo: Faculdade de Medicina da USP.
- FUENTE, C. L. A.; URJEL, R. & CORDOVA, F. Estudio comparativo entre el examen parasitologico directo y la diseccion de triatominos para la investigacion de *Trypanosoma cruzi*. *Annales de la Société Belge de Médecine Tropicale*, 65 (Suppl.1):101-102, 1985.
- HANSON, W. L. & ROBERTSON, E. L. Density of parasites in various organs and the relation to numbers of trypomastigotes in the blood during acute infections of *Trypanosoma cruzi* in mice. *Journal of Protozoology*, 21:512-517, 1974.
- JUNQUEIRA, A. C. V.; FIGUEIREDO, A. R. & COURA, J. R. Sensibilidade do xenodiagnóstico com *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans* na fase crônica da doença de Chagas. Estudo preliminar. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84 (Suppl. II):115, 1989a.

- JUNQUEIRA, A. C. V.; VELAZQUEZ, C. R. D. B. & COURA, J. R. Avaliação do rendimento do xenodiagnóstico com diferentes espécies de triatomíneos. I. Utilização de uma espécie vetora local (*Panstrongylus megistus*) em relação ao *Triatoma infestans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 22 (Suppl. II):136, 1989b.
- KIMURA, L. M. S. Manipulação Animal. In: *Manual para técnicos em animais de laboratório*, Departamento de Biotérios/Bm, 1993. Rio de Janeiro: Serviço de Multimeios do CICT/Fiocruz, p. 99-113.
- KITCHIN, P. A. & BOOTMAN, J. S. Quality control of the polymerase chain reaction. *Medical Virology*, 3:107-114, 1993.
- LUZ, Z. M. P.; COUTINHO, M. G.; CANÇADO, J. R. & KRETTLI, A. U. Hemocultura: técnica sensível na detecção do *Trypanosoma cruzi* em pacientes chagásicos na fase crônica da doença de Chagas. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 27:143-148, 1994a.
- LUZ, Z. M. P.; GALVÃO, L. M. C.; COUTINHO, M. G.; CANÇADO, J. R. & KRETTLI, A. U. Changes in the hemoculture methodology improve the test positivity. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89 (Suppl.I):53, 1994b.
- MOSER, D. R.; KIRCHHOFF, L. V. & DONELSON, J. E. Detection of *Trypanosoma cruzi* by DNA amplification using the polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology*, 27:1477-1482, 1989.
- MULLIS, K. B. & FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in Enzymology*, 155:335-350, 1987.
- MULLIS, K.; FALOONA, F.; SCHARE, S.; SAIKI, R.; HORN, G. & ERLICH, H. Specific Enzymatic Amplification of DNA *In Vitro*: The Polymerase Chain Reaction. *Cold Spring Harbor Simp. Quant. Biol.*, 1:263-273, 1986..
- PEREIRA, J. B.; JUNQUEIRA, A. C. V.; SANTOS, L. C.; CASTRO, A. F.; ARAÚJO, I. B. & COURA, J. R. Xenodiagnóstico na doença de Chagas crônica. I - Sensibilidade de *Panstrongylus megistus* e *Triatoma infestans*. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 29:341-347, 1996.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MULLER, C. A. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 1-Comparative xenodiagnosis with nine triatomine species of animals with acute infections by *Trypanosoma cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 77:37-53, 1982.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A. & MULLER, C. A. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 2-Attempts to upgrade the reliability and the efficacy of xenodiagnosis in chronic Chagas' disease. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 82:259-272, 1987.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; MULLER, C. A. & MOREIRA, C. J. C. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 3-On the interaction of vector species and parasite strain in the reaction of bugs to infection by *Trypanosoma cruzi*. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 22:90-400, 1988.
- PERLOWAGORA-SZUMLEWICZ, A.; MULLER, C. A. & MOREIRA, C. J. C. Studies in search of a suitable experimental insect model for xenodiagnosis of hosts with Chagas' disease. 4-The reflection of parasite stock in the responsiveness of different vector species to chronic infection with different *Trypanosoma cruzi* stocks. *Revista de Saúde Pública de São Paulo*, 24: 65-177, 1990.
- PIZZI, T.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. & NEGME, A. Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de la laucha a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Biologica*, 8-11:43-53, 1998.
- ROLFS, A.; SCHULLER, I.; FINCKH, U. & WEBER-ROLFS, I. *PCR: Clinical Diagnostics and Research*. 1992. Berlin Heidelberg: Springer-Verlag.
- RUSSOMANDO, G.; FIGUEREDO, A.; ALMIRÓN, M.; SAKAMOTO, M. & MORITA, K. Polymerase chain reaction-based detection of *Trypanosoma cruzi* DNA in serum. *Journal of Clinical Microbiology*, 30:2864-2868, 1992.
- SAIKI, R. K.; SCHARE, S.; FALOONA, F.; MULLIS, K. B.; HORN, G. T.; ERLICH, H. A. & ARNHEIM, N. Enzymatic amplification of β -globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*, 230:1350-1354, 1985.
- SALGADO, A. A. Consideraciones sobre metodologia y sensibilidad del xenodiagnóstico. *Boletino Chileno de Parasitologia*, 24:9-13, 1969.
- SAMBROOK, J.; FRITSCH, E. F. & MANIATIS, T. *Molecular Cloning: Laboratory Manual*. 1989, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed., Book 01.
- SANTOS, A. H.; SILVA, I. G. & RASSI, A. Estudo comparativo entre o xenodiagnóstico natural e o artificial, em chagásicos crônicos. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28:367-373, 1995.
- SARKAR, G. & SOMMER, S. S. Shedding light on PCR contamination. *Nature*, 343:27, 1990.
- SCHENONE, H.; ALFARO, E.; REYES, H. & TAUCHER, E. Valor del xenodiagnóstico en la infección chagásica crónica. *Boletino Chileno de Parasitologia*, 23:149-154, 1968.

- STURM, N. R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. M. & SIMPSON, L. Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplast minicircle DNA sequences: Use in diagnosis of Chagas' disease. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 33:205-214, 1989.
- WINCKER, P.; BOSSENO, M. F.; BRITTO, C.; YAKSIC, N.; CARDOSO, M. A.; MOREL, C. M. & BRENIÈRE, S. F. High correlation between Chagas' disease serology and PCR-based detection of *Trypanosoma cruzi* kinetoplast DNA in Bolivian children living in an endemic area. *FEMS Microbiology Letters*, 124:419-424, 1994a.
- WINCKER, P.; BRITTO, C.; PEREIRA, J. B.; CARDOSO, M. A.; OELEMANN, W. & MOREL, C. M. Use of a simplified polymerase chain reaction procedure to detect *Trypanosoma cruzi* in blood samples from chronic chagasic patients in a rural endemic area. *American Journal of Tropical Medicine & Hygiene*, 51:771-777, 1994b.
- WINCKER, P.; TELLERIA, J.; BOSSENO, M. F.; CARDOSO, M. A.; MARQUES, P.; YAKSIC, M.; AZNA, C.; LIEGEARD, P.; HONTEPEYRIE, M.; NOIREAU, F.; MOREL, C. M. & BRENIERE, S. F. PCR-based diagnosis for Chagas disease in Bolivian children living in an active transmission area: Comparison with conventional serological and parasitological diagnosis. *Parasitology*, 114:367-373, 1997.
- WRIGHT, P. A. & WYNFORD-THOMAS, D. The polymerase chain reaction: Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. *Journal of Pathology*, 162:99-117, 1990.

Capítulo 15



Quantificação de Marcadores Humorais de Inflamação, de Resposta Imune e de Lesão Tissular nos Animais Infectados

Tania C. Araújo-Jorge, Paulo R. Z. Antas & Solange Lisboa de Castro

Devido à heterogeneidade da doença tanto em camundongos como em humanos, os parâmetros parasitológicos (parasitemia, tempo de sobrevivência, mortalidade) e imunológicos específicos (ativação de células T por antígeno de *Trypanosoma cruzi* e anticorpos antiparasita) podem não se correlacionar diretamente com o grau de lesão. O acompanhamento de parâmetros inflamatórios e do desenvolvimento de lesões tissulares durante o curso da infecção por *T. cruzi* pode ser bastante informativo.

Como foi discutido nos Capítulos 4 e 9, diferentes aspectos da resposta inflamatória e imune podem ser estudados experimentalmente em camundongos infectados pelo *T. cruzi*. A avaliação dos níveis ou da atividade de diferentes componentes destas respostas é feita em material colhido dos animais em diferentes tempos após a infecção, seja por acompanhamento individual de um mesmo animal por longo tempo, quando apenas sangue, fezes e urina podem ser colhidos, seja por sacrifício do animal, quando então células provenientes de diferentes tecidos podem ser analisadas, bem como seus produtos de secreção.

O sangue é um material valioso, especialmente para a análise dos componentes humorais das respostas inflamatória e imune. Plasma ou soro podem ser obtidos, a depender do uso ou não de anticoagulantes, respectivamente. Dosagens de imunoglobulinas totais e específicas, em seus diversos tipos e isotipos, de complexos imunes, de citocinas, de proteínas de fase aguda, de moléculas de adesão solúveis, de enzimas, de metabólitos de nitrogênio (por exemplo, óxido nítrico), sais e outros oligoelementos, são parâmetros que podem ser pesquisados e acompanhados no plasma ou no soro, tanto individualmente como em agrupamentos de *pool*. Os procedimentos para coleta de sangue, plasma ou soro já foram descritos no Capítulo 13. No presente capítulo vamos nos concentrar nos procedimentos para análise de marcadores humorais de inflamação e de resposta imune ativas, bem como de lesão muscular e miocárdica.

Partimos então do pressuposto que o experimento foi realizado e foi colhido sangue de animais individuais, que rendeu, por animal, até 30 μ l de plasma ou soro por sangria na cauda ou no plexo orbitário, ou até 500 μ l por sangria com punção cardíaca. O material pode ser analisado individualmente ou em *pool*.

Vamos nos deter em ensaios que utilizam espectrofotômetro de microplacas (leitor ELISA) por considerá-los extremamente práticos e confiáveis, e disponíveis na maioria dos laboratórios de pesquisa em imunoparasitologia. Serão descritos protocolos para:

ELISA

- sorologia específica (convencional) e não específica (resposta humoral)
- dosagem de proteínas de fase aguda: SAP (resposta inflamatória)
- dosagem de citocinas: IFN- γ e TNF- α (respostas inflamatória e humoral)

Ensaio em microplaca

- dosagem de CK e CKMB (lesão tissular)

15.1 ELISA: Sorologia Específica (Convencional), Não Específica e Proteínas Séricas Diversas

O método de ELISA (*enzyme linked immunosorbent assay*) é um ensaio imunoenzimático, onde se aproveita, entre outras coisas, o princípio de interação antígeno-anticorpo (Ag-Ac). Este princípio tem como fundamentos:

- todo Ag tem a propriedade de gerar, *in vivo*, um Ac, dado por sua própria nomenclatura (*antigen = antibody generator*);
- todo Ag tem uma alta constante de afinidade (Kd) por seu Ac;
- epitopos antigênicos de uma molécula geram distintos anticorpos (Acs) para si;
- uma vez ligados, Acs e Ags dificilmente podem ser separados, graças às interações que ocorrem;
- dado o princípio de maturação da afinidade, certos Acs serão o “espelho” dos Acs que os geraram.

O método de ELISA se constitui essencialmente de uma hierarquia de interações Ag=Ac, onde em cada etapa temos atuando os mesmos fundamentos. Esta hierarquia (ou “pirâmide”) está calçada em um suporte, ou matriz, que geralmente é uma placa de poliestireno, material ideal para a primeira ligação (revestimento). Uma vez ligado à placa, dificilmente se consegue reverter a interação, daí as placas para ELISA serem descartáveis.

Após sucessivas etapas, onde se varia grandemente o pH, o último procedimento também se baseia em outra propriedade, esta agora um fundamento bioquímico:

- toda enzima possui o seu substrato e com ele poderá interagir, respeitando-se o pH, a temperatura, o tampão e os co-fatores necessários à reação.

No final do experimento, pode-se observar uma cor intensa nas cavidades da placa, o que se considera um padrão de positividade. Porém nuances de cor também ocorrem, até se chegar ao transparente, ou branco. Para se quantificar essas diferenças, usa-se um aparelho do tipo espectrofotômetro para microplaca (*ELISA reader*), para se distinguir o gradiente de cor, que quantificará a densidade óptica (DO) de cada poço da placa, comparando esta a do ar ou a de outro poço que seja definido como padrão negativo de reação. Os aparelhos mais modernos acoplam-se a programas computadorizados para cálculos diversos, que podem definir limiares, tirar médias, fazer regressões lineares e logarítmicas e calcular automaticamente a concentração de um poço-teste quando fornecida a de uma curva-padrão referência. Destacaremos os protocolos para a obtenção dos dados e trataremos apenas brevemente da análise dos dados gerados.

As etapas gerais de um ELISA são:

- revestimento das placas com o Ag ou o Ac de captura;
- bloqueio de sítios inespecíficos de ligação na placa;
- incubação com o material para teste e padrões para serem capturados;
- incubação com o Ac para revelação da ligação do antígeno ou anticorpo capturado;

- revelação desse Ac (direta, se estiver diretamente conjugado à enzima traçadora, ou indireta, se depender de outra etapa de revelação ou amplificação), através de um ensaio de atividade enzimática com o substrato apropriado para a enzima usada como marcadora do Ac;
- leitura no espectrofotômetro e análise dos resultados.

Em qualquer ELISA os tampões utilizados nas diferentes etapas visam variar o pH.

- pH 9,6: o pH alcalino é o ideal para a sensibilização e o bloqueio da placa, uma vez que a ligação de proteínas à placa de poliestireno é facilitada neste pH. Pode-se adicionar azida sódica (NaN_3) como agente preservativo no tampão nestas etapas, pois ainda haverá muitas lavagens antes da incubação com o anticorpo conjugado à enzima;
- pH 7,0 - 7,4: o pH neutro é empregado a partir da lavagem da placa, até a incubação com o substrato;
- pH 4,0 - 4,2: o pH ácido é o ideal para que a peroxidase clive a H_2O_2 . Deve ser ajustado de acordo com a enzima utilizada como traçador.

Utilizam-se três tipos básicos de ELISA, cujos princípios são:

- *captura*: baseia-se no uso de um Ag aderido à placa, *para a captura dos Acs* por ele gerados. É o ELISA empregado em sorologias de rotina.
- *sanduíche*: baseia-se na formação seqüencial de um “sanduíche” de Ac-Ag-Ac, quando as placas são revestidas com um anticorpo muito específico *para a captura de um Ag específico*. Necessita um par de Acs bem específicos para o Ag que se quer detectar, gerados em animais de espécies diferentes. É o ELISA usado para a dosagem de Acs circulantes, imunocomplexos, citocinas, proteínas séricas, anticorpos idiotípicos e antiidiotípicos. etc.
- *competitivo*: este ELISA se fundamenta na competição entre um Ag solúvel, que se quer quantificar, e outro com as mesmas características e especificidades, com o qual se revestiu a placa, por um Ac específico para esse Ag. Substitui o ELISA sanduíche quando não se dispõe de um par de Acs, mas sim de um Ac específico e do Ag purificado.

Muitos sistemas já são comercializados em forma de *kits* para a dosagem de diversas proteínas, bem como para o sorodiagnóstico de certas infecções. Na maioria dos *kits* a placa já vem sensibilizada e bloqueada, iniciando-se as reações na terceira etapa.

As enzimas mais utilizadas em ensaios ELISA são peroxidase e fosfatase alcalina. Descreveremos protocolos com o uso de peroxidase, mas que podem ser adaptados para o uso de conjugados marcados com outras enzimas. O substrato para peroxidase é tetra-metil-benzidina (TMB), que dá um produto de reação azul, lido a 450 nm. O substrato para fosfatase alcalina é o nitro-fenil-fosfato (NPP), que dá um produto amarelo, lido a 405 nm. Um cuidado importante é não utilizar azida nestas últimas etapas, pois ela inibe a ação da peroxidase.

Descrevemos a seguir o material de uso geral para ELISA, seguido de protocolos de preparo de Ag para sorologia específica anti *T. cruzi* ou então de sistemas de ELISA para quantificação de imunoglobulinas ou isotipos totais, proteínas de fase aguda e citocinas que podem indicar a evolução da resposta inflamatória e imune.

Material

- protocolo de distribuição das amostras na placa (sempre em triplicata, e sem esquecer poços controles para PBS -branco)
- placas de poliestireno ELISA fundo chato (existem placas apropriadas para melhor adsorção do Ag)
- tubos de microcentrífuga
- placas de microtitulação para diluição, fundo em U
- micropipetas monocal e multicanal de 20 a 200 μl
- ponteiros para as micropipetas, em suportes adequados
- cubas para as soluções de Ac
- recipiente para tampão de lavagem

- filme plástico de PVC
- papel ou tecido absorvente
- cuba para descarte de líquidos
- cuba para neutralização de placas acidificadas
- estufa ou banho-maria para incubação a 37°C
- leitor espectrofotométrico de microplacas
- um sistema de aspiração/lavagem de placas é recomendável, composto por bomba de vácuo, recipiente para tampão de lavagem e sistema para distribuição para lavadora automática
- todos os Acs conjugados a enzimas ou outros traçadores precisam ser prévia e periodicamente titulados e aliqüotados, além de ter sua especificidade previamente testada.

A Tabela 1 mostra as soluções utilizadas no ELISA. Quando se prepara um ELISA com 50 µl de Ag/poço, calcula-se um consumo de 6 ml/placa. Para 100 µl/poço, calcula-se um consumo de 12 ml/placa

Tabela 1 – Soluções usadas para ELISA

Soluções	Sigla	pH	Concentração		Função
			Estoque	Uso	
Tampão carbonato de sódio	TCO ₄	9,6	1 M (10x)	0,1 M	Sensibilização
BSA - albumina bovina	BSA	9,6		1%	Bloqueio
Leite desnatado (comercial)	LDN	9,6		4%	Bloqueio
Tampão fosfato	TPO ₄	7,2-7,4	1 M (10x)	0,1 M	Incubação
Tampão fosfato-salina ¹ +0,05 % Tween 20	PBS-T	7,2-7,4		0,1 M	Lavagens/ diluição
Tampão citrato-fosfato	TCP	4,0	1 M (10x)	0,1 M	Revelação
TMB em DMSO	TMB		10 mg/ml		Revelação
H ₂ O ₂ em água	H ₂ O ₂		3 %	0,006 %	Revelação
Ácido sulfúrico (H ₂ SO ₄)	STOP	1,0	6,6 M	6,6 M	Interrupção
Hidróxido de sódio (NaOH)	Soda	12	0,1 M	0,1 M	Neutralização

¹solução NaCl 0,85% (154 mM)

15.1.1 Sorologia específica anti *T. cruzi* por ELISA

Preparo de Antígeno

a. Parasita fixado em paraformaldeído

Pode-se usar quaisquer dos estágios do *T. cruzi* como Ag particulado para captura de imunoglobulinas anti *T. cruzi*. Os métodos que dão maior rendimento de parasitas são os mais comumente empregados (ver Capítulo 10): cultura de epimastigotas em meio LIT, metacicloênese para obtenção de tripomastigotas metacíclicos em meio definido, cultura de células para obtenção de amastigotas ou tripomastigotas. Podem ser utilizados em reações de imunofluorescência (10³ a 10⁵/poço) ou ELISA (2 x 10³ a 2 x 10⁵ células/poço). Os antígenos particulados favorecem especialmente a captura de IgM, pois os epitopos de carboidratos, muito reativos a IgM, são preservados.

Com qualquer dos procedimentos para obtenção dos parasitas, para serem utilizados como Ag, após sua obtenção eles deverão passar pelas seguintes etapas:

- lavar 2x em tampão;
- fixar em paraformaldeído 1% por 15 min ou 0,1 % por 24 h;
- lavar 2x em tampão;
- contar o número de parasitas em câmara de Neubauer;
- ajustar a concentração para 10^8 parasitas/ml (100X concentrado);
- preparar alíquotas para uso (5×10^4 parasitas/poço, em 50 μ l): 6 ml de suspensão a 10^6 parasitas/ml para cada placa de ELISA ou 5 ml de suspensão a 5×10^6 parasitas/ml para dez lâminas de imunofluorescência (5 μ l/poço nas lâminas).

Obs: um cuidado adicional pode ser tomado, com o tratamento inicial das placas com etanol 70% por 10 minutos, seguido de descarte do etanol e secagem com vento (secador de cabelos).

b. Ags solúveis de *T. cruzi* (congelamento e descongelamento)

Para a quantificação de IgG e outros isotipos de Ig, costuma-se dar preferência ao uso de frações antigênicas solúveis dos parasitas, epi-, ama- ou tripomastigotas. São preparados como se segue:

- obter os parasitas (2×10^9 células/ml);
- lavar 3x em solução salina com centrifugação a 2.000g;
- ressuspender 1:3 em água destilada;
- realizar três a cinco ciclos de congelamento e descongelamento, utilizando-se banhos de nitrogênio líquido ou gelo seco alternado com banho-maria a 37°C;
- centrifugar a 26.000 g por 1 h a 4°C;
- recuperar o sobrenadante;
- dialisar o sobrenadante contra PBS pH 7,4;
- quantificar o teor de proteína (medida da DO a 280 nm);
- liofilizar (optativo) ou alíquotar a 10-100 μ g/ml em PBS com 0,1% de azida sódica, mas sem detergente nem proteína extra.

Obs: o Ag é utilizado a 1 a 10 μ g/ml, num volume de 50 μ l para os poços nas placas ELISA.

Existem outros protocolos para preparo de Ags de *T. cruzi*, por processos variáveis de extração química e, mais recentemente por produção de Ags recombinantes. Os métodos acima citados são os que fornecem Ags brutos para captura de Acs, o que pode levar à reações cruzadas com infecções por outros tripanosomatídeos, mas que são absolutamente úteis e suficientes para a avaliação da resposta imune humoral de animais experimentalmente infectados.

Anticorpos anti-isotipos conjugados a enzimas

O Ag de *T. cruzi* usado vai capturar Igs dos diversos isotipos, e a sorologia determinará Ig total, IgG, IgM ou qualquer outro isotipo que se pretenda investigar, a depender do Ac utilizado na etapa de detecção e revelação da imunoglobulina capturada. Muitos fabricantes comercializam Acs (simples e conjugados a enzimas) para esta finalidade. Para um ELISA mais rápido, recomenda-se que este Ac anti Ig ou isotipo de camundongo já seja conjugado com peroxidase. É importante o teste prévio de reatividade do conjugado enzimático tanto ao Ag usado para sensibilizar a placa, como ao agente usado para bloqueio. Às vezes, em função dessa reatividade cruzada, que leva a altas leituras nos poços controles sem o soro teste, é necessária a mudança do bloqueador, de BSA para leite desnatado, ou para soro normal da espécie em que foi obtido o conjugado. É importante também que o conjugado seja previamente titulado com diluições seriadas sobre placas revestidas com soro normal de camundongo 10%.

Procedimento para sorologia anti *T. cruzi*

A Tabela 2 resume a seqüência de etapas do ELISA para a sorologia anti *T. cruzi*. Para esse procedimento seqüencial, ressaltamos as seguintes observações:

- as soluções estoque dos Ags devem ser alíquotadas em volumes suficientes para até cinco placas, em PBS. Evitar congelar e descongelar repetidamente as mesmas alíquotas. Pode-se adicionar 0,1% de azida sódica (NaN_3) como preservativo para evitar contaminação (concentração final de uso: 0,01%);
- a etapa de sensibilização pode ser feita no dia anterior, com a incubação das placas com o Ag na geladeira. Não é necessária lavagem da placa antes do bloqueio;
- a solução de bloqueio pode variar e deve ser testada para cada ELISA durante sua padronização. Pode-se usar BSA 1%, leite desnatado 4%, ou glicina 1%. Verter a placa com o Ag, bater sobre tecido absorvente e colocar a solução de bloqueio;
- as placas sensibilizadas e bloqueadas podem ser estocadas na geladeira, mas sua eficácia para capturar o Ag deve ser testada para determinação do prazo de validade;
- para todas as etapas de lavagem (três vezes) é preciso verter a solução final de tampão, bater bem a placa em tecido absorvente para retirar o excesso;
- opcionalmente, pode-se proceder nas etapas de incubação com PBS-T, obtendo-se a mesma eficácia.

Tabela 2 – Etapas seqüenciais na realização do ELISA de captura

Etapa	Tampão	Volume ($\mu\text{l}/\text{poço}$)	Tempo	IgM	IgG
Sensibilização (Ag)	TCO_4	50	18 h	1:500 ¹	1:1000 ²
Bloqueio	TCO_4	100	2 h	BSA	BSA
Lavagem	PBS-T	encher			
Soros	PBS	50	2 h	1: 50 ³ 1: 250 ⁴	1:100 ³ 1:500 ⁴
Lavagem	PBS-T	encher			
Antiisotipo peroxidase	PBS	50	1 h	titulável	titulável
Lavagem	PBS-T	encher			
Substrato	TCP	50	variável		
Final	STOP	50	instantâneo		

¹Ag Epi fixado; ²Ag solúvel; ³para soro de camundongo; ⁴para soro humano

15.1.2 Captura de Ig's totais e isotipos para sorologia não específica (ELISA sanduíche)

Uma das características clássicas da infecção experimental por *T. cruzi* é a ativação policlonal e a hipergamaglobulinemia poliisotípica (ver Capítulo 4), com destaque para os isotipos IgG2a e IgG2b. O sistema mais simples de monitoramento deste processo é o ELISA sanduíche, como descrito no item 15.1.

Material

- os mesmos reagentes usados para ELISA (Tabela 1)
- imunoglobulina purificada para construção de curva padrão (opcional); a opção simples para cálculo das variações nos níveis de Ig's observadas a diferentes dias pós-infecção é o cálculo da razão entre a DO obtida com as amostras infectadas em relação à DO média de amostras colhidas dos animais antes da infecção, ou de controles não infectados com a mesmo tempo de cativeiro e experimentação que os infectados
- pares de anticorpos para o sanduíche (Tabela 3)

Tabela 3 – Pares de anticorpos para a sorologia não específica

Ig a ser dosada	1º anticorpo (placa)	2º anticorpo ¹	Conjugado-enzima ²
Ig total	Policlonal de coelho anti Ig total de camundongo	Policlonal de cabra anti Ig total de camundongo adsorvido para Ig de coelho	Coelho anti IgG de cabra PO
IgG	Policlonal de coelho anti Ig G de camundongo	Policlonal de cabra anti Ig total de camundongo adsorvido para Ig de coelho	Coelho anti IgG de cabra PO
Isotipos: IgM, IgG1, IgG2a, IgG2b, IgG3, IgD, IgE, IgA	Monoclonal de rato antiisotipo de camundongo	Policlonal de coelho ou cabra anti Ig total de camundongo pré adsorvido para IgG ou IgM de rato, segundo o isotipo do monoclonal usado como 1º Ac	Rato anti IgG de coelho PO ou rato anti IgG de cabra PO adsorvido para Ig de camundongo

PO: peroxidase

¹ deve ser específico para Ig de camundongo, com um mínimo de reação cruzada para o 1º Ac

² deve ser específico para o 2º Ac, com um mínimo de reação cruzada para o 1º Ac e para Ig de camundongo

Procedimento

De um modo geral é necessário primeiro um ajuste do protocolo aos títulos dos Acs disponíveis, cumprindo-se sempre o seguinte conjunto de experimentos preliminares (padronização dos ensaios):

- curva de titulação do Ac conjugado à peroxidase frente a soro normal das várias espécies que serão usadas no ensaio (o 1º e o 2º Acs e o soro de camundongo). A melhor diluição é a que fornece menor leitura sobre o 1º Ac e sobre o soro de camundongo, e maior sobre o 2º Ac
- curva de sensibilização: diluições seriadas do 1º Ac com concentrações fixas dos demais reagentes nas etapas posteriores
- curva de detecção: diluições seriadas do 2º Ac com concentrações fixas dos demais reagentes nas etapas anteriores e posteriores
- curva de titulação das amostras de camundongo, com uma amostra sabidamente positiva e outra sabidamente negativa, para a escolha das melhores três diluições onde as diferenças de leitura de DO entre positivos e negativos possam ser máximas.

Uma vez estabelecidas as concentrações ideais para cada etapa, procede-se ao ELISA com a seqüência de etapas enumeradas na Tabela 4.

Tabela 4 – Etapas seqüenciais no ELISA sanduíche

Etapas	Tampão	Volume (µl/poço)	Tempo	Reagente/diluição
Sensibilização (1ºAc)	TCO ₄	50	1-18 h	1/10.000 a 1/1.000.000
Bloqueio	TCO ₄	100	1- 2 h	BSA
Lavagem	PBS-T	Encher		
Soros	PBS	50	2 h	1/1.000 a 1/40.000 dependendo do isotipo
Lavagem	PBS-T	Encher		
Sanduíche (2º Ac)	PBS	50	1 h	Titulável (comumente 1/1000)
Lavagem	PBS-T	Encher		
Conjugado-PO	PBS	50	1 h	Titulável (comumente 1/1000)

As demais etapas de revelação da peroxidase (PO) seguem como na Tabela 2.

15.1.3 Dosagem de proteínas de fase aguda: SAP (ELISA de captura)

A detecção de proteínas de fase aguda no plasma de animais infectados é indicativa do início da resposta imune inata (ver Capítulo 4), e indicativas da ação de IL-6, IL-1 e TNF- α . Como não existem reagentes comerciais disponíveis para a maioria destas proteínas no modelo murino, descreveremos apenas um ELISA simples para a quantificação dos índices de variação de SAP (proteína amilóide P sérica), o principal reagente de fase aguda no camundongo, com a ressalva de que nem todas as linhagens de camundongos desenvolvem níveis semelhantes de aumento de SAP (ex.: C3H, Balb/C). A SAP apresenta-se em níveis indetectáveis nos animais normais e aumenta de 10 a 1.000 vezes após a primeira semana de infecção na linhagem C57BL/6, que é tipicamente boa respondedora para SAP. É bastante comum pesquisadores que trabalham com esta e outras proteínas de fase aguda cederem, de bom grado, soros produzidos experimentalmente em seus laboratórios para a montagem de sistemas de detecção e quantificação.

Material

- os mesmos reagentes usados para ELISA (Tabela 1)
- soro ou Ac purificado anti SAP (fonte comercial: Calbiochem; IgG de coelho anti SAP): titular previamente ante SAP purificada ou a plasma de camundongo C57BL/6 após sete a dez dias de infecção
- conjugado específico para revelar o anti SAP (cabra anti IgG de coelho) e com mínima reação cruzada com soro de camundongo

Procedimento

Nesse ELISA revestimos as placas com diferentes diluições do soro de camundongo a ser testado (em uma analogia com Western blot) e detectamos a presença da proteína.

Tabela 5 – Etapas para dosagem de SAP

Etapa	Tampão	Volume (μ l/poço)	Tempo	Diluição
Sensibilização (SAP no plasma em conc. desconhecida)	TCO ₄	50	1-18 h	1/25, 1/50, 1/100, 1/200, 1/400
Bloqueio	TCO ₄	100	1-2 h	Leite desnatado a 4%
Lavagem	PBS-T	Encher		
Revelação (Ac anti SAP)	PBS	50	2 h	Titulável (comumente 1/1000)
Lavagem	PBS-T	Encher		
Conjugado-PO	PBS	50	1 h	Titulável (comumente 1/1000)

PO: peroxidase

15.1.4 Dosagem de citocinas: INF- γ e TNF- α

A dosagem de citocinas no plasma ou soro pode ser hoje feita de rotina com *kits* comerciais para ELISA que fornecem resultados confiáveis e reprodutíveis, com base no princípio do ELISA de captura descrito no item 15.2.2. A diferença é que estes *kits* geralmente utilizam Acs monoclonais contra as citocinas-alvo (e portanto extremamente específicos) como 1^o e 2^o Acs, e constroem sempre uma curva padrão com a citocina recombinante em concentrações conhecidas. Além disso, se o 2^o Ac for biotilado ele pode ser obtido da mesma espécie do 1^o Ac, e a revelação pode ser feita pela incubação com estreptoavidina(EA)-peroxidase, o que minimiza muito a reação cruzada de fundo, posto que a EA não reage (ou apenas minimamente) com as imunoglobulinas usadas

para o sanduíche, nem com possíveis contaminantes no plasma testado. O uso de Acs monoclonais dos *kits* comerciais pode ser substituído pelos mesmos Acs, pois pode-se obter os respectivos hibridomas produtores seja comercialmente (ATCC ou outro banco comercial de células) ou por intermédio de cessão por pesquisadores da área, e usá-los para padronizar ensaios sob a forma de sobrenadantes ou de ascites.

As citocinas mais comumente monitoradas, que apresentam aumento na fase aguda em todos os modelos experimentais já testados são IFN- γ e TNF- α . Alguns ensaios de atividade funcional das citocinas também podem ser de interesse, mas não serão objeto desse manual, e recomenda-se a procura de literatura específica (*Current Protocols in Immunology*, 1991, ou *Immunology Methods Manual - A Comprehensive Sourcebook of Techniques*, 1997, ou *Methods in Cell Biology* vol. 49, 1995).

Os mesmos materiais e procedimentos descritos no item 15.2.2 são utilizados para a dosagem de IFN- γ e TNF- α com as diferenças dos Acs. A Tabela 6 sumariza alguns dos Acs usados para essa finalidade.

Tabela 6 – Anticorpos usados

Citocina	1º Anticorpo	2º Anticorpo	Curva padrão	Dil. do plasma
IFN- γ	R4-6A2 (rato anti IFN- γ de camundongos)	17.17.24 (rato anti IFN- γ de camundongos)	IFN- γ recombinante (0-20ng/ml)	1/2-1/10
TNF- α	MP6-XT22 (rato anti TNF- α de camundongos)	MP6-XT3 (rato anti TNF- α de camundongos)	TNF- α recombinante (0-20ng/ml)	1/2-1/10

15.2 Ensaios em Microplaca: Dosagem CK e CKMB

É bem conhecido que, em processos patológicos, danos tissulares são acompanhados por liberação de enzimas na corrente sanguínea e que a identificação de isoenzimas correspondentes revela a fonte de tecido específico que foi danificado, e portanto no qual o processo patológico está em curso. Uma série de estudos feitos por Teresa Mercado analisando bioquimicamente a expressão de diversas isoenzimas nos tecidos de camundongos infectados indicaram que aumentos substanciais de creatino fosfoquinase total (CK), bem como de suas isoformas típicas de músculo esquelético (CK-MM) e cardíaco (CK-MB) podem ser observadas. Adaptamos o método de dosagem laboratorial de CK e CKMB humanas para volumes menores disponíveis em análises individuais de camundongos e confirmamos que seu aumento pode ser indicativo de lesão tissular ativa. O protocolo que usamos atualmente é o seguinte:

Material

- amostras de plasma ou soro, mantidas congeladas a -20°C
- *kit* comercial para dosagem de CK-MB humana sérica (Merck)
- placas de microtitulação para diluição, fundo em U
- protocolo de distribuição das amostras na placa (em duplicata, e sem esquecer poços controles para PBS - branco)
- micropipetas monocanal e multicanal de 20 a 200 μl
- papel de filtro no tamanho das placas embebido em água
- ponteiros para as micropipetas, em suportes adequados
- cubas para as soluções
- leitor espectrofotométrico de microplacas com filtro a 340 nm

Obs 1: é recomendável um sistema de leitura cinética das placas no leitor

Obs 2: os ensaios devem ser feitos em duplicatas

Procedimento

- preparar protocolo de aplicação dos plasmas na placa, com a cinética a ser estudada sempre em colunas verticais (não infectado/ dia x, dia 2x, dia 3x, etc.);
- preparar meio de incubação para revelação da enzima segundo as instruções do fabricante (mistura do tampão com os reagentes específicos);
- preparar programa de leitura seqüencial das placas no espectrofotômetro, a 340 nm a cada minuto, por 5 min;
- colocar 5 µl de plasma de cada amostra nos respectivos poços cobertura da placa com papel de filtro embebido em água para evitar o ressecamento até a aplicação do meio de incubação;
- aplicar 125 µl do meio de incubação com pipeta multicanal em uma única placa (não aplicar várias placas ao mesmo tempo);
- aguardar 3 min e ler seqüencialmente a DO a cada minuto, por 5 min;
- repetir a operação de aplicação do meio de incubação/leitura cinética para cada uma das outras placas previamente preparadas com os plasmas a serem testados;
- calcular em planilha apropriada a diferença de DO medida entre cada um dos sucessivos minutos ([5°-4°], [4°-3°], [3°-2°], [2°-1°]) de modo a ter quatro valores de diferença (ΔE) e poder calcular a média ($\Delta E/\text{min}$);
- calcular como padrão negativo a média de $\Delta E/\text{min}$ de diferentes amostras não infectadas;
- calcular um índice de variação entre os valores obtidos nas amostras infectadas, seja em relação ao nível individual do animal pré-infecção, ou então em relação ao valor médio obtido como padrão negativo.

15.3 Protocolos para Microplaca e Obtenção de Resultados

Todos os testes com microplacas precisam ser bem acompanhados com protocolos indicativos da localização de cada amostra na placa, bem como do protocolo usado no ensaio. Anexamos a seguir alguns exemplos de protocolos que podem ser copiados e adaptados.

A cada protocolo de trabalho corresponde uma leitura de DO ao espectrofotômetro, ou até a mais de uma, no caso de leituras a diferentes intervalos de tempo (ex. CK). É extremamente importante que planilhas de análises destes dados sejam bem preparadas, para que a média de triplicatas possa ser obtida, o cálculo de valor *cut-off* possa ser feito, bem como o cálculo dos índices de variação em relação ao valor padrão que se tomou. Este pode ser a média de valores normais, ou então o valor individual do animal antes da infecção. Essa escolha é do pesquisador e das condições de experimentação.

Alguns cuidados devem ser tomados:

- as amostras a serem estudadas em uma diluição pré-fixada (sem diluição seriada) devem ser avaliadas sempre em triplicatas (no mínimo em duplicatas); quando os soros forem analisados em diluição seriada, as duplicatas constituem um bom cuidado a tomar, mas podem ser dispensadas;
- o estudo cinético de amostras de um mesmo animal deve, sempre que possível, ser colocado na mesma coluna, ou em colunas colaterais;
- nunca deve-se esquecer de reservar numa placa espaço para o branco (PBS ao invés de soro), para um soro controle sabidamente positivo, e para três soros sabidamente negativos. Estes últimos permitirão calcular um limite de exclusão (*cut-off*) com seis a nove amostras no mínimo.

Apresentamos, a seguir, um exemplo de organização de planilha de cálculo e de análise dos níveis de IgG anti *T. cruzi* em animais infectados, no qual foram ensaiadas duas placas com cinco soros cada, numa cinética dos dias 0, 1, 8, 20 e 41 pós-infecção (dpi) para os grupos controle (não infectado) e infectado. Neste experimento o interesse era comparar a variação de IgG a cada dia com o valor obtido individualmente nos animais antes da

infecção. Por isso foi calculada a média e somados dois desvios aos resultados de cada animal no dia 0, e calculado o índice de variação de cada animal ao longo da infecção. Os animais não infectados foram analisados de modo semelhante, como controle interno do experimento.

Protocolos das placas

Placa 1	Grupo controle			
	1-2-3	4-5-6	7-8-9	10-11-12
A	cdg-1 0 dpi	cdg-2 0 dpi	cdg-3 0 dpi	cdg-4 0 dpi
B	cdg-1 1 dpi	cdg-2 1 dpi	cdg-3 1 dpi	cdg-4 1 dpi
C	cdg-1 8 dpi	cdg-2 8 dpi	cdg-3 8 dpi	cdg-4 8 dpi
D	cdg-1 20 dpi	cdg-2 20 dpi	cdg-3 20 dpi	cdg-4 20 dpi
E	cdg-1 41 dpi	cdg-2 41 dpi	cdg-3 41 dpi	cdg-4 41 dpi
F	cdg-5 0 dpi	cdg-5 20 dpi	---	oro + cont. placa
G	cdg-5 1 dpi	cdg-5 41 dpi	---	oro + cont. placa
H	cdg-5 8 dpi	---	---	PBS (branco)

Placa 2	Grupo infectado			
	1-2-3	4-5-6	7-8-9	10-11-12
A	cdg-1 0 dpi	cdg-2 0 dpi	cdg-3 0 dpi	cdg-4 0 dpi
B	cdg-1 1 dpi	cdg-2 1 dpi	cdg-3 1 dpi	cdg-4 1 dpi
C	cdg-1 8 dpi	cdg-2 8 dpi	cdg-3 8 dpi	cdg-4 8 dpi
D	cdg-1 20 dpi	cdg-2 20 dpi	cdg-3 20 dpi	cdg-4 20 dpi
E	cdg-1 41 dpi	cdg-2 41 dpi	cdg-3 41 dpi	cdg-4 41 dpi
F	cdg-5 0 dpi	cdg-5 20 dpi	---	oro + cont. placa
G	cdg-5 1 dpi	cdg-5 41 dpi	---	oro + cont. placa
H	cdg-5 8 dpi	---	---	PBS (branco)

Leituras obtidas no espectrofotômetro

Valor da densidade óptica (DO)												
Placa 1	Grupo controle											
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
	0,166	0,158	0,137	0,180	0,156	0,174	0,168	0,140	0,134	0,112	0,121	0,151
	0,248	0,239	0,243	0,205	0,195	0,200	0,147	0,151	0,137	0,149	0,141	0,205
	0,182	0,163	0,148	0,168	0,161	0,171	0,199	0,189	0,168	0,155	0,168	0,181
	0,180	0,175	0,188	0,229	0,191	0,214				0,145	0,177	0,147
	0,150	0,112	0,119	0,202	0,232	0,284	0,143	0,131	0,123	0,056	0,071	0,053
	0,072	0,066	0,078	0,117	0,109	0,095						
	0,081	0,074	0,073	0,061	0,060	0,063						
	0,110	0,107	0,101									
Placa 2	Grupo infectado											
1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
	0,148	0,160	0,170	0,224	0,195	0,197	0,228	0,247	0,199	0,149	0,149	0,172
	0,222	0,220	0,247	0,276	0,287	0,266	0,094	0,086	0,088	0,105	0,095	0,105
	0,255	0,260	0,296	0,299	0,280	0,270	0,152	0,139	0,135	0,157	0,146	0,154
	0,779	0,802	0,838	0,508	0,523	0,517	0,769	0,662	0,737	0,640	0,528	0,595
	0,238	0,262	0,313	0,205	0,220	0,212				0,413	0,418	0,456
	0,222	0,204	0,208	0,555	0,644	0,587						
	0,129	0,114	0,143	0,279	0,284	0,276						
	0,220	0,203	0,185									

Cálculo do <i>cut-off</i> = 2x desvio padrão da média da DO de cada animal em 0 dpi											
Grupo controle											
med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff
0,154	0,012	0,178	0,170	0,010	0,190	0,147	0,015	0,177	0,128	0,017	0,161
0,243	0,004		0,200	0,004		0,145	0,006		0,165	0,028	
0,164	0,014		0,167	0,004		0,185	0,013		0,168	0,011	
0,181	0,005		0,211	0,016					0,156	0,015	
0,127	0,017		0,239	0,034		0,132	0,008		0,060	0,008	
0,072	0,005	0,082	0,107	0,009							
0,076	0,004		0,061	0,001							
0,106	0,004										

dpd = desvio padrão; coff = "cut off"

Cálculo do <i>cut-off</i> = 2x desvio padrão da média da DO de cada animal em 0 dpi											
Grupo infectado											
med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff	med	dpd	coff
0,154	0,012	0,178	0,170	0,010	0,190	0,147	0,015	0,177	0,128	0,017	0,161
0,243	0,004		0,200	0,004		0,145	0,006		0,165	0,028	
0,164	0,014		0,167	0,004		0,185	0,013		0,168	0,011	
0,181	0,005		0,211	0,016					0,156	0,015	
0,127	0,017		0,239	0,034		0,132	0,008		0,060	0,008	
0,072	0,005	0,082	0,107	0,009							
0,076	0,004		0,061	0,001							
0,106	0,004										

Cálculo do índice de variação (IV): média de cada dia/ <i>cut off</i>											
Grupo controle											
IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t
0,863	Cont-1	0	0,893	Cont-2	0	0,833	Cont-3	0	0,793	Cont-4	0
1,366		1	1,050		1	0,819		1	1,023		1
0,923		8	0,875		8	1,047		8	1,041		8
1,016		20	1,110		20			20	0,969		20
0,713		41	1,257		41	0,748		41	0,372		41
0,880	Cont-5	0	1,308		20						
0,929		1	0,750		41						
1,296		8									
Grupo infectado											
IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t	IV	t
0,899	Inf-1	0	0,886	Inf-2	0	0,851	Inf-3	0	0,878	Inf-4	0
1,295		1	1,192		1	0,338		1	0,570		1
1,525		8	1,221		8	0,538		8	0,854		8
4,547		20	2,226		20	2,736		20	3,295		20
1,528		41	0,916		41			41	2,405		41
0,932	Inf-5	0	2,625		20						
0,567		1	1,233		41						
0,894		8									

Planilha de resultados: Expressão em IV

Grupo	Animal	1 dpi	8 dpi	20 dpi	41 dpi
cont	cdg-1	1,366	0,923	1,016	0,713
cont	cdg-2	1,050	0,875	1,110	1,257
cont	cdg-3	0,819	1,047		0,748
cont	cdg-4	1,023	1,041	0,969	0,372
cont	cdg-5	0,929	1,296	1,308	0,750
inf	cdg-1	1,295	1,525	4,547	1,528
inf	cdg-2	1,192	1,221	2,226	0,916
inf	cdg-3	0,338	0,538	2,736	
inf	cdg-4	0,570	0,854	3,295	2,405
inf	cdg-5	0,567	0,894	2,625	1,233

A figura abaixo expressa graficamente estes resultados. A análise estatística (ver Capítulo 19) foi feita e indicou aumento significativo nos dias 20 e 40 pós-infecção.

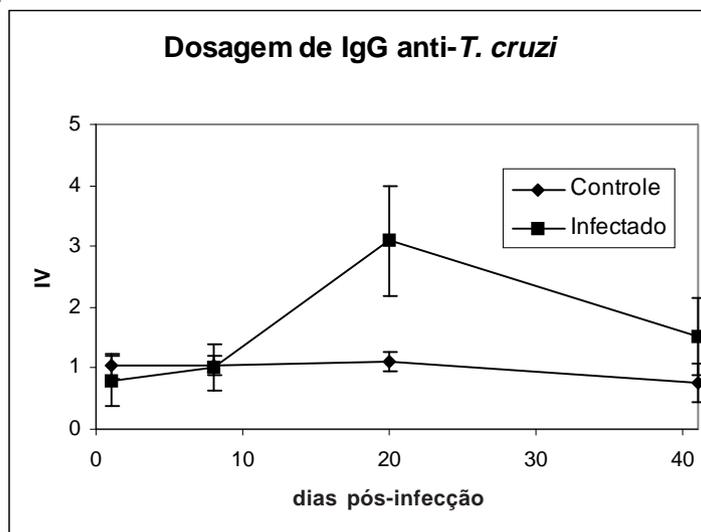
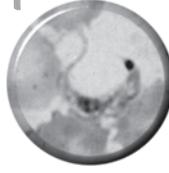


Figura 1 – Valores de índice de variação (IV) para IgG anti *Trypanosoma cruzi* para animais dos grupos controle e infectado

Capítulo 16



Preparo de Células para Avaliação de Parâmetros Inflamatórios e Imunológicos

Tania C. Araújo-Jorge, Vinicius Cotta-de-Almeida, Bianca P. Olivieri & Andrea Henriques-Pons

No Capítulo 15 descrevemos procedimentos para análise de marcadores humorais de inflamação e de resposta imune. No presente capítulo vamos nos concentrar nos procedimentos para análise de células obtidas de tecidos linfóides.

O sistema imune está distribuído em órgãos linfóides centrais e periféricos e também em vias de fluxo celular entre esses órgãos e outros tecidos-alvo, isto é, o sangue e a linfa. O estudo das células presentes em quaisquer desses compartimentos do sistema imunológico pode traduzir um estado patológico deste sistema. Como as células efectoras são essencialmente circulantes e migratórias, os órgãos linfóides funcionam como verdadeiros “sacos” de células, que podem ser fragmentados e homogeneizados de modo a colocar as células em suspensão apenas com dissociação mecânica, sem tratamentos enzimáticos do tecido.

Diversas alterações são observadas no sistema imunológico no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*: ativação policlonal de células T e B, imunossupressão da resposta proliferativa, citotoxicidade exacerbada, apoptose de linfócitos, atividade auto-reativa, depleção de linfócitos tímicos, entre outras. Por isso a análise de células do sistema imunológico tem sido objeto de intensos e abrangentes estudos visando aprofundar as investigações da atividade imunitária na infecção pelo *T. cruzi*.

16.1 Obtenção de Células de Sangue, Peritônio, Baço e Linfonodos

O preparo de suspensões celulares com alta viabilidade é essencial para ensaios baseados em atividade celular: proliferação e diferenciação de funções efectoras, análises fenotípicas por citometria de fluxo, ou ensaios de interação entre células do sistema imune (por exemplo, apresentação antigênica) ou entre elas e células-alvo (por exemplo, citotoxicidade). Para qualquer destas abordagens, tendo em vista traduzir um estado operante no momento em que se extrai o órgão ou o fluido do animal em estudo, é muito importante que a morte dos animais e a extração e processamento dos órgãos seja feita de forma rápida e cuidadosa para maior preservação das amostras. Alguns cuidados especiais:

- usar materiais cirúrgicos adequados, principalmente no que tange à retirada de linfonodos muito pequenos, ou timo atrofiado;

- evitar presença de sangue (hemólise, uso de gradiente de Ficoll);
- usar homogeneizadores de tecidos de forma apropriada;
- usar soluções salinas adequadas: (1) salina fosfatada tamponada (PBS) com soro bovino fetal 2 a 5% ou (2) solução salina balanceada: BSS ou Hanks, com soro bovino fetal 2 a 5%.

Material

- câmara de anestesia com clorofórmio ou éter (vidro com tampa larga, e algodão no fundo)
- álcool a 70%
- placa de cortiça (para a fixação do animal)
- placa de Petri com solução salina para as lavagens
- pipetas Pasteur para troca da salina de lavagem
- recipientes de descarte de líquidos e de carcaças com as devidas soluções desinfetantes
- tesoura de ponta afiada
- pinças anatômica, dente de rato e de relojoeiro
- sistema de homogeneização: (a) êmbolos de seringa para maceramento, (b) tela (peneira) de arame ou náilon, (c) lâminas de bordas esmerilhadas, ou (d) homogeneizador de tecido
- cuba de gelo para os tubos
- tubos de 15 ml para centrífuga, previamente rotulados com o material a receber
- solução salina tamponada sem soro, em banho de gelo (PBS ou BSS)
- solução salina com 2 a 5% de soro fetal bovino (PBS-SFB ou BSS-SFB) em banho de gelo
- câmara de Neubauer para contagem de células
- solução de azul Tripan 0,2 a 0,4% para avaliação de viabilidade celular
- tubos de microcentrífuga para diluições
- micropipetas de 200 e 20 ml
- seringas de 1, 5 e 10 ml com as respectivas agulhas
- ponteiras de micropipetas
- contador
- heparina

Procedimento

- anestésiar o animal;
- fazer punção cardíaca para coleta de sangue em seringa heparinizada para obtenção de células mononucleares sangüíneas e plasma (manter no gelo até o processamento);
- abrir a pele do abdômen sem ruptura do peritônio;
- injetar 4 a 6 ml de solução salina ou meio de cultura sem soro (seringa de 10 ml) na cavidade peritoneal para lavagem e coleta das células (manter no gelo até o processamento);
- abrir a parte ventral do animal para exposição e retirada dos linfonodos subcutâneos (inguinais, braquiais, axilares, etc.), do peritônio para exposição dos órgãos de interesse (baço e linfonodos mesentéricos), e do tórax para retirada do timo e linfonodos dessa região, caso haja interesse;
- coletar os órgãos e depositá-los em placas de Petri com salina gelada (a pesagem do baço é essencial);
- lavar em salina gelada;
- homogeneizar para ruptura das cápsulas e liberação das células linfóides;
- coletar as células com pipetas Pasteur e transferir para tubos cônicos de 15 ml. No caso de células do baço, lisar as hemáceas;
- lavar 2-3 x em salina (volume oito a dez vezes maior do que o da suspensão) com centrifugações sucessivas
- ressuspender em solução adequada (meio de cultura ou BSS), contagem de rendimento e viabilidade celular (diluição 1:1 com azul tripan 0,4%).

O rendimento de células esperado para camundongos normais, variando na dependência da linhagem de camundongos utilizada, é o seguinte: células peritoneais = 1 a 3×10^6 , timo = 100 a 300×10^6 , linfonodos mesentéricos = 50 a 100×10^6 , baço = 50 a 150×10^6 . A determinação da celularidade é essencial para uma determinação posterior de números absolutos de subpopulações fenotípicas (B, T, CD4, CD8).

Obs 1: o procedimento para *timo* e *linfonodos* são os descritos acima. O *baço*, pela alta quantidade de eritrócitos, deve ser submetido à hemólise com soluções hemolíticas adequadas à base de: (1) NH_4Cl , devendo por isto passar por extensa lavagem, devido à toxicidade deste componente para as outras células na suspensão, (2) choque hipotônico por 10 segundos, ou (3) separação celular por gradiente de Ficoll.

Obs 2: O *sangue* deve ser obtido em anticoagulante (heparina, EDTA, etc.) por punção cardíaca, retroorbital ou femural, seguida de separação de células mononucleares por gradiente de densidade.

Obs 3: Após a remoção dos órgãos todo o procedimento deve ser realizado em banho de gelo.

Obs 4: As *células do peritônio* devem ser obtidas injetando-se meio de cultura gelado na cavidade peritoneal; após massageamento do peritônio cheio de líquido proceder à retirada com seringa ou pipetas tipo Pasteur. Depois da lavagem da suspensão celular com nova solução de meio adequado, as células ficam em condições de trabalho para imunofenotipagem ou para ensaios funcionais.

16.2 Preparo e Caracterização de Esfregaços Celulares por Citocentrifugação

A centrífuga de células (Cytospin) permite o preparo de esfregaços das suspensões celulares para uma análise morfológica ou imunocitoquímica. Ela é desenhada para preparar uma monocamada de células numa área definida, para posterior processamento. É útil para o estudo de suspensões cuja densidade, com número insuficiente para análise por citometria, ou para gerar amostras para análise microscópica de suspensões utilizadas em outras metodologias. Compõe-se de um suporte para lâmina com um funil plástico que concentra as células ali depositadas num cilindro que drena para uma única área da lâmina. Entre a lâmina e o suporte é colocado um molde espesso de papel de filtro perfurado exatamente no local de encontro com o cilindro que depositará as células na área pré-determinada. O número ideal de células a ser dispersadas no campo circular que forma a base do cilindro é de quinhentas células.

Material

- citocentrífuga e seus acessórios
- lâminas com borda esmerilhada, previamente identificadas a lápis; podem ser ou não previamente revestidas com gelatina, poli-*L*-lisina ou aminosilane
- suspensão de células a $1 \times 10^6/\text{ml}$ (células de 10 a 12 μm de diâmetro); pode ser numa densidade maior ou menor, a depender do tamanho das células
- para amostras de sangue, lisar as hemáceas, ou separar os leucócitos em gradiente de Ficoll. Para o preparo do esfregaço, que possa ser utilizado em citoquímica, a contagem de hemáceas deve ser menor que $5000/\mu\text{l}$ ($<5 \times 10^6/\text{ml}$)
- solução de albumina 30%
- fixador: etanol 70%+polietileno glicol 2% (fixador de Saccomano) ou paraformaldeído 4%
- micropipetas e ponteiras
- cubas de descarte para desinfecção de ponteiras, lâminas e filtros, e para desinfecção e lavagem dos suportes e presilhas

Procedimento

- limpar as lâminas com álcool e identificá-las;
- preparar os conjuntos de suporte/filtro/lâmina/preendedor;
- aplicar 25 µl de albumina 30% no fundo da câmara de amostra (apenas se não for ser feito processamento de imunofluorescência; a albumina interfere com o brilho);
- aplicar 25 µl da suspensão no cone do suporte (não no funil), sem deixar a pipeta tocar no papel de filtro;
- fechar corretamente o suporte e colocar na centrífuga;
- centrifugar por 3-4 min a 1.000 rpm (a velocidade e o tempo devem ser testados antes, pois normalmente podem ser ajustados ao tipo celular que se quer analisar; para células de baço usamos 5 min a 500 rpm);
- remover do suporte da centrífuga e submergir a lâmina no fixador;
- processar as células através do protocolo desejado (coloração por Giemsa ou outra, imunofluorescência direta ou indireta).

16.3 Preparo e Marcação (Fenotipagem) de Células para Citometria de Fluxo

A análise por citometria de fluxo convencional permite a aquisição e a análise de um mínimo de cinco parâmetros que podem ter grande valor para a pesquisa de aspectos da imunopatogenia da doença de Chagas. Os dois parâmetros morfológicos, o desvio frontal (*forward scatter*, FSC, menos de 2°) e o desvio lateral (*side scatter*, SSC, a 90°) da luz indicam, respectivamente, o tamanho celular, proporcional à área de corte transversal da célula e à “granulosidade” celular, ou melhor, o grau de diferença entre o índice de refração dos grânulos de uma célula em relação ao índice de refração do seu citoplasma. Neutrófilos e eosinófilos se distinguem de linfócitos, mas basófilos não, pois os grânulos têm índice de refração igual ao do citoplasma. Esses parâmetros indicam o percentual relativo dessas populações celulares, bem como os efeitos da ativação em termos de tamanho e granulosidade celular. Além desses parâmetros, a citometria permite facilmente a marcação com indicadores fenotípicos ou funcionais fluorescentes com até três cores (verde, laranja e vermelho). Aparelhos especiais, ou adaptações, podem ainda estender essas análises para até oito cores diferentes.

Entre as aplicações mais frequentes da citometria destacamos: (1) a análise de propriedades citoquímicas de células imunorrespondedoras (granulócitos, monócitos e linfócitos), tais como contagem diferencial de leucócitos, imunofenotipagem e caracterização de subpopulações celulares, quimiotaxia, endocitose, degranulação e catabolismo em resposta a estímulos, grau de maturação e ativação de linfócitos B e T; (2) medidas de DNA para estudo de ciclo celular e detecção de morte, necrose e apoptose; (3) diferenciação celular em diferentes sistemas, com medidas de ciclo celular, de traçadores de mRNA, identificação de sítios receptores e perfis de glicosilação, antígenos marcadores e mudanças estruturais.

A análise de amostras em citometria de fluxo segue as seguintes etapas:

- preparação de uma suspensão aquosa de células isoladas do tecido ou cavidade de interesse;
- coloração específica do componente celular que se quer estudar com anticorpos conjugados a fluorocromos;
- medida no citômetro (aquisição de dados);
- análise quantitativa dos dados em computador;
- interpretação dos dados quantitativos em termos de relevância biológica ou médica.

Para a fenotipagem celular, anticorpos monoclonais (mAb) e policlonais desenvolvidos contra diferentes proteínas de membrana possibilitam a identificação de subpopulações celulares. Como cada classe de células expressa, até certo ponto, um repertório particular de moléculas de membrana, o uso de um painel de anticorpos mAb e a análise multiparamétrica por citometria de fluxo pode distinguir cada população. Por exemplo, usando-se mAb anti CD3, CD4 e CD45RA pode-

se definir o percentual relativo de linfócitos T *helper* (positivo para os três marcadores), linfócitos T citotóxicos (positivos para CD3 e CD45RA, negativo para CD4), linfócitos B (negativos para CD3 e CD4 e positivos para CD45RA), e monócitos (negativos para CD3 e positivos para CD4 e CD45RA).

Material

- centrífuga para os tubos ou microplacas
- solução de bloqueio
- anticorpos monoclonais marcados diretamente ou com os respectivos conjugados secundários fluorescentes dirigidos contra os marcadores fenotípicos desejados, como por exemplo: anti CD3-e, anti CD8, anti CD4, anti CD5, anti cadeia m, anti TCR, anti CD16/32 (clone 2.4G2)
- solução de lavagem (BSS-soro fetal bovino 5%)
- fixador: PFA 1%
- solução de passagem: PBS-FACS = PBS + 5% SBF + NaN_3 1 mg/ml (0,1 %).

Observações gerais

- a quantidade de células por amostra deve ser cinquenta a cem vezes maior do que o número de células que se pretende analisar: para 10^4 células analisadas, pode-se prever 10^6 células coradas (por amostra, comumente um estoque de cerca de $5\text{-}20 \times 10^6/\text{ml}$);
- podem ser usados microtubos, tubos de 13x75 mm ou placas de 96 poços fundo V, a depender da centrífuga disponível. As centrifugações em microcentrífuga não devem ultrapassar 1min e em centrífuga de tubos maiores devem ser de 3 a 5 min; para microtubos aspirar o sobrenadante ao invés de verter;
- marcar as células no gelo e no escuro;
- os anticorpos interagem com as células de três modos: ligação específica ao epitopo; ligação a receptores Fc (essa ligação é específica e saturável; imunoglobulinas isoladas se ligam a receptores de alta afinidade e imunoglobulinas agregadas por calor ou sob forma de complexo antígeno-anticorpo se ligam a receptores de baixa afinidade); ligação inespecífica (não saturável); por isso é indispensável a etapa de bloqueio;
- é importante corar células controle com um anticorpo não relacionado, e de mesmo isotipo, para testar a efetividade do bloqueio de receptor Fc;
- em média 1 μg de anticorpo por 10^6 células é suficiente, mas é recomendada uma titulação prévia para se avaliar a concentração ideal, pois pode haver superconjugação, agregação ou degradação. Neste casos o anticorpo tem baixa qualidade e pode gerar dados artefatuais;
- o uso de anticorpos secundários na forma F(ab')_2 elimina a ligação via Fc;
- as amostras devem ser guardadas sempre a 4°C e ao abrigo da luz até o momento da leitura;
- sempre que possível utilizar controles positivos de marcação.

Cuidados especiais

Usar os anticorpos na diluição apropriada, fazendo uma titulação prévia, antes de usar em qualquer experimento, com o seguinte procedimento:

- incubar células com diluições seriadas do anticorpo;
- obter seus histogramas de fluorescência superpostos com o histograma do tubo controle (isotipo não relacionado, tubo não marcado ou tubo incubado apenas com o conjugado, segundo o protocolo usado);
- ajustar o marcador para o limite de negativos e positivos usando o histograma do tubo controle;
- criar uma região correspondente às células positivas e outra às negativas;
- analisar a média da intensidade de fluorescência em cada região (negativa e positiva) para cada diluição do anticorpo sob teste;
- calcular a razão entre a fluorescência das células positivas e negativas (relação sinal/ruído).

A única concentração de anticorpo que corresponde à diluição apropriada a ser usada é aquela na qual a relação sinal/ruído é máxima. Nessa concentração a ligação inespecífica é mínima e a especificidade de ligação é máxima. Para encontrar essa concentração, o marcador para células positivas deve ser ajustado de modo a que mais de 99% das células coradas com o isotipo controle (o tubo controle em questão) estejam na faixa negativa.

Fenotipagem em uma cor

INDIRETA

Anticorpo primário seguido de um anticorpo secundário conjugado a fluorocromo

- colocar a quantidade adequada de células nos tubos (10^6 células em 50 μ l);
- adicionar 10 μ l da solução de bloqueio por 10 min (ver Material);
- após centrifugação, adicionar a quantidade apropriada do anticorpo primário e incubar por 15 min;
Obs: pode-se usar tempos de incubação maiores mas não é necessário porque o processo de ligação do anticorpo ao epitopo é rápido; para antígenos intracelulares pode ser necessário maior tempo.
- adicionar PBS, centrifugar as células a 400 g, decantar o sobrenadante (retirar o excesso de PBS sobre papel absorvente) e ressuspender as células no volume residual (isso consiste numa lavagem); seguem-se duas a três lavagens, ou pode ser feita uma única vez utilizando-se cinquenta a cem vezes o volume de tampão sobre o volume residual das células;
- se a lise de hemáceas for desejada, substituir o PBS por solução de lise na etapa 4, como a primeira lavagem;
- adicionar a quantidade apropriada do anticorpo secundário fluorescente, incubar 15 min e lavar;
- ressuspender as células em fixador ou se desejar analisar células vivas, no meio desejado;
- adquirir os dados no citômetro.

Anticorpo primário biotinilado seguido de avidina conjugada a fluorocromo

- aliquotar e bloquear (etapas 1 e 2 iguais);
- adicionar a quantidade apropriada de anticorpo primário biotinilado, incubar 15 min e lavar. Se a lise for necessária, substituir o PBS por solução de lise (como descrito no item anterior);
- adicionar a quantidade apropriada da avidina fluorescente, incubar 15 min e lavar;
- fixar e analisar (etapas 7 e 8 iguais).

DIRETA

Anticorpo primário conjugado a fluorocromo

- aliquotar e bloquear;
- adicionar o anticorpo fluorescente por 15 min e lavar e/ou lavar;
- lavar, fixar e analisar (etapas 6, 7 e 8).

Número mínimo de aliquotas para a fenotipagem a uma cor

Tubo	Reagente	Objetivo
1	Sem conjugado fluorescente PBS+bloqueio+lise	FSC/SSC e autofluorescência
2	Conjugado fluorescente do pico negativo	Ligação <i>background</i> para definir a posição
3	Isotipo primário não relacionado + conjugado fluorescente	Ligação específica do isotipo via Fc - controle negativo
4	Isotipo primário específico + conjugado fluorescente	Determinação das células positivas

Regras básicas para conjugação dos três procedimentos

- se usar o Método 1, ele deve ser sempre realizado primeiro;
- o anticorpo secundário deve ser bloqueado por IgG da mesma espécie do primeiro anticorpo, de modo a não se ligar a nenhum dos anticorpos primários subsequentes;
- as etapas de bloqueio e de controle com o isotipo não relacionado são essenciais para garantir a especificidade das ligações;
- se o isotipo controle se ligar a quaisquer das células coradas por uma combinação entre o primeiro e o segundo anticorpos, o bloqueio não foi efetivo e os dados serão artefatuais.

Em caso de utilização de sistema de relação, proceder a controle semelhante ao anterior e também a controle, omitindo-se o anticorpo primário.

Há necessidade de controles positivos de marcação com as células utilizadas no ensaio para calibração da fluorescência no citômetro de fluxo. Estes controles devem sempre ser feitos em paralelo ao ensaio, tomando-se o cuidado de utilizar em tais controles populações celulares que apresentem subpopulação negativa e positiva para os marcadores celulares utilizados (nunca utilizar populações completamente positivas nem populações duplamente positivas em caso de se utilizar dois marcadores simultâneos para controle da fluorescência).

16.4 Ensaios de Ativação Celular e Citotoxicidade *In Vitro*

A morte celular é um processo fisiológico fundamental para vários sistemas biológicos como seleção negativa de linfócitos no timo, controle da resposta imunológica estabelecida, e outros. Vários são os mecanismos indutores de morte celular ou citotoxicidade. Macrófagos induzem morte celular basicamente via liberação de TNF e NO nos sítios inflamatórios, enquanto linfócitos T induzem morte celular via mecanismos mais específicos dependentes de interação receptor/ligante. Células T CD4⁺ induzem morte celular principalmente pela via dependente de Fas/Fas-L, enquanto linfócitos T CD8⁺ usam majoritariamente a via dependente de perforina e granzimas.

O desenvolvimento de procedimentos rápidos e eficientes para quantificar morte celular *in vitro* e estimular células do sistema imune, como células efectoras citolíticas, foi fundamental no estudo das relações intercelulares e atuação de moléculas citolíticas.

16.4.1 Purificação de subpopulações de esplenócitos

16.4.1.1. Separação por microesferas (beads) magnéticas

a) Coleta de baços

- coletar os baços e macerá-los em peneira fina ou em duas lâminas de vidro com superfície áspera;
- colocar o material em placa de Petri estéril e adicionar 5-10 ml de RPMI gelado sem soro;
- homogeneizar cuidadosamente com pipeta Pasteur;
- transferir as células para um tubo de 15 ml e deixar no gelo por 5 min;
- após decantar os fragmentos, coletar o sobrenadante;
- centrifugar a 250 g por 10 min, retirar todo o sobrenadante e agitar o sedimento;
- adicionar 3 ml de RPMI + 3 ml de NH₄Cl a 0,85%;
- centrifugar 1x;
- retirar o sobrenadante e adicionar 3 ml de NH₄Cl (não lisar as hemácias por choque hipotônico);
- centrifugar mais 1x;

- ressuspender as células em meio completo;
- contar as células viáveis em azul de Tripán.

b) Conjugação células/anticorpos – seleção negativa

- separar as células em tubos contendo $1-4 \times 10^7$ células em 3 ml de meio completo;
- usar todos os anticorpos na concentração final de 10 µg/ml - na ausência de azida;
- adicionar às células os anticorpos relativos às populações a depletar (1 ml volume final);
- homogeneizar e incubar por 30 min a 4°C.

Anticorpos usados para isolamento das células

Células T CD4 ⁺	Células T CD8 ⁺	Células B
α-CD8	α-CD4	α-CD8
α-CD45R	α-CD45R	α-CD4
α-MAC-1	α-MAC-1	α-MAC-1
α-la	α-la	-

c) Preparação das microesferas magnéticas

Obs: a preparação das esferas varia de acordo com o fabricante; portanto deve-se consultar o seu manual específico

- tomar o volume recomendado pelo fabricante de acordo com o número de células;
- adicionar 40 ml de solução de Hanks sem soro às microesferas para lavá-las;
- agitar bem e colocar no campo magnético;
- esperar as microesferas aderirem à parede do tubo e desprezar o meio;
- repetir o processo de lavagem mais duas vezes;
- ressuspender as microesferas em 3 ml de RPMI.

d) Purificação

- lavar 1x as células que foram incubadas com os anticorpos na geladeira;
- ressuspender em 3 ml de meio completo;
- juntar as células e as microesferas magnéticas - volume final de 6 ml contendo 5% de SFB;
- agitar o material e incubar por 30 min a temperatura ambiente; agitar 2x;
- colocar a mistura no separador magnético;
- aguardar até o líquido ficar translúcido;
- coletar o máximo de meio e colocar em tubos no gelo;
- adicionar mais 6 ml de meio e repetir o processo de purificação três vezes ao todo;
- centrifugar o material coletado e contar.

16.4.1.2. Separação em coluna de lã de náilon

a) Preparação da lã

- mergulhar a lã num becker de 1 litro, contendo salina, por 2 h a 37°C;
- lavar a lã 3x em água bidestilada a temperatura ambiente;
- deixar a lã por 5 dias em água destilada a 37°C, mudando a água todos os dias;
- deixá-la secar por 2-3 dias a 37°C;
- separar alíquotas de 0,7 g de lã e desfiá-la muito bem até começar a aderir nos dedos;
- colocar a lã em seringas vazias de 12 ml, preenchendo a seringa até pelo menos a metade;
- vedar e ensacar as colunas e autoclavá-las normalmente.

b) Preparação da coluna

- colocar a coluna na posição vertical com a saída do líquido bloqueada;
- adicionar 20 ml de RPMI sem soro e apertar as laterais da lâ com pipeta Pasteur até molhá-la totalmente;
- desbloquear a saída de líquido e desprezar;
- repetir a adição de meio e desprezar;
- bloquear a saída de líquido;
- adicionar 20 ml de RPMI + 5% de SFB;
- drenar o excesso de meio e deixar a coluna a 37°C por 1 h antes de adicionar as células.

c) Adição de células

- aplicar na coluna um volume total de 2 ml de RPM + 5% de SFB contendo $1-3 \times 10^8$ células;
- embalar a coluna e deixá-la por 1 hora a 37°C.

d) Eluição das células não aderentes (população enriquecida em células T)

- lavar a coluna muito lentamente com meio aquecido contendo soro fetal bovino;
- coletar os primeiros 25 ml e centrifugar a 250xg por 10 min;
- contar as células viáveis por exclusão em azul de Tripán.

e) Eluição das células aderentes (população enriquecida em células B)

- depois de coletar as células não aderentes (item d), comprimir a lâ e coletar o meio restante;
- adicionar mais meio com soro e comprimi-la de novo;
- repetir o processo até que sejam coletados 25 ml;
- centrifugar o material a 250xg por 10 min e contar as células viáveis em azul de Tripán.

16.4.2 Ativação de linfócitos *in vitro*

Freqüentemente, utilizam-se três tipos de estímulos para ativação *in vitro*: lectinas (Con A ou PHA, 5 µg/ml), LPS (5 µg/ml), ou anticorpos monoclonais como por exemplo anti CD3 que são cultivados por tempos variados de 3 a 72 h. Ao longo desse período várias análises podem ser feitas: a medida de proliferação celular, as modificações morfológicas de tamanho e granulosidade, ou a expressão de antígenos característicos do processo de ativação.

16.4.2.1 Ativação por Con-A

- coletar as células de baço como descrito anteriormente;
- ajustar a concentração de células para $5-10 \times 10^7$ células por ml de meio completo;
- adicionar 4 µg de Con-A por ml de meio;
- se a ativação for executada em placa de 96 poços, utilizar 2×10^5 células/poço;
- agitar bem e incubar a 37°C por 12 h;
- coletar as células agitando suavemente com pipeta Pasteur - elas devem estar grumadas;
- centrifugar a 250xg por 10 min;
- contar as células viáveis em azul de Tripán.

16.4.2.2 Ativação por anti CD3

a) Imobilização de anti CD3

- colocar por poço (placa de 24 poços) uma concentração final de 5 µg de anti CD3 em um volume de 300 µl de meio, ou suspensão a 25% de sobrenadante do hibridoma 145-2C11;
- manter a 37°C por 4 h;
- lavar os pocinhos, muito cuidadosamente, 3x com RPMI sem soro e aquecido;
- colocar por último RPMI com soro.

b) Aplicação das células

- coletar as células de baço como descrito anteriormente;
- passar em coluna de lã de náilon ou em microesferas magnéticas, como descrito anteriormente;
- plaquear 3x10⁶ células por pocinho até completar pelo menos 1 ml final;
- incubar a 37°C por 12 h.

16.4.2.3 Células apresentadoras de Ag - doença de Chagas

Estimulação primária *in vivo*

- infectar camundongos singênicos C57BL/6 com *T. cruzi*

Estimulação secundária *in vitro*

Coleta de macrófagos

- sacrificar camundongos C57BL/6 normais;
- expor o peritônio e injetar 5 ml de RPMI gelado sem soro;
- agitar a cavidade abdominal do camundongo;
- coletar o meio e manter as seringas no gelo;
- avaliar a presença de bactérias no material ao microscópio;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspender o material em RPMI gelado contendo 5-10% de SFB e 1% de *L*-glutamina;
- contar a viabilidade em azul de Tripán.

a) Cultura e infecção de macrófagos

- plaquear 2-5x10⁶ macrófagos por garrafa de 25 cm²;
- deixá-los aderir por 1 h a 37°C;
- infectar a cultura com a mesma cepa de parasita que os camundongos foram infectados na proporção de dez parasitas por célula;
- incubar a cultura por 12 h a 37°C;
- lavar as garrafas pelo menos 5x com RPMI aquecido e sem soro, agitando suavemente a cultura;
- incubar as células por 24 h a 37°C em RPMI + 5-10% de SFB e 1% de *L*-glutamina;
- lavar as garrafas 2x em RPMI aquecido e sem soro;
- irradiar a cultura com 15.000 rad.

b) Co-cultura de macrófagos infectados *in vitro* com linfócitos de camundongos infectados *in vivo* (apresentação de antígeno)

- pelo menos dois meses após a infecção, sacrificar os camundongos infectados com *T. cruzi* e coletar os baços;
- adicionar 3-5x10⁷ esplenócitos por garrafa de macrófagos infectados irradiados;
- manter a co-cultura por cinco dias a 37°C.

c) Separação parcial de debris e células mortas

- coletar as células homogeneizando gentilmente com pipeta Pasteur;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspender o sedimento em 5 ml de RPMI sem soro;
- colocar 5 ml de SFB concentrado no fundo do tubo usando pipeta Pasteur; perceber a formação da segunda fase;
- centrifugar a 250xg por 10 min;
- coletar o sedimento (as células mortas e restos celulares ficarão na interface).

16.5.3 Ativação de linfócitos *in vivo*

16.5.3.1 Reação enxerto x hospedeiro

a) Camundongos

- camundongos C3H/He (H-2^k) de 3-4 semanas de idade como doadores de timócitos
- camundongos C57BL/6 (H-2^b) de 7-8 meses de idade como animais recipientes

b) Coleta de timos

- retirar os timos dos animais C3H/He e colocá-los em RPMI + 10 mM de HEPES gelado sem SFB;
- macerá-los usando duas lâminas de microscópio com superfície áspera;
- coletar as células em placa de Petri;
- homogeneizar cuidadosamente o material com pipeta Pasteur e transferir para tubos de 15ml;
- deixar os fragmentos de tecido decantarem por 5 min no gelo;
- coletar o sobrenadante;
- centrifugar a 250xg por 10 min;
- contar as células viáveis em azul de Tripan;
- ajustar a concentração para 1×10^9 células viáveis/ml.

c) Obtenção de linfócitos alogênicos ativados

- injetar 100 μ l de timócitos (1×10^8) por via intravenosa em camundongos C57BL/6 irradiados (800 rad);
- sacrificar os animais recipientes cinco dias após a injeção (acompanhar a mortalidade dos camundongos nesse período) e usar como células efectoras contra alvos de C57BL/6;
- coletar os esplenócitos como descrito anteriormente;
- os baços devem estar bem pequenos com pontos de proliferação celular.

16.5.3.2 Reação hospedeiro x enxerto

Sensibilização primária *in vivo*

a) Injeção de células alogênicas

- tomar uma cultura de EL-4 (C57BL/6 – H-2^b) com pelo menos 95% de viabilidade;
- lavar as células 3x em RPMI sem soro;
- incubar a cultura por 4 h a 37°C em RPMI sem soro, trocando 2x o meio, para reduzir a quantidade de proteínas do soro;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspender em PBS + 0,02% de EDTA;
- contar as células viáveis em azul de Tripan;
- ajustar a concentração para 1×10^8 células/ml;
- injetar 100 μ l de células por via intraperitoneal em camundongos Balb/C (H-2^d).

Sensibilização secundária *in vitro*

b) Obtenção de linfócitos sensibilizados

- coletar o baço dos animais 10-20 dias após sensibilização primária *in vivo* (ver 16.4.1.1a);
- ajustar a concentração para $2,5 \times 10^6$ células por ml de meio completo;
- aplicar 2 ml de células por pocinho de placa de 24 poços;
- deixar as células na geladeira por no máximo 1 h.

c) Irradiação de células sensibilizadoras

- tomar uma cultura de células EL-4 com pelo menos 95% de viabilidade;
- lavar 3x a cultura em PBS + 0,02% de EDTA;
- contar as células viáveis em azul de Tripán;
- ajustar a concentração para 3×10^7 células/ml;
- irradiar a cultura com 5.000 rad;
- adicionar 100 μ l de células EL-4 à metade dos pocinhos contendo linfócitos (item a) – células efetoras e células efetoras controle;
- manter a co-cultura a 37°C por 4-5 dias; verificar a viabilidade diariamente.

16.5.4 Marcação de células alvo com ^{51}Cr

Método

- tomar uma cultura de células-alvo com pelo menos 95% de viabilidade;
- centrifugar as células a 250xg por 10 min;
- ressuspendê-las em 5 ml de RPMI + 5 % de SFB;
- contar as células viáveis em azul de Tripán;
- ajustar a concentração para 1×10^6 células/ml de meio de marcação;
- incubar as por 1h a 37°C;
- lavar 2x em RPMI + 5% de SFB;
- incubar por 30 min a 37°C;
- lavar 2x em RPMI + 5% de SFB;
- tomar uma alíquota de 1×10^4 células para leitura em contador gama - a contagem deve ser de pelo menos 10.000 cpm;
- ajustar o número de células-alvo para mais ou menos este nível de contagem.

16.5.5 LDCC (*Lectin Dependent Cell Cytotoxicity*)

Método

- plaquear as células-alvo marcadas em placa de 96 poços com fundo em U ou V;
 - adicionar as células efetoras nas proporções desejadas em triplicata;
- Obs: as células-alvo e efetoras não precisam ser singênicas
- adicionar Con-A na concentração final de 5 μ g/poço;
 - o volume final por poço deve ser de 200 μ l;
 - agitar gentilmente com micropipeta;
 - incubar a placa por 15 min à temperatura ambiente;
 - centrifugar a 130 x por 5 min;
 - incubar a placa do ensaio de citotoxicidade por 5 h a 37°C;
 - centrifugar a placa a 250xg por 10 min;
 - coletar 100 μ l de cada poço;
 - fazer a leitura em contador gama.

Cálculo de citotoxicidade específica

$$\text{porcentagem de liberação específica} = \frac{\text{lib. experimental} - \text{lib. espontânea}}{\text{lib. máx. (100\%)} - \text{lib. espontânea}}$$

Referências Bibliográficas

- GOODING, L. R. & EDWARDS, C. B. H-2 antigen requirements in the *in vitro* induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes. *Journal of Immunology*, 124:1258-1262, 1980.
- GOODING, L. R. Specificities of killing by cytotoxic lymphocytes generated *in vivo* and *in vitro* to syngeneic SV40 transformed cells. *Journal of Immunology*, 118:920-927, 1977.
- JULIUS, M. H.; SIMPSON, E. & HERZENBERG, L. A. A rapid method for isolation of functional thymus-derived murine lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 3:645-649, 1973.
- LECLARE, J. C.; PLATER, C. & FRIDMAN, W. H. role of the Fc receptors (FcR) of thymus-derived lymphocytes. *European Journal of Immunology*, 8:543-554, 1977.
- PINCUS, J. H.; LINCOLN, P. & REISFELD, R. A. Separation of murine lymphoid cells using nylon wool columns. *Transplantation*, 18:544-549, 1974.
- STEWART, C. C. & STEWART, S. J. The use of directly and indirectly labeled monoclonal antibodies in flow cytometry. In: *Methods in Molecular Biology*, vol 45: Monoclonal antibody protocols, ch. 15. 1996. Totowa, NJ: W.C. Davis Humana Press Inc.

Anexo 16.1

Preparo de soluções especiais e tampões

PBS (Phosphate-buffered saline)	m M
NaCl	150
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	10
KH ₂ PO ₄	1
KCl	2
Ajustar para pH 7,4	

Solução de Alsever	m M
Glicose	115
NaCl	72
Citrato de sódio	30

BSS (Balanced Salt Solution)¹			
Componente	Concentração final	Solução A (10x) para 1.000 ml	Solução B (10x) para 1.000 ml
Glicose	5,5 mM	10,0 g	
NaCl	140 mM		80,0 g
KH ₂ PO ₄	0,4 mM	0,6 g	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	1,5 mM	5,37 g	
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1 mM		1,86 g
KCl	5 mM		4,0 g
MgCl ₂ ·6H ₂ O	0,9 mM		2,0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,8 mM		2,0 g
Vermelho de fenol	0,001%	0,1 g	

¹ Mishell & Duton (1967), *Journal of Experimental Medicine* 126: 423

- preparar separadamente as soluções estoques A e B (10 X concentradas), misturá-las 1:1 e diluí-las 5-10x, para ter BSS 2x ou 1x;
- filtrar através de membrana de 0,22 µm e estocar a temperatura ambiente ou a 2-6°C
- testar a esterilidade incubando por sete dias a 37°C. O pH da solução BSS 1x deve estar em torno de 7,2-7,4.

Meio de cultivo de linfócito	
Meio RPMI	± 85 ml
Tampão HEPES	10 mM
2-mercaptoetanol	5x10 ⁻⁵ M
Piruvato de sódio	1%
Amino ácidos não essenciais	1%
L-glutamina	1%
Soro fetal bovino	10%
Penicilina/estreptomicina	1%

Solução para Citometria de Fluxo¹	
Lavagens e diluições	PBS s/cálcio s/magnésio, c/ 0,1% azida sódica pH 7,2-7,4
Fixadora	paraformaldeído ou formaldeído ultrapuro ² 1 a 2%
Bloqueio	BSA 1% soro normal da espécie do Ac secundário (5 a 10%) fração IgG (melhor) desse soro (2 mg/ml)

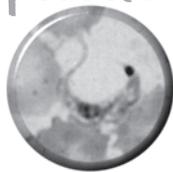
¹ osmolaridade ajustada ao animal

² não usar formaldeído impuro ou glutaraldeído, pois aumentam a autofluorescência

Solução de lise de hemáceas	
Cloreto de amônio	1,652 g
Bicarbonato de potássio	0,2 g
EDTA	0,0074g
Completar para 200 ml com H ₂ O destilada	

- preparar no dia de uso para evitar que o CO₂ dissolvido na água combine para formar o carbonato de amônio ((NH₄)₂CO₃), que não lisa as hemáceas;
- pré-pesar os reagentes e estocá-los em pacotes para dissolver quando preciso.

Capítulo 17



Coleta e Processamento de Órgãos e Tecidos para Avaliação da Infecção

Andréa Pereira de Souza, Suzana Côrte-Real Faria, Cláudia M. L. M. Coutinho,
Maria de Nazaré C. Soeiro & Claude Pirmez

O estudo dos tecidos dos animais infectados é um campo extremamente amplo e passível de diferentes aplicações. As primeiras grandes descobertas a respeito da doença de Chagas aguardaram as análises histopatológicas meticolosas dos dez primeiros casos letais que Carlos Chagas diagnosticou e enviou a Gaspar Vianna, publicadas em 1911; desde então lesões em modelos experimentais correspondentes às lesões humanas têm sido muito estudadas (ver Capítulo 9).

As principais aplicações são no estudo histopatológico clássico de cortes parafinados corados para observação em microscopia óptica, no estudo citopatológico por microscopia eletrônica e no estudo imunopatológico por técnicas especiais de imunocitoquímica. Descreveremos aqui os protocolos mais comumente utilizados.

O cuidado especial que se deve ter é quanto ao manuseio do animal infectado pois, além do sangue ser potencialmente infectivo para o pesquisador e o técnico, os demais líquidos corporais e os tecidos também podem conter parasitas viáveis que contaminam as soluções de lavagem nas quais se processam os tecidos até sua fixação. Portanto, todas as normas de segurança devem ser seguidas à risca (ver Capítulo 8).

A análise macroscópica do animal e dos órgãos coletados deve ser cuidadosa. O mau *estado geral* do animal caracteriza-se por apatia, perda de peso e pêlos, gengivite ulcerada, palidez das mucosas, dispnéia e edema generalizado. A *autópsia* revela edema do tecido subcutâneo e derrame líquido, claro e transparente, nas cavidades pericárdica, pleural e abdominal (ascite). Pode-se *analisar estes líquidos* quanto à presença de formas tripomastigotas do *Trypanosoma cruzi*, após concentração por microhematócrito ou por hemocultura. A pesagem e observação do volume dos órgãos, sobretudo baço e coração, revelam sua congestão e, ao corte, as cavidades átrio-ventriculares podem apresentar nítidos sinais de dilatação e presença ocasional de trombos.

17.1 Coleta e Processamento de Órgãos para Microscopia Óptica

17.1.1 Coleta para histologia convencional em parafina

Material

- equipamento de proteção para o trabalho com *T. cruzi* (ver Capítulo 8)
- câmara de anestesia com clorofórmio ou éter (vidro com tampa larga e algodão no fundo)
- placa de cortiça (para a fixação do animal)
- solução salina fisiológica para lavagem dos órgãos
- álcool a 70%
- placa de Petri com solução salina para a lavagem
- pipetas Pasteur para troca da salina de lavagem
- recipientes de descarte de líquidos e de carcaças com as devidas soluções desinfectantes
- solução fixadora (formalina 10% ou fixador de Millonig-Rosman)
- tesoura de ponta afiada
- pinças anatômica e dente de rato
- pinça de relojoeiro
- recipiente para a fixação do material

Procedimento

- colocar o camundongo na câmara de anestesia;
Obs: para o sacrifício dos animais existe uma tendência crescente à substituição da anestesia por éter ou clorofórmio pela decaptação ou asfixia com CO₂, que parecem ser mais indolores.
- fixá-lo na placa de cortiça, em cruz (cuidado com as agulhas usadas para fixar os animais: os acidentes de laboratório mais freqüentes ocorrem pela manipulação inadequada de agulhas);
- aplicar jatos de álcool a 70% no corpo do animal antes de dissecá-lo;
- abrir primeiramente a pele do animal e em seguida o peritônio (uma pinça para cada revestimento);
- retirar os órgãos evitando seu pinçamento ou esmagamento;
- lavar os órgãos com solução salina, pois excesso de sangue e de muco na sua superfície formam um filme protetor, impedindo uma penetração adequada do fixador;
- recortar o órgão em fatias delgadas para que o fixador penetre rápida e homogênea. A espessura depende muito do material a ser processado, bem como do fixador de escolha (poder de penetração e velocidade de difusão deste);
Obs: o cérebro deve ser fixado por inteiro e somente depois clivado. Por outro lado, as peças devem ser pequenas (1 a 2 mm de espessura) sempre que se empregue um fixador pouco penetrante (ex. ácido ósmico), mas podem ter de 0,5 a 1 cm quando se utilizam fixadores com maior poder penetração (ex. formol, Bouin, Zenker). O importante é assegurar-se que o fixador atue de maneira uniforme sobre toda a peça, sendo aconselhável evitar-se que a peça fique apoiada no fundo do frasco (colocar uma camada de cerca de 1 cm de algodão no fundo do frasco, ou mantê-la suspensa no frasco amarrando com um fio). O tempo mínimo de fixação varia muito conforme a peça e o tipo de fixador, e não há limite máximo para fixação; o tecido pode permanecer por tempo indeterminado até seu processamento. O material deve ser colocado em um recipiente que permita que o volume do líquido fixador seja de dez a vinte vezes maior que o do espécime.
- para se calcular o índice cardíaco, o coração deve ser pesado e fixado *in totum*. O índice pode ser calculado a partir da relação percentual entre o peso do coração e o peso do animal [(peso do coração/peso corporal) x 100].

17.1.2 Coleta para histoquímica em cortes congelados obtidos em criostato

Material

- tubos de criopreservação ou formas para congelamento
Obs: existem no mercado formas de vários tamanhos, descartáveis; pode-se também preparar forminhas cilíndricas de papel laminado usando como forma a extremidade arredondada de uma pipeta ou de um tubo de ensaio, a depender do diâmetro do órgão ou tecido a ser congelado, e adaptá-las dentro de tubos de congelamento; outra opção é a embalagem plástica de comprimidos.
- material de dissecação idêntico ao usado para coleta para histopatologia convencional; todo o material que receberá os órgãos a ser congelados (placas de Petri, salina, etc.) deverá estar em banho de gelo
- crioprotetor (*optimal cutting temperature compound* - OCT)
- cuba (garrafa térmica) com nitrogênio (N₂) líquido ou com gelo seco

Procedimento

- remover o órgão inteiro como descrito no item 17.1.1 e lavar em salina gelada, drenar o excesso de salina e clivar o órgão em fragmentos de 2 a 3 mm de espessura (a largura vai depender da forma);
Obs: órgãos pequenos como *timo* não precisam ser clivados; emblocar em posição anatômica com a face externa para baixo; órgãos maiores como *baço* e *fígado* devem ser cortados transversalmente e emblocados com a face do corte voltada para baixo; órgãos de tamanho médio como *coração* ou *rim* devem ser cortados longitudinalmente (partir em duas metades) e emblocados em posição anatômica, com a face externa voltada para baixo.
- colocar o pedaço do tecido no molde apropriado com a face de corte voltada para baixo e cobrir com crioprotetor (OCT, Ames Co., Elkhart, Indiana);
- tampar o tubo e congelar em N₂ líquido;
- cortar em criostato. Para iniciar os cortes deve-se esperar que a temperatura do tecido equilibre com a temperatura do criostato (-25 a -30°C), caso contrário, será difícil a obtenção de cortes finos;
Obs: o tecido pode ser estocado a longo prazo em freezer a -70°C ou em N₂ líquido, ou a curto prazo em freezer a -20°C. Usar gelo seco ou N₂ líquido para transportar o tecido do freezer para o criostato, para evitar descongelamento. Terminados os cortes, cobrir a face exposta do tecido emblocado com uma gota de OCT, congelar, e guardar. Esse procedimento evita o ressecamento do tecido no freezer ou N₂ líquido.

17.1.3. Processamento dos tecidos para microscopia óptica

17.1.3.1. Processamento de tecidos para histopatologia convencional por microscopia óptica

a. Desidratação e diafanização

Material

- tecidos fixados em formalina ou fixador de Millonig
- cestinhas para conter o material identificado
- álcool em concentrações crescentes (70, 80, 90% e absoluto)
- agente diafanizador: xilol e benzeno são mais freqüentemente utilizados

Procedimento

- após a fixação, remover o excesso de líquido fixador; para isso é necessário lavar em água corrente por um período de 30 min a 1h;

- passar os tecidos em soluções alcoólicas de concentrações crescentes, até o álcool absoluto, onde a água é totalmente removida. São seis banhos sucessivos de 1h cada, nas seguintes soluções: álcool 70, 80, 90%, álcool absoluto I, II e III;
- para diafanização, passar o material na solução diafanizadora absoluta (xilol), pois o álcool, como a água, não é miscível com a parafina, havendo assim, a necessidade de ser substituído por um reagente solvente da parafina. São mais três banhos sucessivos de 1h cada nas seguintes soluções: xilol I, II e III.

b. Infiltração e inclusão em parafina

Material

- parafina filtrada
- formas para a inclusão
- bico de Bunsen
- freezer para colocar o material incluído na forma
- estufa na faixa de 56 a 58°C para derreter a parafina
- pinça

Procedimento

- transferir o material do agente diafanizador para a parafina derretida, mantida suficientemente aquecida. A parafina com o ponto de fusão entre 56 e 58° é a desejada para os trabalhos de rotina. A parafina de inclusão deve ser nova e aquecida em torno de 5° acima do seu ponto de fusão. Para infiltração do material por parafina usam-se dois banhos sucessivos de 1h cada nas soluções parafina I e parafina II;
- a inclusão consiste em colocar, através de pinça aquecida, os tecidos previamente infiltrados, com a superfície clivada no fundo da forma preenchida com parafina derretida (solução de parafina III);
Obs: se a parafina de inclusão não for da marca Reagen, deve ser adicionada cera de abelha (aditivo). Outra opção é o uso de pastilhas da Merck; neste caso não há necessidade de adição de cera.
- depois da inclusão, as formas devem ser resfriadas no freezer ou chapa refrigerada; logo após são obtidos blocos com algumas pressões na forma.

c. Microtomia e montagem dos cortes na lâmina

Material

- micrótomo
- porta-bloco
- navalha bem amolada ou descartável
- banho-maria a 45°C
- pinça
- cubas de gelo
- lâminas bem limpas e desengorduradas
- albumina 30%
- pincel com cerdas macias

Procedimento

- montar o bloco no porta-bloco antes de seccioná-lo. A face do bloco a ser cortada deverá ser plana e conter bastante parafina para que se possa desbastá-la até chegar o tecido;
- regular o micrótomo em 5 mm, pois as secções com essa rotina são em geral satisfatórias;
- resfriar bem a superfície do bloco com um cubo de gelo antes de ser cortado, para evitar cortes ressecados;
- operar o micrótomo com movimentos delicados, contínuos e relativamente lentos, para se obter fitas de cortes uniformes;

- estender ou espalhar os cortes que se apresentam ligeiramente enrugados em uma cuba em banho-maria.

Para espalhar os cortes na lâmina faz-se o seguinte procedimento:

- colocar um segmento da fita de cortes, com auxílio de um pincel de cerdas macias, para flutuar na superfície da água aquecida (10°C abaixo do ponto de fusão da parafina);
- transferir ou “pescar” os cortes para as lâminas revestidas com albumina, que tem propriedades adesivas e propicia uma melhor fixação do corte na lâmina;
- colocar as lâminas em uma placa aquecida ou em estufa a 55°C, para a secagem da água e coagulação do filme-adesivo;
- manter o material à temperatura ambiente, protegido da poeira até a desparafinização.

d. Desparafinização e rehidratação

Material

- xilol absoluto
- álcool em diferentes concentrações (70, 80, 90% e absoluto)
- água destilada

Procedimento

- antes de corar os cortes, remover a parafina residual. Para isso, usualmente se emprega-se o xilol como solvente. As lâminas passam por banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: xilol I, II e III;
- se a solução corante a ser usada for aquosa, os cortes são hidratados por passagem seriada em soluções alcoólicas de concentrações decrescentes. Durante a reidratação dos cortes as lâminas não devem ser deixadas secas por completo. As lâminas passam por banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: álcool absoluto I, II e III, álcool 90% , 80%, 70% e água destilada.

e. Coloração por hematoxilina e eosina

Material

- hematoxilina de Harris
- eosina Y
- álcool clorídrico 1%
- água acética 1%
- álcool em diferentes concentrações (70, 80, 90% e absoluto)
- xilol absoluto

Procedimento

- a hematoxilina é aquosa, por isso deve-se mergulhar o material na água para que ocorra a oxidação. A hematoxilina de Harris cora regressivamente. O álcool clorídrico 1% serve para diferenciar o corte, pois a hematoxilina de Harris supercora o tecido. A água acética 1% serve para “segurar” a eosina no tecido. A seqüência de coloração é a seguinte: hematoxilina (15 min) → álcool clorídrico 1% (três mergulhos) → água corrente (até ficar violeta) → eosina (2,5 min) → água acética 1% (três mergulhos);
- o material deve ser desidratado em álcool, pois este remove a água e atua como um agente diferenciador em caso de excesso de corante. São banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: álcool 70, 80, 90%, álcool absoluto I, II e III;
- no clareamento, o xilol torna o tecido transparente. São banhos sucessivos de 3 min cada nas seguintes soluções: Xilol I, II e III.

f. Montagem dos cortes entre lâmina e lamínula

Material

- pinça
- bálsamo do Canadá
- lamínula (com o tamanho apropriado para o corte e bem limpa em solução sulfocrômica)

Procedimento

- retirar, cuidadosamente, sem estragar o tecido, uma lâmina do último banho de xilol, com o auxílio de uma pinça. Permitir um escoamento do excesso do xilol;
- manter a lâmina em uma posição moderadamente inclinada, colocar uma gota de bálsamo do Canadá próximo à borda do corte;
- colocar a lamínula de tamanho apropriado, em um ângulo próximo à borda da lâmina, e permitir que a mesma se deposite sobre o corte. Deve-se tomar cuidado para evitar a formação de bolhas de ar, presas entre a lâmina e lamínula. Caso isto ocorra, as bolhas podem ser retiradas, aplicando-se uma pressão leve sobre a lamínula, com o auxílio de uma pinça. Caso as bolhas persistam, recolocar a lâmina no banho de xilol e quando a lamínula for descolada, remontar o corte;
- após a montagem do corte entre a lâmina e a lamínula, a lâmina deve ser levada ao microscópio óptico a fim de verificar aparecimentos de “dentes”, “microdentes”, ressecamento e artefatos. A depender dos defeitos encontrados, um novo corte do bloco de parafina deverá ser feito.

17.1.3.2 Interpretação das lâminas

A análise histopatológica exige prática e conhecimento de histologia, a fim de que as características a serem observadas nos tecidos sejam bem destacadas. É essencial o conhecimento da histologia normal dos órgãos que serão estudados.

A atenção do observador se concentra em identificar:

- ninhos de parasitas (células com amastigotas em proliferação, e a caracterização do tipo celular infectado)
- focos de infiltrados inflamatórios nos diferentes tecidos dos órgãos em estudo: presença de células polimorfo- ou mononucleares infiltrantes, sua distribuição topográfica na histologia característica do órgão e a composição citológica do infiltrado. O infiltrado pode ser focal, zonal, ou difuso e acúmulos de macrófagos podem até chegar a formar nódulos
- edema
- congestão vascular
- neurite
- necrose focal
- fibrose, hipertrofia e atrofia
- destruição (degeneração) tissular

Após a análise e descrição qualitativa das características histopatológicas encontradas nas lâminas, pode ser feita uma *análise quantitativa*, tanto do *parasitismo tissular* como da *inflamação tissular*. Nos dois casos pode-se analisar:

- a frequência percentual de encontro de ninhos e/ou de focos inflamatórios nos cortes de diferentes animais segundo o grupo experimental estudado
- o número de ninhos de parasitas e/ou de focos inflamatórios por unidade de área observada, expresso em números absolutos ou relativos, de uma a quatro cruzes
- o número de células componentes dos ninhos ou dos infiltrados
- as lesões fibrosas e inflamatórias podem ser graduadas numa escala de cruzes:

- + suave e focal
 - ++ moderadamente difusa e focal
 - +++ difusa severa
- as lesões inflamatórias podem também ser graduadas em extensão de inflamação:
 - 0 ausente
 - + rara e fraca
 - + ocasional e atenuada
 - ++ freqüente e intensa
 - +++ freqüente e muito intensa

17.1.4 Processamento de Tecidos para Imunohistoquímica em Cortes Congelados

O congelamento de órgãos para análises por microscopia óptica é indicado quando se pretende realizar reações imunohistoquímicas, tanto enzimáticas como de fluorescência. A vantagem deste procedimento em reação às técnicas histoquímicas convencionais é a preservação das moléculas, uma vez que os tecidos não passam por agressões físicas (altas temperaturas) ou químicas (uso de fixadores). A seguir apresentaremos os protocolos de preparo de soluções e de realização destas técnicas.

17.1.4.1 Revestimento das lâminas

Material

- lâminas
- gaze
- papel alumínio
- soluções de revestimento: poli-*L*-lisina 0,005% em tampão TRIS HCl 10 mM; ou gelatina 1% - alumen aquosa

Procedimento

- mergulhar *overnight* as lâminas em uma solução de éter:álcool absoluto (1:1);
 - secar bem com gaze;
 - no caso de gelatina, mergulhar rapidamente as lâminas; no caso de poli-*L*-lisina mergulhar por 15 min;
 - escorrer e deixar secar na posição vertical, no suporte de lâminas;
 - embrulhar em papel alumínio para proteger contra poeira (de dez em dez), identificar e datar por fora com cuidado para não tocar na superfície da lâmina;
- Obs: uma opção barata que também funciona é o uso de uma solução com cola plástica (tipo "Polar"): misturar um frasco pequeno de cola a 500 ml de água destilada, homogeneizando bem a solução, e mergulhar rapidamente as lâminas nesta solução, que pode ser usada várias vezes e deve ser guardada em geladeira.

17.1.4.2 Imunoperoxidase indireta em cortes congelados

Material

- tampão TRIS NaCl 0,05 M (salina tamponada com TBS), pH 7,6
- MgCl₂ 10 mM (solução de uso)
- solução de AEC (amino-etil carbazol) 8 mg/ml (solução substrato para peroxidase)
- solução de DAB (diamino benzidina) 6 mg/10ml de Tris 0,05M, pH 7,6

- PBS pH 7,2
- TRIS-HCl 0,1M pH 9,5
- tampão acetato 0,1M pH 5,2
- solução de H₂O₂ 3%

Procedimento para revelação com peroxidase

- obter corte no criostato e recolher em lâmina revestida;
 - secar à temperatura ambiente;
 - fixar em acetona 100% gelada por 10 min ou em PFA 2% em PBS por 3 min;
 - secar;
 - hidratar (banho em PBS por 10 min);
 - bloquear a peroxidase endógena com H₂O₂ 3% em PBS por 20 min;
 - bloquear com PBS-BSA 2,5% ou PBS-leite desnatado 10% por 10 min;
 - bloquear com PBS-soro normal de cabra 10% por 30 min a 1h;
 - incubar com o primeiro anticorpo por 60 a 120 min;
 - lavar em PBS três vezes por 5 min (em banho);
 - incubar com o segundo anticorpo (conjugado com peroxidase) por 60 min;
 - lavar em PBS três vezes 5 min (em banho);
 - revelar a peroxidase com AEC por 10 min ou DAB por 5 min;
 - lavar rapidamente em água corrente para bloqueio da reação;
 - fazer contracoloração com hematoxilina de Mayer por 1min;
 - lavar em água corrente por 10 min;
 - secar e montar em meio aquoso (gelatina) no caso de se usar AEC, ou alcoólico no caso de DAB (neste caso, as lâminas podem ser desidratadas, contracoradas e montadas em meio convencional para histologia).
- Obs: o protocolo de fixação deverá ser inicialmente testado para cada tipo de tecido.

17.1.4.3 Imunocitoquímica com conjugados de fosfatase alcalina em cortes congelados

Material

- solução de lavagem: TBS pH 7,6
- TBS BSA 1% - adicionar 1g de BSA para cada 100 ml de TBS
- TBS leite desnatado 5% - adicionar 5 g de leite para cada 100 ml de TBS
- TBS soro normal 4% - adicionar 4 ml de soro para cada 100 ml de TBS
- soluções de (substrato para fosfatase alcalina): 5-bromo-4-cloro-3-inodolil fosfato/cloreto de nitro-blue tetrazolio em TBS, pH 9,5. O produto formado é azul, insolúvel em água
- meio de incubação para fosfatase alcalina: preparar as soluções estoques de: X-fosfato 50x, NBT-estoque 50 x, MgCl₂ 100 mM e TRIS-HCl 0,2M
- meio de incubação para fosfatase alcalina (solução de uso): X-fosfato 0,38 mM, NBT 0,41 mM, MgCl₂ 10 mM, em TRIS-HCl 0,2 M pH 9,5.

Procedimento

O protocolo geral é o mesmo usado para reação de imunoperoxidase, mas obedece a alguns cuidados específicos:

- todas as etapas devem ser feitas com TBS (salina tamponada com Tris) ao invés de PBS, para evitar artefatos pela presença do fosfato do PBS;
- podem ser usados dois sistemas de revelação, um para azul, com NBT e outro para vermelho, com *fast red*.

17.1.4.4 Montagem, contracoloração e contraste positivo para criocortes

Material

- meio de montagem: gelatina/glicerina
- hematoxilina de Mayer (solução estoque, para contracoloração de tecidos)

Procedimento

- diluir 10x;
- incubar 30 min;
- lavar até retirar todo o corante da água.

17.2 Coleta e Processamento de Órgãos para Microscopia Eletrônica de Transmissão

17.2.1 Coleta para Fixação de Rotina

A coleta do material é uma etapa importante onde devem ser levados em consideração fatores como tempo de retirada do órgão do corpo do animal e manutenção do órgão em solução fisiológica a baixa temperatura, objetivando evitar a autólise do material. Em seguida, o espécime deve ser fixado em solução fixadora previamente escolhida e com metodologia adequada. As diferenças da fixação para microscopia eletrônica em relação à descrita para microscopia óptica (item 17.1.1) são basicamente duas: o tamanho do fragmento clivado e o tipo de fixador.

No anexo 17.2 descrevemos os métodos de preparo dos tampões e fixadores utilizados em microscopia eletrônica.

Na preparação dos tecidos biológicos para observação ultra-estrutural é necessário fixá-los por métodos químicos ou estabilizá-los por métodos físicos (congelamento rápido), para que as estruturas celulares permaneçam de modo o mais próximo ao real. Os órgãos podem ser fixados ainda fazendo parte do organismo (por perfusão) ou o mais rapidamente possível; após a colheita cirúrgica o tecido é cortado em pequenos fragmentos de 1 mm de espessura e colocado imediatamente em solução fixadora tamponada (por imersão). O processo de fixação envolve reações químicas entre os componentes celulares (principalmente proteínas) e o fixador e serve para estabilizar as estruturas celulares. Um par conjugado de ácido-base age como tampão quando este sistema tende a resistir a uma modificação de pH de uma solução, quando se adiciona na mesma $[H]^+$ e $[OH]^-$. Diferentes sistemas de tampões são utilizados em microscopia eletrônica com a finalidade de se manter em um determinado pH nas soluções de fixação, de lavagem, de reações enzimáticas, etc.

Material

- o mesmo utilizado para cortes em criostato
- glutaraldeído (GA) 2,5% em tampão cacodilato de sódio-HCl 0,1 M
- tetróxido de ósmio (OsO_4) a 1% em tampão cacodilato de sódio-HCl, 0,1M

Procedimento

- retirar do órgão e lavá-lo rapidamente com solução salina fisiológica gelada;
- imergir o espécime na solução fixadora de GA a 2,5% em tampão cacodilato de sódio a 0,1M, contendo ou não sacarose a 3,5%, pH 7,2 a 4°C, e se for necessário recortar em fragmentos de no máximo 1 mm³. A fixação deve-se processar no mínimo por 1h;
- lavar em solução de tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,2 a 4°C;
- lavar 3x em tampão para a retirada do excesso de fixador;

Obs: nessa etapa pode-se estocar o material para posterior processamento.

- lavar o material por 2x em tampão;
- pós-fixar com solução de OsO₄ a 1% em tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2 por 1h em temperatura ambiente e no escuro;
- lavar 3x com o mesmo tampão.

17.2.2 Processamento de rotina

Após a fixação do material de modo apropriado para o processamento por microscopia eletrônica, procede-se à desidratação, infiltração e inclusão em resinas para rotina ou especiais para preservação de epitopos imunossensíveis.

A *desidratação* total do tecido é indispensável se a inclusão for feita em resinas não hidrossolúveis, porém deverá ser rápida e progressiva, a fim de ser preservada a estrutura celular. Utilizando-se resinas hidrossolúveis a desidratação não precisa ser total, estas resinas são polimerizadas mesmo com a presença de pequena quantidade de água na célula. Os solventes orgânicos mais utilizados são acetona, álcool e metanol.

A *infiltração* ocorre com uma gradual substituição do agente desidratante pela resina escolhida. Ela é realizada por diminuição gradual e contínua da concentração do solvente proporcionalmente ao aumento da concentração do meio de inclusão.

A *inclusão* consiste em uma completa impregnação do tecido com a resina, pura durante 4 h ou durante à noite. Após esse período o espécime é emblocado em formas ou cápsulas especiais com uma nova resina. Para que aconteça a polimerização com as resinas epoxi é necessário que esta ocorra a 60°C. Com as resinas hidrossolúveis a polimerização ocorre a baixa temperatura sob luz ultravioleta (UV).

Material

- soluções dos agentes desidratantes (solventes orgânicos): séries de acetona, etanol e metanol a 15, 30, 50, 70 e 90%
- resina Epoxi (Epon 812)

Procedimento

- coletar e fixar o material;
- desidratar com série crescente do agente desidratante (30, 50, 70 90 e 100%), durante 10 min cada etapa, sendo que a 100% devem ser feitas três trocas de 10 min cada;
- retirar o agente desidratante substituindo por uma solução do agente desidratante e resina (v/v). Os fragmentos devem ser infiltrados nesta solução durante 18 h a 4°C em frasco bem fechado;
- incluir os espécimes com resina epoxi em cápsulas de gelatina ou em formas próprias, a 60°C, e deixar polimerizar em estufas apropriadas durante 72 h;
- obter cortes ultrafinos em ultramicrótomo, pescar em grades de cobre e acondicionar em placas de Petri pequenas;
- contrastar com solução de acetato de uranila 2% em água por 10 min em placas protegidas da luz e em solução de citrato de chumbo por 3 min;
- observar o material em microscópio de transmissão e fotografar;
- os negativos são revelados e as fotomicrografias são então realizadas. A interpretação qualitativa dos cortes (características do tecido a serem observadas) é feita em fotomicrografias de alta qualidade.

17.2.3 Coleta e fixação de material para incluir em resina lowicryl

Material

- PBS e TBS
- tampão cacodilato de sódio-HCl, 0,2 M
- 4 % PFA
- 0,1-0,5 % GA
- 0,2-1 % ácido pícrico

Procedimento

- retirar do órgão e lavá-lo rapidamente com solução salina fisiológica gelada;
- fixar em PFA 4% + glutaraldeído 0,1 a 0,5% + 0,2 a 1% ácido pícrico em tampão cacodilato 0,1 M + sacarose 3,5 % por 1h a 4°C.

17.2.4 Processamento de material para inclusão em lowicryl

Material

- solução de cloreto de amônia a 50 mM em TBS
 - soluções dos agentes desidratantes (solventes orgânicos): séries de etanol ou metanol a 15, 30, 50, 70 e 90%
 - resina Lowicryl K4M
- Obs: o Lowicryl é neurotóxico.

Procedimento

- lavar 3x por 10 min em tampão cacodilato 0,1 M + sacarose 3,5%;
- lavar 1x em TBS;
- incubar em cloreto de amônia 50 mM em TBS durante 30 min a 4°C para bloquear grupos aldeídicos reativos;
- lavar 4x em TBS;
- desidratar o material em séries crescentes de álcool (metanol ou etanol) por 10 min em cada solução: 30, 50 (a 4°C), 70 e 90% por 10 min a 20°C. Quando o material estiver em suspensão, deve-se cortar o sedimento em metanol 90% ou etanol 90% a -20°C;
- infiltrar o material com Lowicryl e agente desidratante nas seguintes proporções:
metanol 90%/Lowicryl (1:1) (-20°C) *overnight*
metanol 90%/Lowicryl (1:2) (-20°C) *overnight*
Lowicryl puro por 48 h a -20°C
- incluir em cápsulas de gelatina e deixar polimerizar por 5 dias sob luz UV a -20°C. Em seguida, colocar o material à temperatura ambiente ainda sob luz UV por 2 dias;
- obter cortes ultrafinos e colocar sobre grades de níquel (sem contrastar).

17.2.5 Protocolo de imunocitoquímica em cortes de lowicryl

Material

- TBS 0,1M
- cloreto de amônia 50 mM
- TBS/BSA 1%/Tween 1%
- anticorpo específico
- proteína A complexada a ouro coloidal
- acetato de uranila 2% em água

Procedimento

- lavar com TBS 0,1M;
- incubar com cloreto de amônia 50 mM por 30 min para inativar grupamentos aldeídicos reativos;
- incubar 3x por 10 min em TBS/BSA 1%/Tween 1% (BSA para bloquear sítios de ligação inespecífica);
- incubar com o primeiro anticorpo por 1h a 37°C (determinar previamente a concentração do anticorpo);
- lavar com TBS/BSA 1%/Tween 1% - 3x 10 min;
- incubar com a proteína A-ouro coloidal diluída 1:10 por 30 min à temperatura ambiente (a concentração da proteína pode variar);
- lavar com TBS/BSA 1%/ Tween 1% - 2x 5 min;
- lavar com H₂O_{ddd} - 3x 10 min;
- contrastar por 5 min com citrato de chumbo ou por 20 min com acetato de uranila;
- lavar com H₂O_{ddd} e deixar secar;
- guardar as grades em ambiente seco com sílica gel.

17.2.6 Coleta do órgão, fixação, infiltração e obtenção de cortes congelados

Material

- o mesmo utilizado para cortes em criostato (conforme citado anteriormente)
- suportes especiais para criocongelamento e crioultramicrotomia
- 4% PFA em PBS

Procedimento

- logo após a abertura do animal, banhar o órgão em PFA para fixação;
- retirar o órgão;
- fragmentar o órgão imerso em PFA a 4% (cortes de no máximo 1 mm³);
- fixar os fragmentos PFA 4 % por 1h;
- infiltrar com sacarose a 4°C, em banhos sucessivos de 1h cada em soluções de concentração crescente de sacarose (0,5, 1,25, 1,5, 1,7, 1,9 e 2,3 M). Nesta última o material deve ficar toda a noite sob agitação
- colocar o fragmento no suporte juntamente com uma gota de sacarose 2,3 M;
- congelar em N₂ líquido;
- cortar o fragmento congelado em crio-ultramicrotomo. Os cortes são retirados direto da navalha, com o auxílio de uma pinça especial com anel de borracha. Deixa-se secar o anel com sacarose, recolhe-se os cortes que são então depositados na grade e deixados para secar alguns minutos;

Obs: o método pode ser adaptado para o congelamento de células isoladas para corte em crio-ultramicrotomo, incluindo-se as células em gelatina antes da infiltração com sacarose, com o seguinte protocolo:

- fixar as células em 0,5% GA + 2% PFA em PBS pH 7,4 ou 4% PFA por 1h;
- lavar 3x em PBS (10 min/vez);
- emblocar em gelatina 2 a 10% em PBS a 37°C por 30 min;
- centrifugar a 4°C por 30 min;
- cortar em pequenos fragmentos;
- deixar por 2 h à temperatura ambiente em glicina 50 mM em PBS para bloquear grupos aldeídos;
- impregnar em sacarose (crioprotetor): sacarose 0,6 a 2,3 M em PBS pH 7,4 (mínimo de 3 a 6 h).

17.2.7 Processamento dos criocortes incluídos em sacarose para imunocitoquímica

Material

- soluções crescentes de sacarose e de polivinil pirolidina (PVP; Sigma/Peso Molecular 10.000) em PBS pH 7,4
 - 0,5% Sacarose + 20% PVP
 - 1,25% Sacarose + 20% PVP
 - 1,5% Sacarose + 20% PVP
 - 1,7% Sacarose + 20% PVP
 - 1,9% Sacarose + 20% PVP
 - 2,3% Sacarose + 20% PVP
- soro fetal bovino (SFB)
- glicina 0,12%
- PBS-glicina 0,12%
- proteína A-ouro coloidal
- acetato de uranila 2% em água

Procedimento

As grades são transferidas para gotas de PBS sobre uma fita de parafilme. Todas as etapas são feitas a temperatura ambiente:

- incubar os cortes em PBS com 10% de SFB contendo 0,12% de glicina (para reduzir as ligações inespecíficas de anticorpos);
- diluir o anticorpo em PBS contendo 5% de SFB e 0,12% de glicina e incubar a amostra durante 30-60 min. Os anticorpos devem ser centrifugados sempre por 1min antes do uso, com a finalidade de remover agregados. Como controle, incubar os cortes pelo mesmo período de tempo, sem o anticorpo, no tampão (PBS/glicina);
- lavar 4x em PBS com 0,12% de glicina, num total de 15 min;
- diluir a proteína A complexada com ouro coloidal em PBS com 5% SFB + 0,12% de glicina (usar diluição 1:10). Após as lavagens, incubar os controles e os cortes tratados com o anticorpo, por 30 min, com a proteína A-ouro coloidal;
- lavar 6x em PBS com 0,12% de glicina num total de 20 min;
- lavar em água destilada 4x num total de 10 min. Esta etapa é importante para remover os íons fosfatos antes da reação com acetato de uranila;
- incubar em acetato de uranila a 3% pH 7,0-7,5 por 5 min;
- lavar em água destilada 2x num total de 1 min (as etapas 7 e 8 podem ser omitidas);
- contrastação final em metil celulose com 3% de acetato de uranila aquosa (nove partes de metil celulose mais uma parte de ouro). Esta solução fica em gelo e as grades são colocadas nesta solução por 10 min;
- recolher a grade com uma alça, remover o excesso de metil celulose e secar ao ar.

17.3 Coleta e Processamento de Tecidos para Hibridização

A hibridização é uma técnica que permite a detecção e/ou visualização de DNA ou RNA celular em cortes de tecidos, células em suspensão, preparações cromossomiais e ácidos nucleicos imobilizados em suportes sólidos. Esta técnica baseia-se no fato que fragmentos de ácidos nucleicos (DNA ou RNA) marcados com elementos isotópicos ou não isotópicos (sondas) irão hibridizar ácidos nucleicos (DNA ou RNA) celulares sob condições apropriadas de temperatura, força iônica e pH, formando híbridos estáveis.

As primeiras hibridizações foram feitas com ácidos nucleicos (extraídos e purificados) imobilizados em membranas de celulosas. Embora desta maneira seja possível identificar diferentes classes de DNA (Southern) ou RNA (Northern) pelo tamanho dos fragmentos hibridizados com as seqüências de sonda complementares (*antisense*), não há informações sobre a distribuição de seqüências específicas em células individuais. A hibridização *in situ* introduzida na década de 60 permite a demonstração morfológica do DNA e do RNA celular em cortes de tecidos, células em suspensão e preparações cromossomiais.

Uma das vantagens da hibridização *in situ* em relação à imunocitoquímica convencional é que na hibridização revela-se o verdadeiro sítio de síntese de uma determinada proteína enquanto por imunocitoquímica somente é possível revelar a presença do peptídeo. Hoje a hibridização representa um dos principais instrumentos de pesquisa nas mãos de morfologistas, principalmente nos diagnósticos patológicos. Ao contrário do DNA que é estável, o mRNA é extremamente lábil, sendo *in vivo* continuamente sintetizado e degradado. Devido a sua meia-vida extremamente curta, deve-se minimizar possíveis degradações com ribonucleases congelando ou fixando os tecidos imediatamente após sua excisão cirúrgica.

Cuidados para o trabalho com RNA

- toda vidraria e plásticos utilizados devem ser *RNAse free*. Para isso as vidrarias e o material cirúrgico são esterilizados em forno por 5 h a 200°C e os plásticos e outros objetos não esterilizáveis em forno devem ser incubados *overnight* com H₂O tratada com DEPC (dietil pirocarboneto 0,1%, incubando *overnight*). Ponteiras e tubos para microcentrífuga virgens devem ser autoclavados;
- todas as soluções devem ser preparadas com água tratada por DEPC e posteriormente autoclavadas. Durante todas as etapas o operador deve utilizar luvas;
- os tubos de plástico que serão usados na extração devem ser resistentes a fenol e clorofórmio.

Diferentes metodologias são descritas para a preparação do material a ser utilizado em hibridizações feitas em membranas ou *in situ*. A escolha do processamento a ser usado deve visar a boa preservação do material biológico que mantém detalhes da sua morfologia (no caso da hibridização *in situ*), além da retenção dos ácidos nucleicos-alvo com boa exposição das suas seqüências. Temos entre elas:

Hibridização *in situ*

- fixação do tecido, imediatamente após sua obtenção, com paraformaldeído (PFA) 4% e em seguida imersão em solução de sacarose. Após este tratamento, congelar o tecido em N₂ líquido até corte em criostato. Os cortes devem ser aderidos a lâminas revestidas com poli-L-lisina;
- congelamento dos tecidos em N₂ líquido, imediatamente após sua obtenção, corte do tecido em criostato, adesão dos cortes em lâminas revestidas e fixação com PFA 4% (10 min). Após a fixação os cortes podem ser estocados a -70°C até a reação de hibridização. Neste protocolo é possível processar simultaneamente parte do material para extração total do ácido nucleico e hibridização em membranas de celulose, mas há perda na manutenção da morfologia;
- obtenção do tecidos e fixação imediata em PFA 4%, desidratação progressiva em etanol, incubação em xilol e inclusão em parafina. Os cortes obtidos por microtomia devem ser aderidos a lâminas revestidas;
- alguns autores sugerem que após a fixação, as preparações podem ser estocadas indefinidamente em etanol 70% a 4°C permitindo o processamento de amostras de uma cinética experimental ao mesmo tempo.

Fixadores

- pode-se utilizar PFA, PFA acrescido de glutaraldeído ou solução de Bouin. A escolha irá depender diretamente do tipo de tecido, do tipo e do tamanho da sonda;
- durante a fixação ocorre *cross-linking* entre as proteínas e carboidratos das células e os aldeídos dos fixadores. Por isso, dependendo do fixador escolhido, às vezes se faz necessário o uso de diferentes tratamentos para facilitar o

acesso da sonda ao ácido nucléico. Os tratamentos mais freqüentes empregam o uso de enzimas (pronase, proteinase K), a acetilação de grupamentos amino (reduzindo ligações eletrostáticas não específicas), e o uso de detergentes (Triton X100).

Northern blot

- a extração dos ácidos nucléicos de tecidos deve ser feita logo após sua retirada ou, quando não for possível, o tecido deve ser imediatamente congelado e estocado em N₂ líquido ou a -70°C até sua extração;
- no caso de células cultivadas em monocamadas ou em suspensão, lavar as células 3x com PBS (livre de cálcio e magnésio) gelado, adicionando-se em seguida a solução desnaturante e mantendo-as a 4°C. A monocamada deve ser removida do substrato com auxílio de um *rubber policeman* virgem (*RNAse free*) e em seguida processada. Geralmente utilizam-se 100 µl de solução D por 10⁶ células ou 1,8 ml de solução D (ver Anexo 17.3) para cada placa de cultura cujo diâmetro é de 10 cm;
- após a extração e precipitação, os ácidos nucléicos são submetidos a uma eletroforese (geralmente gel de agarose) e transferidos para membranas de celulose ou náilon;
- os ácidos nucléicos podem então ser hibridizados (com uma prévia etapa de bloqueio) e revelados, dando informações quantitativas e qualitativas sobre sua expressão;
- o controle da viabilidade do RNA extraído pode ser feito pela observação das bandas do rRNA de 28S, 18S e 5S que devem estar nítidas e visíveis em géis corados por brometo de etídio;

Obs: a solução de extração (solução desnaturante) é em geral uma combinação de agentes desnaturantes, detergentes e inibidores de RNAses. Atualmente, é mais comum a utilização de soluções comerciais tais como Trizol (Gibco-BRL) e Tri-reagent (Molecular Research Center).

Escolha da sonda

Outra etapa importante das hibridizações se refere à escolha do tipo de sonda, sua marcação e sensibilidade do método utilizado para revelação do seu sinal. Em princípio tanto sondas de DNA ou RNA podem ser utilizadas para localizar seqüências de RNA ou DNA. Cada sonda tem vantagens e desvantagens e sua escolha vai depender da experiência pessoal em técnicas de biologia molecular, acesso e meios para clonagem das sondas e do tipo de seqüência a ser analisada.

As sondas podem ser de DNA fita dupla ou simples, de RNA e de oligonucleotídeos. As sondas de cDNA (DNA complementar à seqüência de um mRNA) de fita dupla são ainda as mais usadas, embora tenham a desvantagem de após serem desnaturadas poderem se realinhar competindo com a hibridização do ácido nucléico em estudo. A difusão da sonda e sua especificidade tem relação direta com o seu tamanho. Em geral para hibridização *in situ* utilizam-se sondas de RNA de 50-200 nucleotídeos e sondas de DNA de 400-600 nucleotídeos. A concentração da sonda também é um fator muito variável mas recomenda-se para hibridizações *in situ* 0,5 ng/ml para sonda de RNA e 1 ng/ml para sonda de DNA.

As sondas podem ser marcadas por meios isotópicos e não isotópicos. Devido à sua alta sensibilidade ainda se utilizam os primeiros. A escolha do tipo de radioisótopo dependerá do nível de resolução necessário em cada investigação. Filmes de auto-radiografia podem ser suficientes para se detectar ácidos nucléicos imobilizados em membranas ou em tecidos mas não em nível celular. Para este tipo de resolução são apropriados I¹²⁵, P³² e S³⁵. Entretanto, se for necessária uma resolução em nível celular deve-se escolher H³ ou S³⁵ e as lâminas devem ser revestidas com uma emulsão fotográfica líquida seguida de revelação. Em *Northern blots* em geral utilizam-se sondas marcadas com P³². Problemas devido à alta periculosidade, pouca estabilidade da sonda e longo tempo de revelação estimulam cada vez mais o uso de sondas não radioativas. A marcação das sondas por elementos não isotópicos incluem o sistema de biotina-avidina, sistema de fluorocromos e de sistemas enzimáticos.

Metodologia de hibridização

Deve-se levar em consideração alguns fatores durante a escolha da metodologia: a temperatura, a força iônica, a solução de bloqueio, a concentração de sonda e o tempo de hibridização.

A formamida (desestabilizador de dupla hélice) que permite uma diminuição da temperatura de hibridização (quanto mais alta a temperatura, maior é a tendência de desestabilizar os híbridos sonda-ácido nucléico-alvo, o que pode contribuir para um menor ruído) e o dextran sulfato (fator de exclusão de volume) são reagentes que, de um modo geral, sempre fazem parte de protocolos de hibridização.

As preparações são quase sempre incubadas em soluções de bloqueio, visando reduzir o *background* ou ruído. Estas soluções geralmente contêm ácidos nucléicos não específicos (para DNA usa-se esperma de salmão, e para RNA o tRNA) e uma solução de bloqueio (solução de Denhardt) que contém Ficoll, PVP (poli-vinil-pirrolidina) e BSA (albumina bovina).

A temperatura ótima de hibridização é extremamente variada levando-se em conta o tipo de sonda, o tamanho, a natureza de nucleotídeos, etc. Em geral se recomenda 42°C para sondas de DNA, 50-55°C para RNA e 37°C para oligonucleotídeos.

Como controles para teste da especificidade da hibridização destacamos tratamentos dos espécimes com RNAses ou DNAses, utilização de sondas não homólogas, utilização de sondas de RNA *sense*, ausência de sonda, etc.

A seguir descreveremos uma metodologia utilizada para análise de mRNA (utilizando sondas isotópicas de cDNA) imobilizadas em membranas de náilon (Lorent et al., 1994).

17.3.1 Northern Blot

Extração de RNA de tecidos

- obter o órgão e congelar e estocar em N₂ líquido ou a -70°C caso não vá ser processado imediatamente;
- extrair com solução desnaturante (solução D) (em geral 1 g tecido/10 ml de solução D) (ver Anexo 17.3);
- transferir para tubo de polipropileno e adicionar sequencialmente, misturando gentilmente por inversão, acetato de sódio 2 M pH 4,0 (1/10 do volume), fenol saturado (1 volume) e clorofórmio + 4% álcool isoamílico (0,2 volume). Agitar vigorosamente por 10 s e incubar no gelo por 15 min;
- separar a fase aquosa da orgânica, através de centrifugação a 39.000 g por 20 min a 4°C;
- adicionar à fase aquosa contendo o RNA volume igual de isopropanol e incubar por 1h a -20°C para precipitar o RNA;
- coletar o RNA por centrifugação (3.300xg por 20 min a 4°C);
- incubar o sedimento (rico em RNA) novamente com solução D e precipitar com isopropanol sob as mesmas condições;
- centrifugar novamente, desprezar o sobrenadante e lavar o sedimento por 3x com etanol 75%;
- secar o sedimento a temperatura ambiente e ressuspender em formamida (100%) ou água tratada com DEPC, no menor volume possível, estocando a -70°C;
- calcular a concentração do RNA total por espectrofotometria (260 nm).

Obs: para quantificar o RNA no espectrofotômetro, diluir 2 µl de RNA em 600 µl de H₂O+DEPC. No tubo controle negativo, adicionar o mesmo volume somente de formamida (2 µl) à H₂O e em outro tubo acrescentar 2 µl de extrato total de DNA. Quanto menor for a contaminação de proteínas e DNA na preparação, mais próximo a 2 deve ser a relação entre 260/280 nm. A leitura de 280 nm é para proteínas e a de 260 nm para ácidos nucléicos. Cada DO₂₆₀ significa 40 µg/ml de RNA. Com este método obtém-se aproximadamente de cada garrafa de cultura de 90 mm cerca de 100/200 µg de RNA.

Eletroforese e transferência

- desnaturar o RNA a 70-100°C por 10 min em solução A (ver Anexo 17.3);
- utilizar 10 µg/ml do RNA total por *slot*. Não esquecer de aplicar, também, um padrão de peso molecular. Géis de 1% de agarose são apropriados para moléculas de RNA maiores do que 1 kb e 1,4% para menores de 1 kb;
- preparar o gel de agarose com 6% formaldeído (ver Anexo 17.3) e realizar a corrida por 5 h a 60V em uma vez

tampão MOPS (ver Anexo 17.3);

- fazer gráfico com os valores do \log_{10} do tamanho das espécies de RNA (padrão) contra a distância migrada e utilizar a curva resultante para cálculo do tamanho das espécies de RNA detectadas pela hibridização após a transferência do gel para a membrana de náilon;
- após a eletroforese, transferir o RNA, por capilaridade, para uma membrana de náilon (Amersham, UK) em tampão 10X SSPE (ver anexo 17.3);
- fixar o RNA à membrana tratando-o por 20 min a 80°C, seguido por *UV-cross-linking* por 45 s (Stratalinker 1800, Stratagene, Heidelberg, Alemanha) ou por 3 min em transiluminador de UV;
- guardar a membrana a -20°C até a etapa de hibridização.

Obs 1: a cuba de eletroforese deve ser limpa com detergente, lavada com água, seca com etanol e incubada com um volume de H₂O₂ a 3% por 10 min à temperatura ambiente. Em seguida lavar abundantemente com H₂O₂-DEPC. Deve-se também pré-incubar a cuba (com os pentes) com H₂O₂-DEPC, *overnight* antes da eletroforese

Obs 2: como os vapores de formol são tóxicos, as soluções contendo este fixador devem ser manuseadas em capelas de exaustão, utilizando-se luvas. O brometo de etídeo é mutagênico e tóxico e somente deve ser manuseado com luvas e as suas soluções devem ser adequadamente descontaminadas.

Marcação da sonda

Para marcação isotópica ou não isotópica da sonda utilizar protocolo indicado pelo fabricante.

Hibridização

- incubar as membranas em solução de pre-hibridização (ver anexo 17.3) por 7 h a 42°C e em seguida *overnight* nesta mesma solução acrescentando 10% dextran sulfato e a sonda marcada já desnaturada (2x10⁶ cpm/ml);
- recuperar a solução e guardar a -20°C (para ser utilizada para nova hibridização);
- lavar a membrana por três vezes rapidamente com SSPE 0,3X/0,5 % SDS, lavar por 1h a 60°C com SSPE 0,3X/0,5 % SDS (200 ml);
- após as lavagens, checar o sinal com um contador Geiger (caso seja sonda isotópica) e expor a membrana um filme de raio X com intensificador a -70°C;
- após revelação, o filme pode ser analisado por um programa de densitometria.

Obs 1: a temperatura e o conteúdo da soluções de hibridização e de pós-hibridização variam (dependendo da natureza da sonda, tamanho, natureza de suas bases); desta forma as condições de stringência devem ser determinadas para cada tipo de sonda e ácido nucléico a ser estudado. A solução citada acima foi utilizada para ensaios de revelação de mRNA para proteína sérica α 2-macroglobulina utilizando sonda isotópica de cDNA (50bp)

Obs 2: para reutilizar a membrana de náilon para outras hibridizações, ela deve ser previamente incubada com uma solução com 0,5% de SDS 40 mM Tris pH 7,8 por 15 min a 80°C e em seguida mantida a -20°C.

Anexo 17.1

Soluções para Imunohistoquímica

1. Soluções fixadoras

Formalina a 10% em PBS

Fixador de Milloning-Rosman

Fosfato de sódio anidro dibásico	18,4 g
Ácido fosfórico (H_3PO_4) ou difosfórico	1,68 g
Água destilada	900 ml
Formaldeído Merck	100 ml

- dissolver o sal com água destilada e depois acrescentar o ácido fosfórico
- deixar esfriar acrescentar o formaldeído
- corrigir o pH se necessário para 7,3-7,4 com solução de NaOH

2. Solução de gelatina para revestimento de lâminas

Gelatina	1 g
Alúmem de cromo	0,005 g
H ₂ O	100 ml

- aquecer a 60-70°C para dissolver

3. Soluções e tampões para reações de imunohistoquímica com peroxidase

PBS (25X): uso para reações de peroxidase

NaCl	180 g
K ₂ HPO ₄ anidro	188 g
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	33 g
H ₂ O deionizada	qsp 1000 ml

Tampão TRIS NaCl 0,05 M (salina tamponada com TBS)

Solução A: TRIS 0,5M 10X pH 7,6	
Tris base 0,5M	30,28 g
H ₂ O _{dd}	500 ml
Solução B: NaCl 10X 1,5M	
NaCl	43,83 g
H ₂ O _{dd}	500 ml
Tampão 0,05 M pH 7,6	
Solução A	50 ml
Solução B	50 ml
H ₂ O _{dd}	400 ml

TRIS-HCl 0,2M pH 9,5

Solução A: TRIS 0,8 M	
TRIS	24,23 g
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Solução B: HCl 0,2N	
HCl ¹	0,73g
H ₂ O _{dd}	100 ml
Tampão 0,2 M pH 9,5	
Solução A	25 ml
Solução B	até pH 9,5
H ₂ O _{dd}	100 ml

¹densidade específica: 1,19**Tampão acetato 0,1M pH 5,2**

Solução A	
Acetato de sódio (CH ₃ COONa.3H ₂ O) 0,1M	13,6 g
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Solução B	
Ácido acético glacial 0,1N	575 ml
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Tampão 0,1 M pH 5,2	
Solução A	79
Solução B	21

AEC (amino-etil carbazol) (substrato para peroxidase)

Solução estoque AEC	
AEC	120 mg
N, N, dimetilformamida	15 ml
Solução trabalho¹	
AEC estoque	0,5 ml
Tampão acetato	9,5 ml
H ₂ O ₂ 3 %	50 µl

¹misturar bem**DAB (diamino benzidina) (substrato para peroxidase)**

Solução de uso DAB¹	
DAB	6 mg
Tampão Tris 0,05M, pH 7,6	10 ml
H ₂ O ₂ 3 %	100 ml

¹preparar no momento de usar. Evitar inalação ou contato direto com a pele; a solução deve ser filtrada se ocorrer precipitação**4. Soluções para reações de fosfatase alcalina**

- solução de lavagem: TBS 0,05 M pH 7,6 (o mesmo usado em reações para peroxidase)
- TBS/BSA 1%
- TBS/leite desnatado 5%
- TBS/soro normal 4%

Soluções estoque para fosfatase alcalina

X-fosfato 50X 19 mM¹	
X-fosfato (5-Bromo-4-cloro-3-indolil fosfato)	7 mg
DMF (dimetilformamida)	1 ml
NBT 50X 20,5 mM¹	
NBT (cloreto de nitro-blue tetrazólio)	16,7 mg
DMF	1 ml
MgCl₂ 100 mM	
MgCl ₂ .6H ₂ O	0,95 g
H ₂ O	100 ml

¹preparar alíquotas de 200 µl e congelar

Meio de incubação para fosfatase alcalina

	conc. final (mM)	
TRIS-HCl 0,2M pH 9,5	9 ml	
X-fosfato 19 mM	200 ml	0,38
NBT 20,5 mM	200 ml	0,41
MgCl ₂ 100 mM	1 ml	10

- dissolver primeiro X-fosfato e NBT em dimetilformamida 70%

Obs: o produto formado é azul, insolúvel em água

5. Meio de montagem para lâminas com cortes congelados

Gelatina	10 g
H ₂ O _{dd}	60 ml
Glicerina	70 ml
Fenol líquido	1 ml

- misturar a gelatina com a água, aquecer para dissolver (banho-maria, placa ou direto no fogo)
- adicionar glicerina e fenol

6. Soluções para contracoloração de criocortes

Hematoxilina de Mayer (solução estoque)	
Hematoxilina (cristais)	1 g
H ₂ O _{dd}	1000 ml
Iodato de sódio	0,2 g
Alúmem de amônia ou potássio	50 g
Ácido cítrico	1 g
Hidrato de cloral	50 g

- dissolver a hematoxilina em água, usando aquecimento, se necessário
- adicionar o iodato de sódio e o sulfato de alumínio
- misturar até que o sulfato de alumínio esteja completamente dissolvido
- adicionar o ácido cítrico e o hidrato de cloral
- guardar em vidro apropriado. Evitar usar logo após o preparo

Obs: a cor final é violeta avermelhada

Anexo 17.2

Soluções para microscopia eletrônica

1. Tampões para microscopia eletrônica

Tampão fosfato 0,1M

Solução A (fosfato monossódico) 0,2 M	
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O (PM 156)	15,6 g
H ₂ O _{ddt}	qsp 100 ml
Solução B (fosfato dissódico) 0,2 M	
Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O (PM 358)	35,8 g
H ₂ O _{ddt}	qsp 100ml
Tampão 0,1 M pH 7,2	
Solução A	28 ml
Solução B	72 ml
H ₂ O _{ddt}	100 ml
Tampão 0,1 M pH 7,4	
Solução A	19 ml
Solução B	81 ml
H ₂ O _{ddt}	100 ml

Tampão cacodilato de sódio-HCl 0,1M

Solução estoque de cacodilato 0,2 M	
Na(CH ₃) ₂ AsO ₂ ·3H ₂ O (PM 214)	42,8 g
H ₂ O _{ddt}	qsp 100 ml
Tampão cacodilato 0,2M	
Solução estoque 0,2M	
HCl 0,2 N	gotejar até atingir o pH desejado
Tampão cacodilato 0,1 M pH 7,2	
Solução estoque	50 ml
HCl 0,2M	4,2 ml
H ₂ O _{ddt}	qsp 100 ml
Tampão cacodilato 0,1 M pH 7,4	
Solução estoque	50 ml
HCl 0,2N	2,7 ml
H ₂ O _{ddt}	qsp 100 ml

2. Soluções de fixadores

- glutaraldeído (GA) (HOC.(CH₂)₃.COH) é comercializado em soluções nas concentrações de 25% e 50%;
- paraformaldeído (PFA) (CH₂O)_n (trioximetileno), um polímero do formol, é comercializado em pó;
- tetróxido de ósmio (OsO₄), comercializado puro, cristalizado, em ampolas de 0,25 g a 5 g.

Solução estoque de PFA

- aquecer 100 ml de H₂O_{ddt}, adicionar 8 g de PFA e deixar hidratar por 2-3 min;
- aquecer a solução em torno de 60-80°C, sob agitação, em capela de exaustão por 15-30 min;
- adicionar uma-duas gotas de NaOH 1N, para clarear a solução;
- deixar esfriar e conservar em geladeira em frasco hermeticamente fechado;

Obs: esta solução pode ser feita em várias concentrações em geral na faixa de 2 a 8%.

Solução estoque de tetróxido de ósmio 2%

- colocar 25 ml H_2O_{ddd} em um frasco âmbar e reservar;
- lavar bem uma ampola de OsO_4 500 mg, cortá-la com diamante e quebrá-la;
- colocar os cristais de OsO_4 juntamente com os fragmentos da ampola e colocar dentro do frasco com os 25ml H_2O_{ddd} ;
- deixar o OsO_4 dissolver durante uma noite a temperatura ambiente;
- conservar o frasco contendo a solução a 2% envolvido com papel alumínio na geladeira.

Solução fixadora de GA 2,5%	
Solução estoque GA 25%	1 ml
Tampão cacodilato 0,1 M pH7,2	9 ml
Solução fixadora de PFA%	
Solução estoque PFA 8%	5 ml
Tampão cacodilato-HCl 0,2M	5 ml
Solução fixadora de OsO_4 1%	
Solução estoque OsO_4 2%	5 ml
Tampão cacodilato-HCl 0,2M	5 ml

3. Agentes desidratantes

- os mais utilizados em técnicas de microscopia eletrônica são os solventes orgânicos acetona, álcool e metanol;
- os agentes desidratantes são diluídos em H_2O_{ddd} nas concentrações de 15, 30, 50, 70 e 90% e conservados em geladeira.

4. Resinas

As mais utilizadas para rotina em microscopia eletrônica de transmissão são as resinas Epoxi (Epon, Araldite e Spurr) com polimerização a 60°C.

As resinas Lowicryl (K4M e HM20) com polimerização a -20°C sob luz ultravioleta e as resinas London (LR-White e LR-Gold) são mais usadas em estudos onde precisam ser preservados os sítios antigênicos das estruturas celulares.

Preparo da resina Epon

- colocar em uma proveta bem limpa 25 ml de Epon 812;
- adicionar 17 ml de MNA;
- misturar durante 3 min sem formar bolhas;
- adicionar 32 gotas de DMP-30 e continuar misturando por 30 min a temperatura ambiente

Obs: a resina já pronta deve ser colocada em recipiente bem fechado e conservada no congelador da geladeira. Ela não deve permanecer fora da refrigeração devido à polimerização começar a ocorrer mesmo a temperatura ambiente. Para ser usada ela deve ser retirada com antecedência para o descongelamento.

5. Polivinil pirolidina (PVP - 10) para criocortes

PVP-10	3 g
H_2O	2,4 ml
Na_2CO_3 1,1 M	0,6 ml
Sacarose 2,3 M	7 ml

- misturar e deixar secar por uma noite na geladeira (solução estável por poucas semanas a 4°C)
- antes do uso adicionar 10% de volume de H_2O destilada ou 0,1 M tampão fosfato (solução não estável)

Anexo 17.3

Soluções para uso em hibridização

Solução D¹

Isotiocianato de guanidina	11,81 g
Citrato de sódio 75mM pH 7,0	8,33 ml
Sarcosil 10%	1,25 ml
H ₂ O-DEPC	completar para 25 ml

¹Chomczynski et al. 1987.

- dissolver a 65°C;
- acrescentar 7,2 ml de 2-mercaptoetanol por ml de solução (180 ml para 25 ml);
- concentrações finais: isotiocianato de guanidina 4M; citrato de sódio 25mM, sarcosil 0,5% p/v; e 2-mercaptoetanol 0,1M.

Solução A¹

10 mg de RNA em formamida	10 ml
Formamida deionizada	2,5 ml
GLB 2,5 mg/ml	3 ml
H ₂ O-DEPC	2,5 ml
Formaldeído 37%	4 ml
Brometo de etídeo 5 mg/ml	0,5 ml
Tampão MOPS 10X pH 8,0	2,5 ml

¹Lorent et al., 1994

- concentrações finais: formamida 50%, formaldeído 6%, brometo de etídeo 0,1 mg/ml, MOPS 1X.

Tampão SSPE 20X

Cloreto de sódio	175,3 g
Fosfato de sódio NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O	31,2 g
EDTA 0,5M pH 8,0	40 ml
H ₂ O-DEPC	800 ml

- ajustar o pH para 7,4 e completar o volume para 1 litro
- adicionar 1 ml de DEPC, homogenizar, incubar *overnight* e autoclavar.
- concentrações finais: cloreto de sódio 3M, fosfato de sódio 0,2M, EDTA 0,02M.

Solução de pré-hibridização

SSPE 20X	12,5 ml
Denhardts ¹ 100X	2,5 ml
SDS 10%	2,5 ml
Formamida	25 ml
DNA de salmão desnaturado 10 mg/ml	500 ml
heparina 10 mg/ml	250 ml
H ₂ O-DEPC	6,75 ml

¹2% PVP, 2% BSA, 2% Ficoll-400

- concentrações finais: SSPE 5X, Denhardts 5X, SDS 0,5%, formamida 50%, DNA 100 mg/ml, heparina 50 µg/ml

Gel de agarose 1%

Agarose	1 g
MOPS 10X	10 ml
H ₂ O-DEPC	75 ml

- aquecer até dissolução da agarose
- manter em banho a 60°C por 10 min e acrescentar 17 ml de formaldeído (37%)
- misturar bem

Tampão MOPS 10x pH 7,0

3-(morpholene) propane-sulfonic acid	41,86 g
Acetato de sódio 3M pH 7,0	16,6 mg
EDTA 0,5M pH 8,0	20 ml
H ₂ O-DEPC	900 ml

- ajustar o pH para 7,0, completar o volume para 1 litro com H₂O-DEPC
- adicionar 1 ml de DEPC, homogenizar, incubar *overnight* e autoclavar
- concentrações finais: MOPS 0,2 M, acetato de sódio 0,05 M, EDTA 0,01 M.

GLB 2,5 mg/ml

Azul de bromofenol	50 mg
Glicerol	10 ml
H ₂ O-DEPC	10 ml

H₂O-DEPC

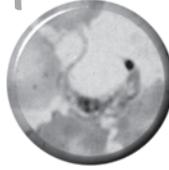
DEPC	1 ml
H ₂ O-DEPC	1000 ml

- homogenizar bem, incubar *overnight* à temperatura ambiente e autoclavar

Referências Bibliográficas

- CHOMCZYNSKI, P. & SACCHI, N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidiniumthiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Analytical Biochemistry* 162:156-159, 1987.
- LORENT, K.; OVERBERGH, L.; VAN LEUVEN, F. & VAN DEN BERGHE, H. Distribution of mRNA coding for α -2-macroglobulin, the murinoglobulins, the α -2-macroglobulin receptor and the α -2-macroglobulin receptor associated protein during mouse embryogenesis and in adult tissues. *Differentiation* 55:213-223, 1994.

Capítulo 18



Obtenção de Células de Camundongo para Estudos *In Vitro* em Cultivo Primário

18.1

Interação do *Trypanosoma cruzi* com Células Hospedeiras: Estudos *In Vitro*

Maria de Nazareth L. Meirelles & Tania C. Araújo-Jorge

Como toda a vida no reino animal, a vida para um tripanosoma é essencialmente uma questão de se nutrir, sobreviver e se reproduzir sob diferentes condições e fontes nutricionais. O *T. cruzi* desenvolveu uma biologia interessante, adaptada a diferentes ambientes nos hospedeiros vertebrado e invertebrado, e a estocar energia suficiente para assegurar sua reprodução e sobrevivência em condições completamente diferentes.

O estudo da biologia celular do *T. cruzi* em seu ambiente intracelular no vertebrado nas células do hospedeiras foi iniciado no Brasil com os trabalhos da Dra. Hertha Meyer, que também foi a primeira a publicar imagens de microscopia eletrônica deste parasita (Meyer & Porter, 1954). Ela se radicou no Rio de Janeiro, no Inst. de Biofísica da UFRJ, por convite de Carlos Chagas Filho, durante a Segunda Guerra Mundial. Hertha Meyer introduziu a cultura *in vitro* de células musculares e neurais e estudou todos os estágios de desenvolvimento do *T. cruzi* (De Souza, 1984). A aplicação de cultura de células *in vitro* atinge vários campos de interesse, tais como os mecanismos de reconhecimento e invasão celular utilizados pelo parasita, sua fisiologia nutritiva e energética, os mecanismos de sua resistência ou susceptibilidade a agentes quimioterápicos tais como enzimas envolvidas em processos de virulência ou de detoxicação.

O *T. cruzi* se desenvolve e multiplica dentro das células do hospedeiro vertebrado. O ciclo do protozoário ocorre em células de invertebrados e de vertebrados com três estágios evolutivos do parasita: amastigotas, tripomastigotas e epimastigotas. Epimastigotas e tripomastigotas são encontrados no inseto vetor triatomíneo, amastigotas e tripomastigotas no hospedeiro vertebrado (Brener, 1973). A infecção do hospedeiro mamífero ocorre quando células hospedeiras são invadidas por formas tripomastigotas metacíclicas presentes nas fezes do inseto vetor durante sua alimentação sanguícola.

Desde os trabalhos pioneiros de Dias (1934), Kofoid et al. (1935) e de Meyer & Xavier-de-Oliveira (1948), sabe-se que, dependendo da cepa, o *T. cruzi* leva menos de 20 minutos para entrar na célula hospedeira. Ele prolifera por divisão binária por 2 a 9 ciclos até preencher completamente o citoplasma, em 4 a 5 dias, levando então à ruptura e liberação de novos tripomastigotas. Após a invasão, em 1 a 2 horas o parasita rompe a membrana do vacúolo parasitóforo que o envolve inicialmente (Burleigh & Andrews, 1995), 2-3 horas para se transformar em amastigotas e entrar na fase G1/G2 do ciclo de divisão celular, e 24 a 44 horas para sintetizar DNA. O tempo de geração dos amastigotas pode levar de 8 a 15 horas, dependendo da cepa de parasita, mas a citocinese é rápida, e ocorre em 20 a 30 minutos (Hyde & Dvorak 1973). Em todos os tipos celulares já estudados, encontrou-se uma distribuição binomial negativa das células infectadas (Hyde & Dvorak, 1973; Pécora et al., 1980), indicando que durante as primeiras 24 horas de contato parasita-célula, as células que já foram infectadas se tornam mais susceptíveis à uma segunda invasão, provavelmente porque sua carga de superfície se modifica após a infecção (Soeiro et al., 1994). O *T. cruzi* pode invadir células sem núcleo, mas não se desenvolve (Osuna et al., 1983).

Os mecanismos moleculares que regulam a patogenicidade do *T. cruzi* não estão esclarecidos, apesar do considerável progresso feito no sentido de esclarecer mecanismos de invasão celular e sobrevivência do parasito dentro das células hospedeiras (Zingales & Coli, 1982; Meirelles et al., 1984, 1986; Araújo-Jorge, 1989; Burleigh & Andrews, 1995). Este evento parece ser um processo de muitas etapas, envolvendo um variado número de moléculas tanto no parasito como no hospedeiro. É exatamente nesses aspectos que reside o grande potencial dos modelos *in vitro* para o estudo da interação *T. cruzi*-célula hospedeira.

Em animais infectados, assim como no homem, existem evidências de um tropismo do parasito por células do sistema fagocítico mononuclear, e por células musculares e nervosas (Andrade, 1974; Melo & Brener, 1978). Porém *in vitro*, o *T. cruzi* demonstra capacidade de invasão em todos os tipos celulares testados. Os macrófagos desempenham um papel importante na resistência do hospedeiro à infecção pelo *T. cruzi*, sendo o hospedeiro inicial para este parasita. O primeiro estudo *in vitro* realizado com macrófagos foi o de Muniz & Freitas (1946) utilizando macrófagos peritoneais de cobaio e seguindo a multiplicação do parasita no interior das células.

A interação *T. cruzi*-célula hospedeira tem sido estudada em três sistemas principais: a) macrófagos e demais células fagocíticas, hematológicas; b) diferentes linhagens celulares estabelecidas (fagócitos profissionais ou não); c) células musculares de cultivo primário (esqueléticas e cardíacas) ou diferenciadas a partir de linhagens de mioblastos. Em todos os sistemas identifica-se uma fase de reconhecimento e outra de invasão, seguidas de multiplicação intracelular do parasita ou do seu controle (Figs. 1-2).

A fase do reconhecimento celular envolve uma etapa inicial de adesão do parasita à célula hospedeira seguida de sua internalização sempre dentro de um vacúolo fagocítico. A fusão fago-lisosomal foi observada para todos os três estágios evolutivos do parasita (Nogueira & Cohn, 1976; Milder & Kloetzel, 1979; Meirelles & De Souza, 1985; Ley et al., 1988; Meirelles et al., 1996).

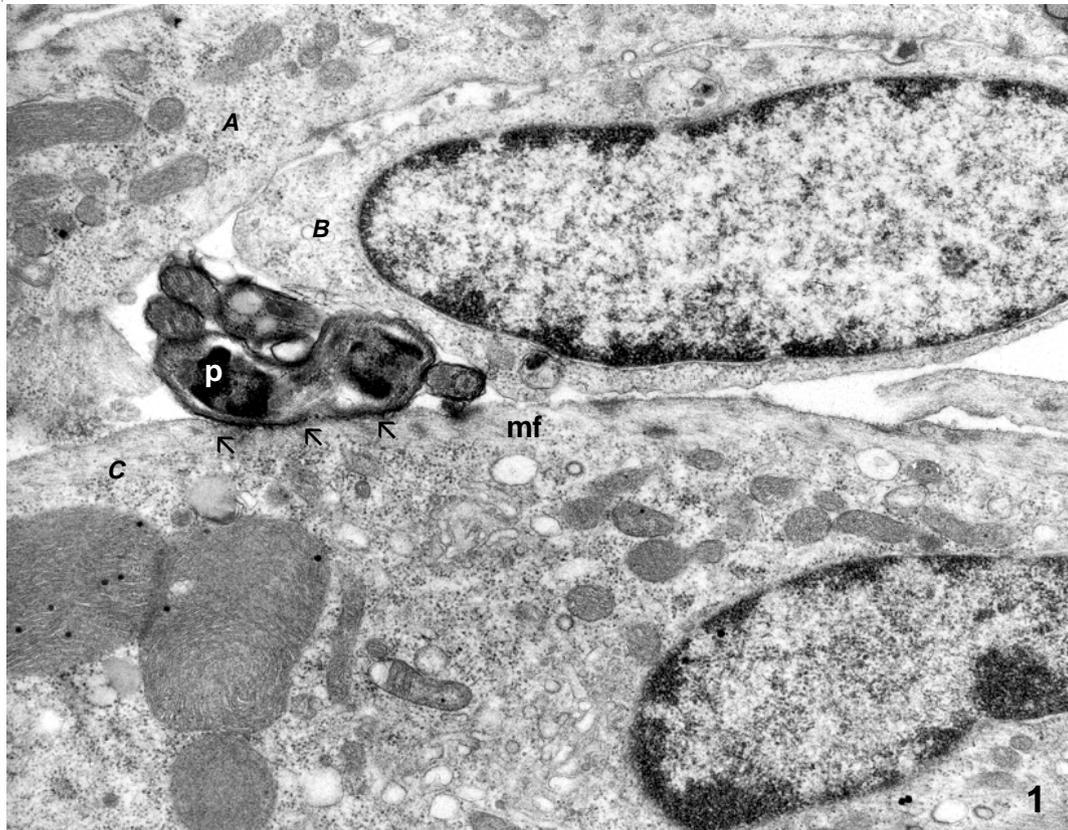


Figura 1. Forma tripomastigota de *T. cruzi* (cepa Y) obtida do sangue de camundongo aderida a cardiomiócitos de uma cultura de células musculares de embrião de camundongo. O parasita faz contato com três células (A, B, C). Notar regiões mais densas na adesão do parasita ao cardiomiócito C (cabeças de seta); p (parasita); mf (miofibrilas). Aumento 29.750X

Figura 2. Células musculares cardíacas acopladas contendo uma forma tripomastigota do *T. cruzi* no vacúolo parasitóforo. Notar uma região de junção *gap* em contato íntimo com o parasita (setas); p (parasita). Aumento 53.000X

18.1.1. Estudos com Macrófagos

A adesão e interiorização são etapas dissociadas na interação macrófago-*T. cruzi*. Tratamentos com baixa temperatura ou com drogas que interferem com a maquinaria fagocítica permitem a adesão mas não a internalização (Henriquez et al., 1982; Andrews & Colli, 1982; Meirelles et al., 1982). Há uma controvérsia na literatura sobre o uso de drogas como citocalasinas e colchicina, que atuam respectivamente nos microfilamentos e microtúbulos: se impedem ou não a etapa de interiorização. Um substancial conjunto de dados mostra inibição com as citocalasinas em tipos celulares como macrófagos e músculo cardíaco indicando a fagocitose como mecanismo principal, mas sugerindo que mecanismos adicionais de interiorização também estão envolvidos nesta interação. Outros autores encontraram em fibroblastos, células de linhagem, um aumento na invasão após uma exposição breve da célula hospedeira à citocalasina D, que removeria a barreira cortical do citoesqueleto de actina, facilitando o acesso dos lisossomos até a membrana plasmática e sua subsequente fusão. A fusão dos lisossomos seria requerida na entrada do *T. cruzi*, provavelmente como uma fonte de membrana para formar o vacúolo onde o parasita é encontrado nas etapas iniciais da interiorização (Tardieux et al., 1994).

O papel de carboidratos na adesão e internalização dos parasitas é geralmente aceito. Várias abordagens experimentais foram realizadas seja pelo tratamento do parasita ou da célula hospedeira com glicosidases ou por ensaios de inibição com lectinas solúveis e monossacarídeos, ou ainda pelo uso de linhagens mutantes deficientes em glicoconjugados.

Um dos principais açúcares envolvidos na interação parasito-célula é o ácido siálico. Trabalhando com macrófagos peritoneais como célula hospedeira, tratamentos com neuramidase exógena (que remove ácido siálico) ou o bloqueio do ácido siálico com lectina específica, observou-se aumentos nos índices fagocíticos (Araújo Jorge & De Souza, 1984, 1986; de Titto & Araújo, 1987). Esse resultado também foi obtido com o tratamento do parasita com ferritina cationizada, molécula que neutraliza a alta negatividade da superfície das formas tripomastigotas do parasita (Meirelles et al., 1984). Lectinas de superfície que reconhecem resíduos de galactose foram detectados na superfície de macrófagos e a inibição da interiorização do *T. cruzi* por mono- e dissacarídeos de galactose sugere que esses resíduos na superfície do parasita estão sendo reconhecidos por galectinas. A adição de asialoeritrócitos inibe fortemente a invasão de tripomastigotas em macrófagos residentes, competindo por uma lectina específica para galactose (Araújo Jorge & De Souza, 1988; Araújo Jorge et al., 1989). Foi também descrito que em pacientes chagásicos são produzidos altos níveis de anticorpos anti-epitopos galactosil (Milani & Travassos, 1988; Avila et al., 1989) e que anticorpos anti-galactose diminuem a invasão em linhagens celulares *in vitro* (Arruda et al., 1989). Células mutantes deficientes em ácido siálico (*Lec2*), comparadas com células do tipo selvagem, apresentam uma inibição de 50% na interiorização de formas infectivas do parasita. Se as células mutantes forem tratadas com a enzima trans-sialidase do *T. cruzi* e uma fonte exógena de ácido siálico, o processo de invasão é restaurado e são observados níveis de infecção semelhantes às células-controle, sugerindo fortemente que o ácido siálico está envolvido no processo de reconhecimento e de invasão celular nesta interação (Stanley & Siminovitch, 1977; Vermelho et al., 1994). Experimentos semelhantes realizados com células do tipo selvagem e células mutantes que não possuem proteoglicanos (células CHO, de ovário de hamster) apontam também um papel para glicosaminoglicanos heparan sulfato e heparina na invasão do *T. cruzi* (Herrera et al., 1994). Estes resultados parecem indicar que o parasita utiliza moléculas ubíquas (negativamente carregadas), como receptores da célula hospedeira, o que pode explicar a razão de o parasita invadir uma grande variedade de células de vertebrados.

Alguns experimentos realizados com macrófagos de aves obtidos pela diferenciação *in vitro* de monócitos de sangue (Meirelles et al., 1980) interagindo com formas epimastigotas e tripomastigotas das cepas Y e CL, e observadas por períodos de 2, 6, 12 e 20 horas mostraram diferenças acentuadas na interação desses dois estágios e entre as duas cepas. Praticamente todos os macrófagos fagocitam formas epimastigotas da cepa CL após 2 e 6 horas de contato, mas somente 50-60% foram infectados com a cepa Y. Para a forma tripomastigota,

entre 6 e 12 horas, quase todos os parasitas da cepa Y foram encontrados no interior dos macrófagos, mas para a cepa CL a internalização chegou a 60% e muitas formas permaneceram no sobrenadante das culturas indicando que diferentes propriedades de superfície destas duas cepas têm papel relevante no processo de sua interiorização.

Estudos posteriores com este macrófagos foram feitos para seguir o destino intracelular de formas tripomastigotas do *T. cruzi* e compará-los com os resultados já conhecidos em macrófagos de camundongos (Meirelles & De Souza, 1983). Entre 24 e 36 horas um intenso processo de digestão foi observado e em 72 horas os parasitas desapareciam e não foram observados nem dentro dos macrófagos nem no sobrenadante dos mesmos. Com a finalidade de esclarecer se esta propriedade de digerir parasitas era específica contra o *T. cruzi*, dois outros parasitas intracelulares foram testados: formas amastigotas de *Leishmania mexicana mexicana* e taquizoítas de *Toxoplasma gondii*. No caso da *Leishmania* houve 100% de internalização, porém após 48 horas iniciou-se o processo de digestão, de modo que após 72 horas os parasitas não eram mais observados nos macrófagos de aves. Tanto com *Leishmania* como com o *T. cruzi*, os macrófagos de aves após o processo de destruição dos parasitas se fundiam formando grandes células multinucleadas com até oito núcleos. No caso do *Toxoplasma gondii*, como já referido anteriormente na literatura, os parasitas se multiplicavam dentro de vacúolos citoplasmáticos dos macrófagos de aves, formando rosetas típicas (Nery-Guimarães & Meyer, 1942). Em experimentos paralelos, feitos em macrófagos de camundongos, as três formas de parasitos completavam seu ciclo intracelular. *Toxoplasma gondii* mostrou-se resistente a macrófagos de aves e é bem conhecido que este parasita infecta aves (Meirelles & De Souza, 1983). Porém, é bem conhecido também que aves não são infectadas por *T. cruzi* e foi descrito que após 18 dias de incubação aparece um fator lítico no sangue dos embriões que os torna resistentes à infecção pelo *T. cruzi* (Dias, 1944; Nery-Guimarães et al., 1974; Kierzembaum et al., 1976). Baseados nestes estudos foi considerado que as aves são refratárias ao parasita em consequência da susceptibilidade do *T. cruzi* à lise por complemento. Estudos prévios referem que no processo de ingestão do *T. cruzi* por macrófagos ocorre a produção de grande quantidade de compostos reativos intermediários do oxigênio que tem atividade microbicida. Em nossos estudos localizamos, a nível ultraestrutural a presença de H_2O_2 nos vacúolos que continham os parasitas. Estes resultados sugerem que além do conhecido efeito do complemento, mecanismos celulares têm algum papel na refratariedade das aves a tripanosomatídeos (Meirelles & De Souza, 1983).

18.1.2. Estudos com Células Musculares

As células musculares são o principal alvo na infecção chagásica. Estabelecemos um sistema de cultivo primário de células musculares cardíacas (CMC) e esqueléticas (CME), obtidas de embriões de camundongos, para investigar eventos iniciais envolvidos na invasão do *T. cruzi* e na sua sobrevivência dentro destas células hospedeiras (Meirelles et al., 1986; Araújo-Jorge et al., 1987). Neste sistema foi possível localizar pela primeira vez o *T. cruzi* dentro de um vacúolo parasitóforo no citoplasma dos miócitos e demonstrar a fusão dos lisosomas, marcados com peroxidase e com fosfatase ácida, com o fagossoma contendo o parasita (Meirelles et al., 1986).

A organização do citoesqueleto de CMC normais e infectadas pelo parasita foi investigada por imunofluorescência e microscopia eletrônica de transmissão. As sondas fluorescentes revelaram que com 24-48 horas de infecção os microtúbulos, os filamentos de actina e de desmina se mostravam rompidos e que ocorria a quebra das miofibrilas. Combinando técnicas de microscopia eletrônica analítica com sintonização do contraste, detectamos uma rede de filamentos altamente interconectada em células normais e bastante frouxa nas células que continham parasitas já em multiplicação e diferenciação (Pereira et al., 1993). Estudos posteriores feitos com formas metacíclicas do clone Dm28c que apresentam altos níveis de interiorização em células musculares e que foram submetidas a tratamentos com citocalasinas (B e D) durante a interação. Estas drogas não afetaram a adesão do parasita mas causaram uma inibição de 65-75% na interiorização do *T. cruzi*. Testes com fixadores celulares mostraram que o parasita não é capaz de invadir células fixadas e que parasitos fixados não são interiorizados

em células cardíacas tratadas ou não com citocalasinas. Em condições normais de interação e em intervalos curtos de contato parasita-célula (5, 10, 15 e 30 minutos), o mecanismo de invasão é precedido por projeções da membrana da célula hospedeira que envolvem o parasita e que posteriormente são degradadas dentro do vacúolo parasitóforo muito rapidamente. Estudos com microscopia de varredura revelaram um ativo envolvimento do citoesqueleto da célula cardíaca no processo de invasão do parasita (Barbosa & Meirelles, 1995).

A carga de superfície de células musculares cardíacas e do *T. cruzi* foi estudada durante sua interação por meio de metodologias que empregam técnica de eletroforese celular e um sistema de laser dando uma medida direta do potencial Zeta (ZP), expresso em milivolts (Soeiro et al., 1994, 1995). Nossos estudos com comportamento eletroforético de CMC infectadas com formas tripomastigotas mostraram que os parasitas são capazes de reduzir a carga negativa da superfície das células hospedeiras, provavelmente através de uma atividade neuraminidase-transialidase que é catalizada pela mesma enzima. Após 20, 48 e 96 horas de interação elas expressam uma redução considerável no ZP de 41, 33, 34%, respectivamente. Estas alterações persistem durante todo o ciclo intracelular do parasita, sugerindo que em adição às alterações causadas pela presença do parasita, fatores solúveis, talvez secretados pelo parasita, podem contribuir na manutenção da alteração da carga de superfície. Tripomastigotas sanguícolas e metacíclicos reduzem a carga de superfície das CMC, assim como de outras células não fagocíticas profissionais. Formas amastigotas do parasita em contato por 20 horas com as CMC não expressam nenhuma alteração na negatividade de carga, provavelmente por não possuírem atividade da enzima sialidase-transialidase. As maiores alterações de redução da carga de superfície das células foram obtidas nas células infectadas com o clone Dm28c que apresenta altos índices de infecção no músculo. Os resultados da eletroforese celular em outros tipos celulares como hepatócitos e fibroblastos mostrou que o parasita afeta o ZP destas células, porém nenhuma alteração foi encontrada após a infecção de macrófagos J774G-8, o que sugere diferenças na composição de glicoconjugados sializados em células fagocíticas profissionais, ou que o mecanismo de penetração em macrófagos dispense a sua desialização, pela disponibilidade de outros receptores como por exemplo as lectinas para galactose, como descrito acima. Eritrócitos do sangue de animais contaminados apresentaram uma diminuição bastante significativa de seu ZP, de cerca de 58%. A sialidase que pode ser detectada no soro de camundongos e humanos com doença de Chagas é a possível responsável pelo fato de que eritrócitos de animais infectados mimetizam eritrócitos envelhecidos que são rapidamente retirados da circulação pelo fígado e baço. Provavelmente, isto pode ser uma das causas da anemia, leucopenia e trombocitopenia associada à doença de Chagas.

O ZP da superfície dos parasitas também foi analisado após o contato com as CMC e observou-se uma redução do ZP de cerca de 39%, podendo indicar que enzimas secretadas pelo parasita provavelmente podem alterar sua própria superfície, retirando moléculas ou expondo importantes aceptores para esta interação (Soeiro et al., 1995).

O ácido siálico tem sido implicado na adesão e interiorização do parasita em macrófagos e em vários tipos celulares (Colli, 1993). Experimentos usando trans-sialidase solúvel durante a interação de células hospedeiras sializadas impedem a interiorização do parasita (Ming et al., 1993). A modulação da atividade de sialidase-trans-sialidase e o ácido siálico presente nas células pode torná-las mais susceptíveis à invasão do parasita e causar modificações na superfície da célula hospedeira, entre elas a perda de anionogenicidade. Em células musculares esta alteração pode causar interferência no fluxo de íons da membrana plasmática, pois sabe-se que resíduos de ácido siálico estão implicados no transporte de íons no sarcolema. Alterações no níveis de cálcio intracelular foram descritos durante a interação *T. cruzi*-célula hospedeira, incluindo células musculares (Morris et al., 1988; Low et al., 1992; Dorta et al., 1996; Caler et al., 1998; Garzoni et al., 1998). Recentemente foi mostrado que ocorre uma rápida e repetitiva elevação de cálcio citosólico na célula hospedeira logo que elas são expostas a formas tripomastigotas de cultura de tecidos e sanguícolas no momento da invasão celular. Paralelamente, há também um aumento de cálcio nas formas do parasita após sua associação com a célula, sugerindo que estas mudanças são um importante mecanismo de sinalização para a penetração do parasita na célula hospedeira (Tardieux et al., 1994; Do Campo & Moreno, 1996). Para estudar o papel de íons cálcio em miócitos de cultura, usamos o corante indicador fura-2. Nossos resultados mostraram um aumento significativo nos níveis de cálcio intracelular

durante o processo de invasão e que um aumento constante no cálcio foi observado quando o parasita foi encontrado aderido ao cardiomiócito (Garzoni et al., 1998; Meirelles et al., 1999).

O *T. cruzi* adere e invade vários tipos de células de mamíferos, porém existe bastante controvérsia sobre a natureza dos receptores e seu correspondentes ligantes que mediam esta interface parasita-célula. Dorta et al., (1995) identificaram duas glicoproteínas de tripomastigotas metacíclicos que se ligam à superfície de células não fagocíticas de mamíferos e mediam a invasão do parasita: a gp82 e a gp 35/40. Mucinas são proteínas expressas em estágios do desenvolvimento encontrados no inseto vetor. O mecanismo que dispara a interiorização do parasita metacíclico é desconhecido.

Analizamos o papel do receptor de manose em culturas primárias de cardiomiócitos usando a peroxidase (HRP) como ligante para localizar este receptor. Os níveis de infecção foram analisados pela adição de 10 ou 50 mM de D-manose durante a infecção por 24 horas a 37°C e estudos ultra-estruturais para detecção do receptor foram realizados usando peroxidase acoplada a ouro coloidal. A adição de manose impediu a entrada do parasita, sendo a dose de 10 mM a mais efetiva; os estudos ultra-estruturais mostraram o traçador sobre o sarcolema, próximo ou dentro de vesículas sem revestimento, em cavéolas e em endosomas. Células infectadas mostraram as partículas de ouro no sítio de associação parasita-célula e também dentro do vacúolo parasitóforo contendo o parasita. O receptor de manose localizado na superfície dos cardiomiócitos está envolvido na ligação e interiorização do *T. cruzi* (Soeiro et al., 1999).

O tratamento das formas tripomastigotas de sangue do *T. cruzi* com diferentes componentes de superfície tais como proteínas e enzimas tem mostrado a participação destas moléculas na adesão e interiorização do parasita nas CMC (Soeiro et al., 1995). O tratamento destas formas com tripsina impede, e com fosfolipase C ou neuraminidase aumenta a sua interiorização em células musculares. CMC pré-tratadas com tripsina tem aumentada, e com fosfolipase C diminuída a invasão do parasita, indicando que estes componentes localizados na superfície das CMC são importantes para sua infecção pelo parasita. A remoção do ácido siálico da superfície do parasita por uma neuraminidase exógena aumentou os níveis de sua invasão em CMC de modo semelhante ao que foi descrito para macrófagos, provavelmente promovendo esta invasão pela exposição de resíduos de galactose e N-acetil galactosamina além da provável ação de outras enzimas secretadas pelo parasita no processo. A ação de fosfolipases exógenas removendo componentes como a enzima sialidase-trans-sialidase, talvez pela clivagem da âncora de glicosil fosfatidilinositol, poderia estar influenciando a alta infectividade do parasita. Resultados semelhantes foram encontrados com tratamentos de fosfolipases A2 e D em células fagocíticas (Connelly & Kierszenbaum, 1984). Os tratamentos com tripsina confirmam dados da literatura sobre a relação de infectividade do parasita e as glicoproteínas de superfície como a Ssp-3 e a Tc-85. Tratamentos das CMC com ferritina cationizada (FC) que se liga a sítios aniônicos da superfície celular aumentam a interiorização de tripomastigotas metacíclicos Dm28c, e se contrário os parasitas são tratados, há um aumento da ligação do parasita à superfície, mas não ocorre a sua interiorização. As análises estatísticas destas cinéticas de interação mostraram significância quando é feito o bloqueio dos sítios aniônicos pela FC, que foi capaz de neutralizar a alta carga de superfície destas formas do parasita e de aumentar sua adesão mas não sua invasão. Nossos estudos indicam que as formas tripomastigotas do *T. cruzi* são capazes de processar a superfície das CMC modulando a exposição dos ligantes necessários à invasão ou removendo moléculas que impedem o seu acesso às CMC (Soeiro et al., 1995).

A perda de anionogenicidade pode ser também associada à atividade proteolítica do parasita. O *T. cruzi* possui uma cisteína proteinase que é expressa em todos os seus estágios evolutivos e é compartimentalizada em vesículas. Esta enzima foi descrita como estruturalmente relacionada com as catepsinas L e B e pode desempenhar um papel no catabolismo das proteínas, ou promover o processamento de precursores de peptídeos (Murta et al., 1993). Tratamentos com inibidores da cisteína proteinase do tipo peptidil diazometano (PDAM), tanto no parasita antes da interação com a célula hospedeira como nas CMC após a infecção do parasita mostraram que a habilidade de invadir as células, bem como de se multiplicar e diferenciar dentro das células musculares cardíacas depende de modo crítico da atividade da cisteína proteinase (Meirelles et al., 1992).

A hipótese de que a auto-imunidade pode contribuir na cardiopatologia da doença de Chagas teve apoio na descoberta que anticorpos contra certos antígenos de *T. cruzi* tem reação cruzada com um número de antígenos de mamíferos. O mimetismo molecular tem sido associado ao processo do reconhecimento imunológico do *T. cruzi* (Van Voorhis & Eisen, 1989; Petry & Van Voorhis, 1991). Recentemente, Tarleton et al. (1997), trabalhando com transplantes de corações neonatais, apresentaram resultados que contestam que a indução do dano tissular na doença de Chagas apresente uma etiologia auto-imune principal, e que demonstram que o parasitismo cardíaco é necessário e suficiente para a indução do mesmo.

Isolamos glicosíngolipídios neutros (GSLs) de células musculares cardíacas de camundongo que representam moléculas comuns na superfície das CMC e do *T. cruzi*. Frações de mono-(CMH) e dihexosídeo (CDH) ceramidas têm a mesma mobilidade eletroforética da glicosil-galactosil ceramida da cepa Y do parasita (Vermelho et al., 1994). Estas moléculas têm se mostrado imunorreativas. Por meio de ensaios ELISA, verificamos que anticorpos reativos com cada um dos glicolipídios imunogênicos das CMC ou do parasita estão presentes no soro de pacientes chagásicos. É possível que sendo o miocárdio o tecido mais afetado na doença de Chagas, estes GSLs comuns ao parasita e à célula muscular cardíaca possam ter papel, com outras moléculas, nas reações de dano tissular descrita na doença de Chagas (Vermelho et al., 1997).

O *T. cruzi* necessita invadir a célula hospedeira para assegurar sua multiplicação e sobrevivência. Há uma evidência na literatura, controversa, mas não contestada experimentalmente, de que após a infecção, formas intracelulares em divisão do parasita integram minicírculos dos seus kDNA no genoma da célula hospedeira (Teixeira et al., 1994). A cariotipagem dos cromossomas metafásicos mostrou uma associação preferencial desses elementos de DNA com os cromossomas 3, 6 e 11 da célula hospedeira. Os genes que codificam a α -actina do miofibrila, a cadeia β do receptor da célula T e do gene da cadeia pesada de miosina estão também presentes respectivamente nos cromossomas 3, 6 e 11. Foi sugerido que a integração do DNA do *T. cruzi* no genoma da célula deva levar a alterações na regulação da expressão gênica da célula hospedeira.

Distúrbios de condução, aparecimento de arritmias, acompanham as manifestações da doença na fase aguda e crônica. Os miócitos cardíacos apresentam fluxo de corrente intercelular em especializadas regiões do sarcolema - junções *gap* - formado por canais de baixa resistência, coordenando o espalhamento da excitação e subsequente contração através do miocárdio. A presença do parasita é acompanhada por marcantes distúrbios na comunicação intercelular levando a alterações na distribuição das junções *gap*, desaparecimento da conexina 43 e perda da função em células infectadas (Campos de Carvalho et al., 1991). Nossos estudos sobre outras características eletrofisiológicas das CMC em cultura, como a frequência da contração espontânea, mostraram que ela é maior em células com 3 dias de cultivo e 48h de infecção do que em células normais com o mesmo período de cultivo, enquanto que a resposta à noradrenalina foi maior nas células normais do que nas infectadas (Aprigliano et al., 1993).

Juntos, estes resultados mostram que o *T. cruzi*, ao invadir o músculo cardíaco, precisa do controle absoluto sobre seu hospedeiro e, para tanto, desliga a comunicação celular, altera a frequência cardíaca e é o coordenador dos danos iniciais simultâneos que afetam a funcionalidade do coração na doença de Chagas experimental e humana.



18.2

Protocolos de Cultura Primária

Helene S. Barbosa, Mirian C. S. Pereira & Maria de Nazareth S. L. Meirelles

18.2.1. Células Musculares

Culturas primárias compreendem células derivadas diretamente de um órgão ou tecido. Basicamente, o tecido isolado é fragmentado em pequenas peças com bisturi e pinça, dissociado com enzimas proteolíticas, dando origem a células individualizadas que serão cultivadas em meio nutritivo, *in vitro*. Células musculares são dependentes de ancoragem, requerendo substrato sólido para promover a sua proliferação, metabolismo e diferenciação. O emprego de tecidos embrionários permite o acompanhamento do processo de miogênese, com a vantagem de serem estéreis desde o início do isolamento. Este tipo de tecido apresenta desagregação fácil e as células isoladas têm alta capacidade de adesão ao substrato, alta motilidade e excelente índice de multiplicação e diferenciação celular *in vitro* (Konigsberg, 1960, 1963; Harary & Farley, 1963; De Luca, 1966; Kasten, 1973; Yaffe, 1973).

18.2.1.1. Roteiro para obtenção de cultura primária de célula muscular cardíaca (Meirelles et al., 1986)

Material:

- fêmeas de camundongos suíços grávidas com 18 a 20 dias de gestação
- Ringer
- PBS
- tripsina
- collagenase
- gelatina
- L-glutamina
- cloreto de cálcio (CaCl_2)
- antibióticos: estreptomícina e penicilina
- meio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM)
- soro fetal bovino
- soro de cavalo
- extrato embrionário de pinto
- bicarbonato de sódio (NaHCO_3)

- placas de Petri de vidro (100 x 15 mm e 35 x 10mm)
 - Erlenmeyer de 50 ml contendo barra magnética (8 x 3mm)
 - pipetas Pasteur
 - pipetas sorológicas de 2 e 5 ml.
 - lamínulas redondas de vidro (15 x 0,13 mm)
 - tubos cônicos de 15 ml
- Obs: o material deve ser embalado apropriadamente e esterilizado em autoclave a 1 atm (120°C) por 20 min.
- pinças de ponta dente de rato (12 cm) e ponta curva (10 cm), tesoura cirúrgica ponta curva ou reta (12 cm) e bisturi (15 cm)
 - gaze estéril
 - placa de cortiça e alfinete
 - câmara mortuária
 - material plástico para plaqueamento (garrafas de 25 cm², placas de 24 poços, placas de 35 mm)

Procedimento:

- anestesiar as fêmeas grávidas em câmara mortuária contendo éter etílico. Levar o animal para o fluxo laminar, fixá-lo na placa de cortiça e esterilizar a área de dissecação (área abdominal) com álcool a 70%;
 - abrir o abdômen expondo a membrana peritoneal. Com material cirúrgico estéril, abrir a cavidade peritoneal e remover o útero contendo os embriões, transferindo-os para uma placa de Petri (100 x 15 mm) contendo solução de Ringer no gelo;
 - decapitar os embriões e abrir a cavidade torácica na altura do osso esterno. Remover os corações e transferi-los para com placa de Petri (35 x 10 mm) contendo solução de Ringer. Retirar os átrios e os vasos da base de cada coração e fragmentar os ventrículos sobre lâmina escavada, transferindo os fragmentos para outra placa de Petri (100 x 15 mm) com placa de Petri (35 x 10 mm) contendo solução de Ringer no gelo;
 - transferir os fragmentos para Erlenmeyer (50 ml) contendo barra magnética, lavar 2x em solução de Ringer para remoção das células sanguíneas e posteriormente lavar em PBS (sem cálcio e magnésio) sob agitação por 5 min a 37° C;
 - iniciar o procedimento de dissociação enzimática:
 - *Solução de dissociação:* 0,025% tripsina + 0,01% de colagenase (solução estéril e previamente aquecida em banho-Maria) a 37°C
 - expor os fragmentos do tecido à dissociação seqüencial por 5 min cada etapa a 37° C, sob agitação magnética, até completa digestão do tecido
 - recolher o líquido de dissociação contendo as células isoladas e transferi-lo para tubos de centrifuga (15 ml) contendo 2 ml de meio DMEM completo, suplementado com 0,5 ml de soro fetal bovino. Manter os tubos no gelo a fim de inativar a atividade enzimática. Marcar os tubos a cada etapa da dissociação
 - controlar ao microscópio óptico de contraste de fase: o padrão morfológico, a viabilidade celular e o número de células obtidas, após cada dissociação
 - centrifugar os tubos com células a 1800 rpm (500g) por 5 min. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em DMEM completo. Repetir este procedimento 2x, objetivando lavar as células e eliminar a presença das enzimas proteolíticas. Manter as células no gelo até o seu plaqueamento;
 - utilizar uma alíquota da suspensão celular para avaliação do número de células em câmara de Neubauer;
 - iniciar o plaqueamento seqüencial para obtenção de culturas ricas em mioblastos: plaquear as células (0,8-1x10⁶ células) em garrafas 25 cm² previamente revestidas com gelatina 0,01%;
- Obs: A gelatina é colocada nas garrafas por 15 min a 4 °C e posteriormente removida, sendo as garrafas mantidas em estufa a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ até o momento do plaqueamento. Este revestimento com gelatina propicia uma melhor adesão das células ao substrato.
- após 15 a 30 min de plaqueamento, alta proporção de fibroblastos irá aderir ao substrato, devido a sua velocidade de adesão mais rápida do que os mioblastos. Recolher o sobrenadante, rico em mioblastos, plaquear as células em recipientes previamente revestidos com gelatina, como descrito acima. A densidade celular de

plaqueamento varia de acordo com a área do substrato:

- placas de 24 poços, com diâmetro de 18 mm: 15×10^5
- garrafas de plásticos de 25 cm²: 2×10^6
- placa de Petri com diâmetro de 35 mm: $0,8-1 \times 10^6$
- trocar o meio de cultivo após 24 horas, para remoção de células mortas e “debris” celulares. Manter as células a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, sendo a troca do meio efetuada a cada 2 dias

Características da cultura (Figs.3 e 4):

A miogênese de células musculares cardíacas *in vitro* obedece etapas distintas: Nas primeiras 24 horas de plaqueamento existem 2 tipos celulares predominantes: pré-mioblastos e mioblastos que apresentam intensa multiplicação e motilidade celular. Após 24 horas, um percentual de mioblastos mantém a divisão celular e outros iniciam o processo de diferenciação celular com a organização das proteínas do citoesqueleto em miofibrilas e já se evidencia a presença de células diferenciadas, miócitos cardíacos, com contração espontânea. Após 48 horas, observa-se alto percentual de células diferenciadas. Estas células, cardiomiócitos, se caracterizam por estabelecerem contato com células vizinhas, apresentando interdigitações membranares formando o disco intercalar, além de apresentarem regiões de alta especialização de membrana com formação de *gap-junctions*, desmossomos e *fascia adherens*. Estas especializações favorecem o acoplamento celular, permitindo o sincronismo de contrações espontâneas. Ao final de 96 horas de cultivo, ocorre a formação de miofibras em virtude do alto índice de células acopladas.

Características morfológicas dos tipos celulares presentes nas culturas:

- **Fibroblastos:**
 - células bem espalhadas
 - freqüentemente na forma triangular ou estrelada
 - citoplasma transparente e pouco refratário em microscopia de contraste de fase
 - uninucleados
 - núcleo e citoplasma pouco corados pelo Giemsa
 - 2 ou mais inclusões densas intranucleares
 - arredondadas durante a divisão celular
- **Mioblastos:**
 - células bipolares
 - altamente refratária em contraste de fase
 - núcleo com tendência a forma alongada
 - uninucleados
 - núcleo bem corado pelo Giemsa
 - citoplasma granular
- **Miócitos:**
 - células volumosas
 - (CARDÍACOS) - presença de estriações (miofibrilas)

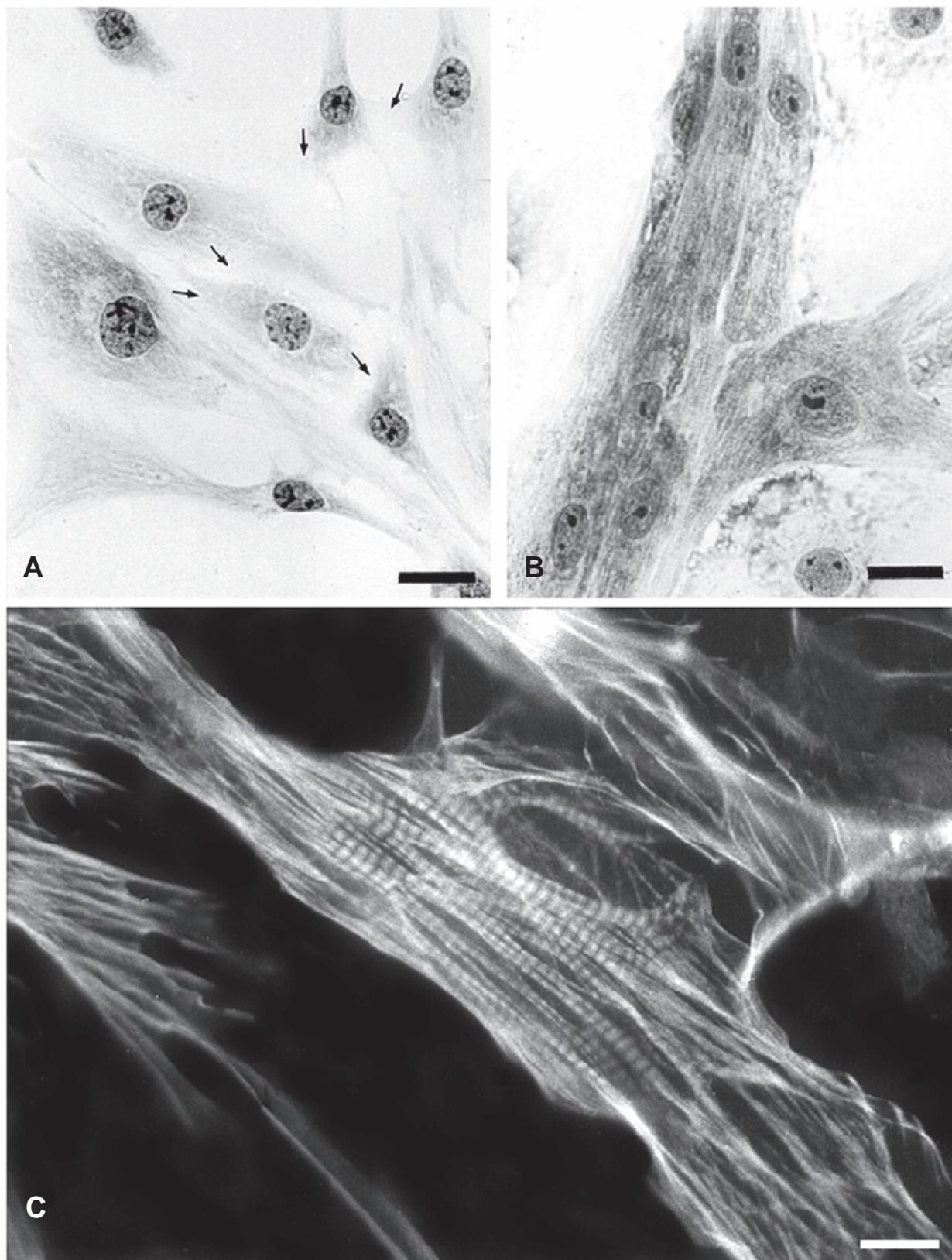


Figura 3: Aspectos morfológicos da miogênese de células cardíacas, *in vitro*. (A) Migração para alinhamento e acoplamento de células cardíacas após 48 h de plaqueamento. As setas indicam a possível direção do alinhamento, barra: 20 μm ; (B) Evolução do acoplamento celular para a formação da miofibrilha cardíaca, em culturas mantidas por 5 dias, barra: 20 μm ; (C) Células musculares cardíacas (4 dias de cultivo) coradas com faloidina-FITC para detecção de filamentos de actina. Evidenciação de cardiomiócitos apresentando uma complexa organização do citoesqueleto em miofibrilas, barra: 10 μm .

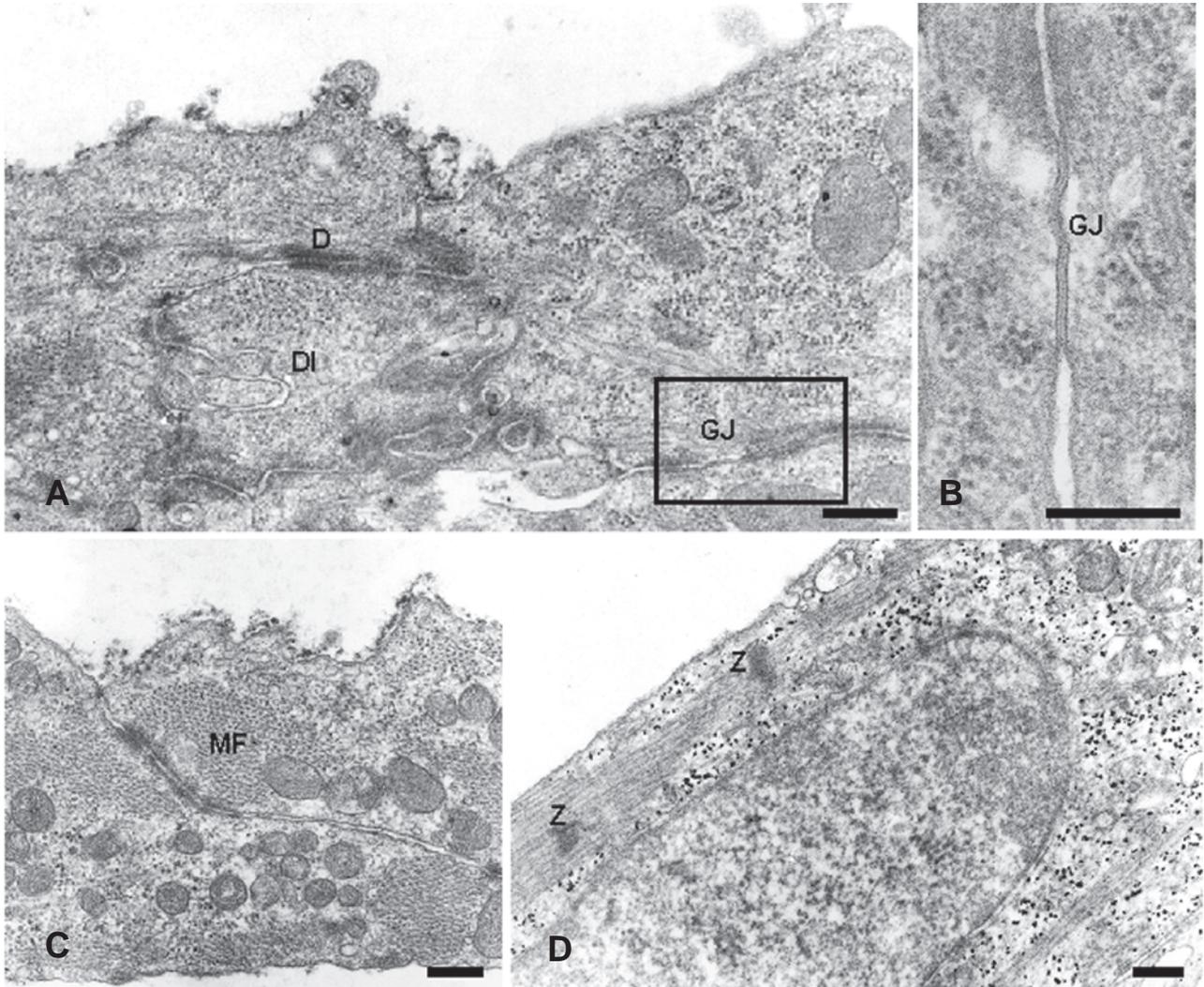


Figura 4: Aspectos ultra-estruturais de células musculares cardíacas cultivadas *in vitro*. (A e B) Uma miofibrila apresentando acoplamento e exibindo disco intercalar (DI) com presença de regiões especializadas de membrana, como desmossomas (D) e *gap junctions* (GJ) (A). Detalhe de uma *gap junction* em (B). (C) Imagem de dois miócitos acoplados, observa-se miofilamentos de actina e miosina em cortes transversais (MF). (D) Aspecto de sarcômeros organizados com evidência de linhas Z (Z) no citoplasma de um miócito após 5 dias de cultivo. Observa-se também a riqueza de grânulos de glicogênio distribuídos no citoplasma da célula, revelados pela técnica de Thiéry. Barras: 0,2 μm .

18.2.1.2. Roteiro para obtenção de cultura primária de célula muscular esquelética (Araújo-Jorge et al., 1986)

Material:

- basicamente os mesmos utilizados para a obtenção de células cardíacas
- solução de dissociação: tripsina associada à verseno

Procedimento:

- anestesiá-las fêmeas grávidas em câmara mortuária contendo éter etílico. Levar o animal para o fluxo laminar, fixá-lo na placa de cortiça e esterilizar a área de dissecação (área abdominal) com álcool a 70%;
- abrir o abdômen, expondo a membrana peritoneal. Com material cirúrgico **estéril**, abrir a cavidade peritoneal e remover o útero contendo os embriões, transferindo-os para uma placa de Petri (100 x 15 mm) contendo solução de Ringer no gelo;
- remover as coxas traseiras dos embriões e transferi-las para uma placa de Petri (100 x 15 mm) com placa de Petri (35x10 mm) contendo solução de Ringer. Dissecar o material, retirando a pele, os ossos e a cartilagem. Fragmentar o tecido muscular sobre lâmina escavada, transferindo os fragmentos para outra placa de Petri (100 x 15 mm) com uma placa de Petri (35 x 10 mm) contendo solução de Ringer no gelo;
- transferir os fragmentos para Erlenmeyer (50 ml) contendo barra magnética, lavar 2 vezes em solução de Ringer para remoção das células sanguíneas e posteriormente lavar em PBS (sem cálcio e magnésio) sob agitação por 5 min a 37° C;
- dissociação enzimática:
 - *Solução final* (v/v): 0,05% tripsina + 0,01% de verseno em PBS (solução pré-aquecida, estéril, a 37°C em banho-maria)
 - expor os fragmentos do tecido à dissociação seqüencial por 5 min cada etapa a 37° C, sob agitação magnética, até completa digestão do tecido
 - recolher o líquido de dissociação contendo as células isoladas e transferi-lo para tubos de centrífuga (15 ml) contendo 2 ml de meio DMEM completo, suplementado com 0,5 ml de soro fetal bovino. Manter os tubos no gelo a fim de inativar a atividade enzimática. Marcar os tubos a cada etapa da dissociação
 - controlar ao microscópio óptico de contraste de fase: o padrão morfológico, a viabilidade celular e o número de células obtidas, após cada dissociação
- centrifugar os tubos com células a 1800 rpm (500g) por 5 min. Descartar o sobrenadante e ressuspender as células em DMEM completo. Repetir este procedimento 2x, objetivando lavar as células e eliminar a presença das enzimas proteolíticas. Manter as células no gelo até o seu plaqueamento;
- utilizar uma alíquota da suspensão celular para avaliação do número de células em câmara de Neubauer;
- iniciar o plaqueamento seqüencial para obtenção de culturas ricas em mioblastos: plaquear as células ($0,8-1 \times 10^6$ células) em garrafas 25 cm² previamente revestidas com gelatina 0,01%;
- após 15 a 30 min de plaqueamento, alta proporção de fibroblastos irá aderir ao substrato, devido a sua velocidade de adesão mais rápida do que os mioblastos. Recolher o sobrenadante, rico em mioblastos, plaquear as células em recipientes previamente revestidos com gelatina, como descrito acima. A densidade celular de plaqueamento varia com a área do substrato:
 - placas de 24 poços, com diâmetro de 18 mm: 15×10^5
 - garrafas de plásticos de 25 cm²: 2×10^6
 - placa de Petri com diâmetro de 35 mm: $0,8-1 \times 10^6$
- trocar o meio de cultivo após 24 h, para remoção de células mortas e “debris” celulares. Manter as células a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂, sendo a troca do meio efetuada a cada 2 dias.

Características da cultura (Figs. 3-7):

A miogênese de células musculares esqueléticas *in vitro* obedece a uma seqüência de transformações morfo-fisiológicas nas primeiras 24 horas de cultivo. Mioblastos dividem-se e migram na cultura, se alinhando a outros mioblastos. Após 24 horas, estes mioblastos são competentes para fusão e se transformam em miotubos jovens pela fusão de mioblastos, que não mais se dividem e são predominantemente binucleados. A partir de 48 horas formam-se os miotubos maduros que se originam da fusão de vários miotubos jovens e ainda de mioblastos, sendo então multinucleados. Da fusão de miotubos maduros formam-se as miofibras em torno do quinto ou sexto dia de cultivo. A contração espontânea ocorre após 10 dias de cultivo.

18.2.2. Procedimento para Cultivo de Macrófagos Peritoneais de Camundongos (Araújo-Jorge & De Souza, 1986)

Este tipo de cultura primária dispensa o uso de enzimas para dissociação. São células obtidas da parede do peritônio, que se soltam facilmente, após massagem do abdômen do animal.

Procedimento:

- anestesiar o camundongo (25 a 30g);
- ao fluxo laminar, prendê-lo sobre placa de cortiça;
- injetar, no peritônio, 5-10 ml de solução salina (Hanks) ou meio de cultivo (DMEM) com seringa estéril;
- massagear o abdômen;
- recolher o líquido do exudato peritoneal e controlar ao microscópio a presença de bactérias e/ou protozoários, que se presentes indicam perfuração do intestino, devendo ser desprezado;
- manter o líquido em banho de gelo para evitar adesão das células, principalmente macrófagos, à superfície do tubo de vidro ou do plástico;
- centrifugar a 4°C (500g por 10 min) e ressuspender as células em DMEM contendo 5-10% de soro fetal bovino. Avaliar o número de células obtidas em câmara de Neubauer;
- plaquear as células a uma densidade $1-2 \times 10^4$ células/mm², por 20 min a 37°C. Trocar o meio após esse período.

Características da cultura:

Os macrófagos se apresentam como células arredondadas, sendo dependentes de ancoragem ao substrato para o seu metabolismo. Aderidas ao substrato se apresentam em formato de estrela. São células já diferenciadas e portanto, não se multiplicam, e têm tempo limitado de manutenção *in vitro* (em torno de 3-4 dias), sob ótimas condições de pH, temperatura e nutrientes.

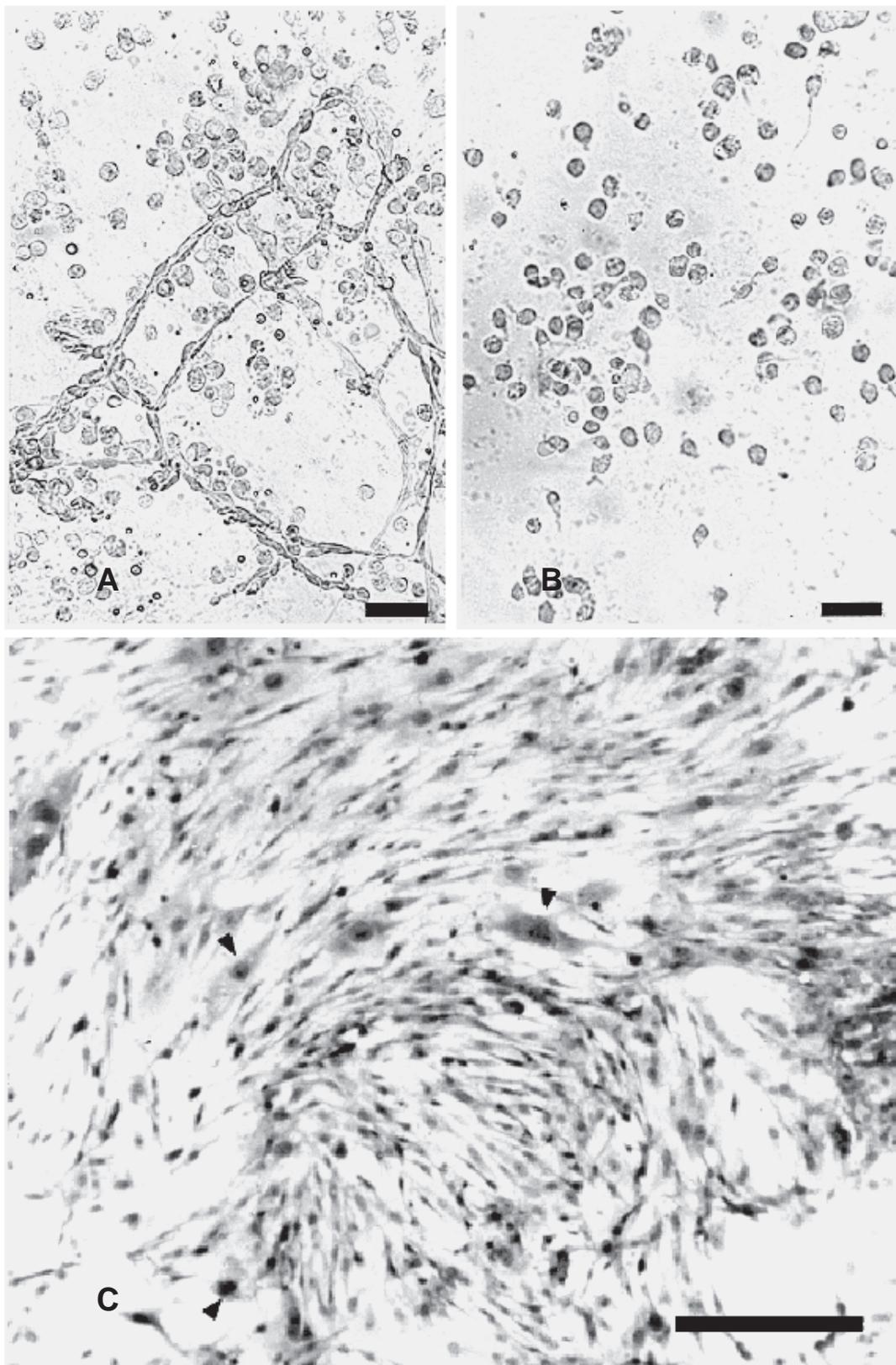


Figura 5: Aspectos das etapas da dissociação e cultivo de células musculares esqueléticas, *in vitro*. (A e B) Micrografias de mioblastos durante sua dissociação parcial (A) e total (B), barras: 0,1 mm; (C) Aspecto geral da cultura após 24 horas de plaqueamento. As células são observadas em processo de alinhamento e alguns fibroblastos destacam-se com núcleos volumosos (cabeças de seta), barra: 1 mm.

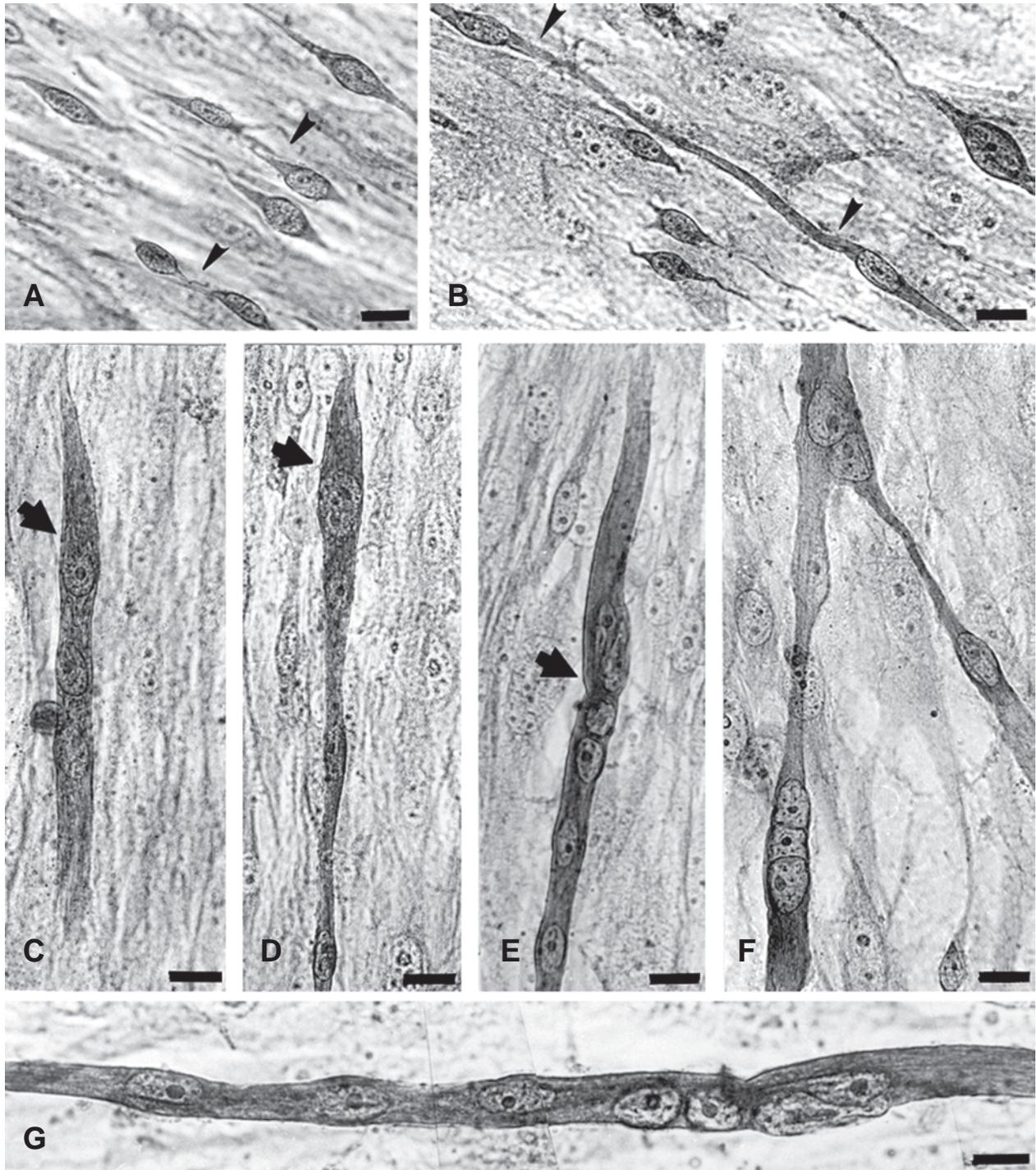


Figura 6: Aspectos morfológicos da miogênese de células musculares esqueléticas. (A e B) Migração e alinhamento de mioblastos após 48 horas de plaqueamento, para a posterior fusão (A; cabeça de seta) e a formação de miotubo jovem binucleado (B); (C-F) Crescimento do miotubo com multinucleação (3, 4 ou 7 núcleos) após 72 horas (C e D) e 96 horas de cultivo (E e F). Nota-se que durante o processo de fusão, miotubos já multinucleados podem fundir-se, apresentando imagens de ramificação angular, (E); (G) Miotubo maduro no 5º dia de cultivo *in vitro*, apresentando multinucleação com disposição central e linear dos núcleos, barras: 20 μm .

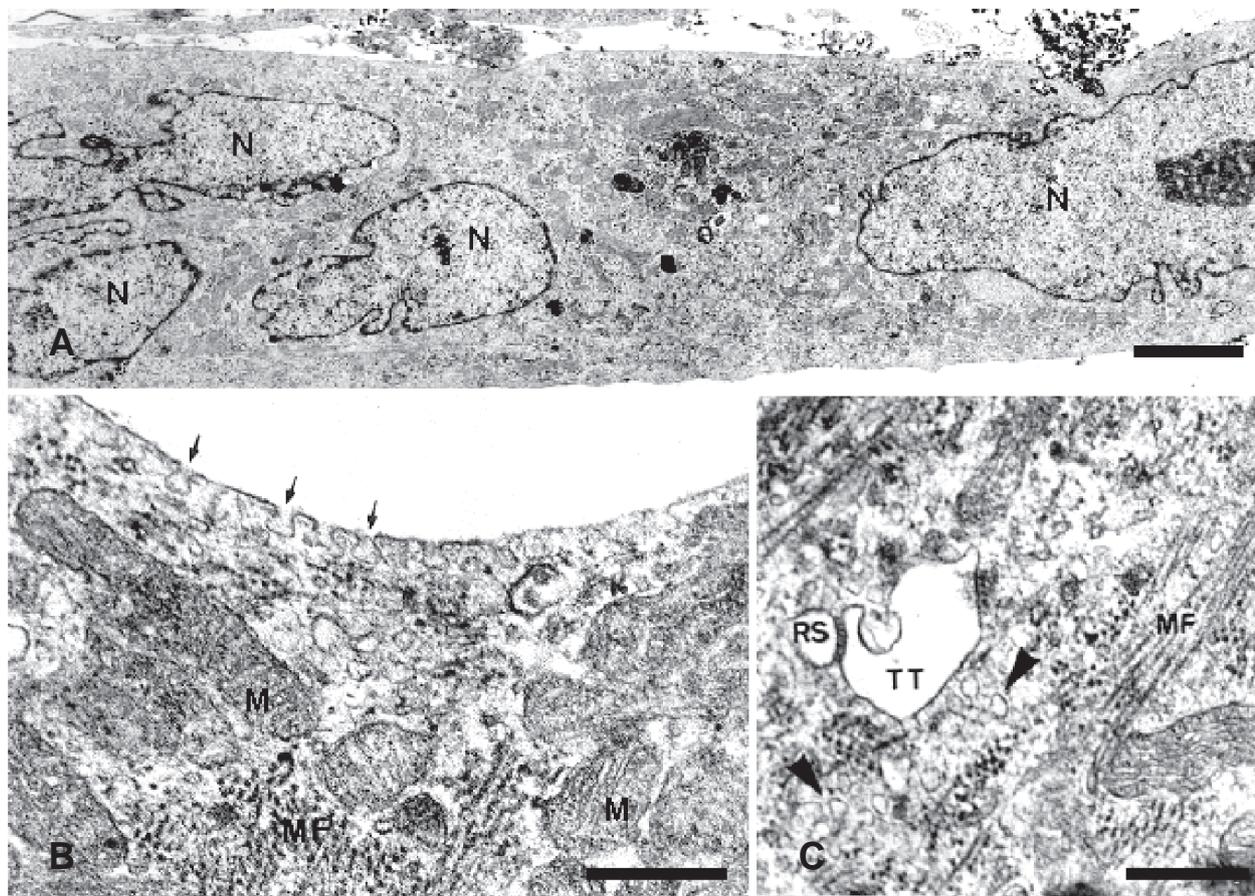


Figura 7: Aspectos ultra-estruturais das células musculares esqueléticas, *in vitro*. (A) Miotubo maduro com 4 núcleos; (B e C) Aspectos do citoplasma de um miotubo no qual pode se observar filamentos de actina e miosina em arranjos longitudinais ou transversais (MF), invaginações da membrana plasmática para a formação de túbulos T (setas), mitocôndrias com cristas longitudinais paralelas (M), barras: 0,2 μm .

ANEXO 18.1

Soluções e Meios de Cultura

Todas as soluções e meios devem ter seu pH aferido antes de se iniciar a cultura.

Solução de Ringer pH 7,0

NaCl	154 mM	9,0 g
KCl	56,28 mM	tomar 8,4 ml de solução 5%
CaCl ₂	17 mM	tomar 5,0 ml de solução 5%
Água tridestilada qsp	1000 ml	

- esterilizar em autoclave (20 min/1 atm)

Solução de PBS pH 7,0

NaCl	137,0 mM	8,0 g
KCl	2,7 mM	0,20 g
KH ₂ PO ₄	0,88 mM	0,12 g
Na ₂ HPO ₄	6,4 mM	0,91 g
Água tridestilada qsp	1000 ml	

- esterilizar em autoclave (20 min/1atm)

Solução de gelatina 0,01%

- dissolver 0,01 g em solução de Ringer pH 7,0, sob aquecimento
- esterilizar em autoclave (20 min/1 atm)

Solução de L-glutamina 200 mM

- dissolver 2,9263 g em 100 ml de água tridestilada
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Solução de bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 333 mM

- dissolver 2,8 g em 100 ml de água tridestilada
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Solução de cloreto de cálcio (CaCl₂ · 2 H₂O) 25 mM

- dissolver 0,3675 g em 100 ml de água tridestilada
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Solução de tripsina 0,1%

- solução estoque: dissolver 0,1 g em 100 ml de PBS pH 7,0
- deixar sob agitação por cerca de 7 h a 4°C
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Solução de colagenase 0,8%

- preparar solução estoque dissolvendo 0,5 g em 60 ml de PBS
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Solução de EDTA ou Verseno 0.02%

- preparar solução estoque dissolvendo 0,02 g em 100 ml de PBS
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Solução estoque de penicilina - estreptomicina

- 1 frasco de estreptomicina (1 g)
- 1 ml de penicilina (1000000 U/ml)
- 100 ml de água tridestilada estéril
- concentração final: 10 mg/ml de estreptomicina e 10000 U/ml de penicilina
- concentração de trabalho: 0,1 mg/ml de estreptomicina e 1000 U/ml de penicilina

Meio Eagle (pH 6,8)

- meio Eagle MEM 13,4 g
- nitrato férrico ($\text{Fe}(\text{NO}_3)_2 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$) 0,001 g/l diluir em 10 ml
- acrescentar 10 ml da sol. estoque de penicilina – estreptomicina
- água tridestilada qsp 1000ml
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Meio Eagle Completo (pH 6,8)

- 73 ml de meio Eagle
- 10 ml de soro de cavalo (inativado por 30 min a 56°C)
- 5 ml de soro fetal bovino (inativado por 30 min a 56°C)
- 10 ml de CaCl_2 a 25mM
- 1 ml de *L*-glutamina a 200 mM
- 1 ml de extrato embrionário
- ajustar o pH com bicarbonato de sódio (pH ácido) ou gás carbônico (pH básico)
- filtrar estéril em membrana com poro 0,2 µm

Preparo de extrato embrionário a partir de embrião de pinto (10 dias) (Paul, 1975)

- limpar a casca do ovo com álcool
- quebrar a base da casca do ovo batendo levemente com auxílio de uma pinça
- remover a casca sobre a câmara de ar para expor a membrana
- soltar e remover a membrana com um outro par de pinças estéreis
- introduzir uma terceira pinça estéril (ponta curva) abaixo do pescoço do embrião, tomando cuidado para não exercer nenhuma pressão. Extrair o embrião lentamente do ovo e depositá-lo em uma placa de Petri
- após a remoção de todos os embriões, lave-os 3x em solução salina balanceada (solução de Ringer) para remoção de todo sangue e a gema de ovo
- colocar os embriões dentro de uma seringa e introduzir lentamente o êmbolo
- inserir a extremidade da seringa em um tubo de centrifuga e pressionar os embriões
- adicionar igual volume de solução de Ringer à massa embrionária e homogeneizar sucessivamente o material com auxílio de uma pipeta Pasteur
- centrifugar por 20 min a 2.000g, remover o sobrenadante e distribuir em tubos. Fazer um teste de esterilidade pela adição das 10 últimas gotas em um tubo contendo meio de cultura e incubar este tubo em estufa a 37° C
- estocar no refrigerador caso o extrato seja utilizado no mesmo dia. Para tempos longos de estocagem (6 meses), o extrato embrionário deve ser mantido no freezer. Antes de usar, descongelar lentamente e centrifugar por 10 min a 2.000g. Recolher o sobrenadante e diluir em solução de Ringer na proporção de 1:2 antes de adicionar ao meio de cultura DMES

Solução fixadora de Bouin

- *solução estoque*: solução saturada de ácido pícrico (filtrada) diluída em formaldeído na proporção de 3:1 (300 ml ácido pícrico + 100 ml de formol).
- *solução de uso* (1/20): solução estoque (19 ml) + ácido acético (1 ml)

Coloração por Giemsa

- lavar as culturas 2x em PBS ou Ringer
- fixar em solução de Bouin por 5 min
- lavar 2x com álcool 70% (PA) por 30 min, para remoção do excesso de fixador
- lavar com água destilada
- corar com Giemsa diluído de 1/10 por 60 min (1 ml de Giemsa + 9 ml H₂O destilada)
- lavar em água destilada
- desidratação:
 - acetona 100% (2x)
 - acetona 70% + xilol 30%
 - acetona 50% + xilol 50%
 - acetona 30% + xilol 70%
 - xilol 100% (2x)

- montar em Permount

Obs: Este procedimento pode ser interrompido na etapa do álcool 70% e mantido overnight a 4°C.

Processamento de lâminulas redondas para cultura de células

- cortar lâminulas de vidro em moldes circulares de 15mm
- ferver em banho de Extran ou sabão de coco
- lavar exaustivamente com água corrente para retirar todo o resíduo de sabão
- ferver 3 vezes em banhos consecutivos de água destilada
- deixar pelo menos uma hora em álcool a 70% para remover a gordura
- lavar exaustivamente em água destilada, para retirar todo o resíduo de álcool
- ferver novamente em banho de água destilada
- secar cada lâminula em lenço de algodão limpo e com o auxílio de uma pinça
- distribuir em placas de Petri (100 x 15 mm) revestidas com papel de filtro
- embrulhar cada placa com papel pardo, identificar e esterilizar em autoclave a 1 atm por 20min) ou em forno microondas por 15 min em potência máxima

Lavagem de vidraria para cultura de células

- ferver a vidraria usada em Extran ou sabão de coco
- ainda morna, lavar individualmente cada vidro utilizando escovas apropriadas
- enxaguar bem cada vidro individualmente com água corrente e colocar de molho em água por pelo menos 2 h
- enxaguar o material 3x em água destilada
- secar em estufa
- embalar e esterilizar em autoclave a 1atm por 20 min

Referências Bibliográficas

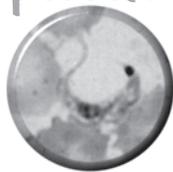
- ANDRADE, S.G. Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* isoladas do Recôncavo Bahiano. *Revista de Patologia Tropical*, 3: 65-121, 1974.
- ANDREWS, N. W. & COLLI, W. Adhesion and interiorization of *Trypanosoma cruzi* in mammalian cells. *Journal of Protozoology*, 29: 264-269, 1982.
- APRIGLIANO, O; MASUDA, MO; MEIRELLES, M.N.L.; PEREIRA, M.C.S.; BARBOSA, H.S. & BARBOSA, J.C.N. Heart muscle cells acutely infected with *Trypanosoma cruzi*: Characterization of electrophysiology and neurotransmitter responses. *Journal of Molecular Cell Cardiology*, 25: 1265-1274, 1993.
- ARAÚJO-JORGE, T.C. The biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 84: 441-462, 1989.
- ARAÚJO-JORGE, T.C. & DE SOUZA, W. Effect of carbohydrates, periodate and enzymes in the process of endocytosis of *Trypanosoma cruzi* by macrophages. *Acta tropica*, 41: 17-28, 1984.
- ARAÚJO-JORGE, T.C. & DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages: Effect of previous incubation of the parasites or the host cells with lectins. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72: 153-171, 1986.
- ARAÚJO-JORGE, T. C. & DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages: Further studies on the involvement of surface galactose and N-acetyl-D-galctosamine residues on the recognition process. *Acta tropica*, 45: 127-136, 1988.
- ARAÚJO-JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S.; MOREIRA, A.L.; DE SOUZA, W. & MEIRELLES, M.N.L. The interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with myoblasts and fibers of skeletal muscle. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72: 577-584, 1986.
- ARAÚJO-JORGE, T.C.; BARBOSA, H.S.; MOREIRA, A.L.; DE SOUZA, W & MEIRELLES, M.N.L. The interaction of myotropic and macrophagotropic strains of *Trypanosoma cruzi* with myoblasts and fibers of skeletal muscle. *Zeitschrift für Parasitenkunde*, 72: 577-584, 1987.
- ARAÚJO-JORGE, T.C.; SAMPAIO, E.P.; DE SOUZA, W. & MEIRELLES, M.N.L. *Trypanosoma cruzi*: The effects of variations in the experimental conditions on the levels of macrophage infection *in vitro*. *Parasitology Research*, 75: 257-263, 1989.
- ARRUDA, M.V.; COLLI, W. & ZINGALES, B. Terminal D- galactofuranosyl epitopes recognized by antibodies that inhibit *Trypanosoma cruzi* internalization into mammalian cells. *European Journal of Biochemistry*, 182: 413-418, 1989.
- AVILA, J. L.; ROJAS, M. & GALILI, U. Immunogenic gal 1-3 gal carbohydrate epitopes are present on pathogenic American *Trypanosoma* and *Leishmania*. *Journal of Immunology*, 142: 2828-2834, 1989.
- BARBOSA, H.S. & MEIRELLES, M.N.L. Evidence of participation of cytoskeleton of heart muscle cells during the invasion of *Trypanosoma cruzi*. *Cell Structure and Function*, 20: 275-284, 1995.
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Annual Review Microbiology*, 27: 347-383, 1973.
- BURLEIGH, B.A. & ANDREWS, N. The mechanisms of *Trypanosoma cruzi* invasion of mammalian cells. *Annual Review of Microbiology*, 49: 174-200, 1995.
- CALER, E.V.; DE AVALOS, S.V.; HAYNES, P.A.; ANDREWS, N.W. & BURLEIGH, B.A. Oligopeptidase B-dependent signaling mediates host cell invasion by *Trypanosoma cruzi*. *EMBO Journal*, 17: 4975-4986, 1998.
- CAMPOS DE CARVALHO, A.C.; TANOWITZ, H.B.; WITTNER, M.; DERMIETZEL, R.; ROY, C.; HERTZBERG, E. L. & SPRAY, D.C. Gap junction distribution is altered between cardiac myocytes infected with *Trypanosoma cruzi*. *Circulation Research*, 74: 733-742, 1991.
- COLLI, W. Interiorization of *Trypanosoma cruzi* into mammalian host cells in the light of the parasite membrane chemical composition. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 79 suppl.: 45-50, 1994.
- CONNELY, M.C. & KIERZENBAUM, F. Modulation of macrophage interaction with *Trypanosoma cruzi* by phospholipase A2-sensitive components of the parasite membrane. *Biochemical Biophysical Research Communication*, 121: 931-939, 1984.
- DE LUCA, C. Effects of mode of culture and nutrient medium on cyclic variations in enzyme activities of mammalian cells cultured *in vitro*. *Experimental Cell Research*, 43: 39-50, 1966.
- DE SOUZA, W. Cell Biology of *Trypanosoma cruzi*. *International Review of Cytology* 86: 197-283, 1984.
- DE TITTO, E.H. & ARAUJO, F.G. Mechanism of cell invasion by *Trypanosoma cruzi*: Importance of sialidase activity. *Acta Tropica*, 44: 273-282, 1987.
- DIAS E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 27: 1-110, 1934.

- DIAS, E. Não receptividade do pombo doméstico à infecção por *Schizotrypanum*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 40: 191-193, 1944.
- DO CAMPO, R & MORENO, S.N.J. The role of Ca²⁺ in the process of cell invasion by intracellular parasites. *Parasitology Today*, 12: 61-65, 1996.
- DORTA, M.L.; FERREIRA, A.T.; OSHIRO, M.E.M.; YOSHIDA, N. Ca²⁺ signal induced by *Trypanosoma cruzi* metacyclic trypomastigote surface molecules implicated in mammalian cell invasion. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 73: 285-289, 1995.
- GARZONI, L.; MASUDA, M.O., CAPELLA, M.A.M.; LOPES, A.G. & MEIRELLES, M.N.L. *Trypanosoma cruzi* invasion increases calcium resting levels in cardiomyocytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 93 suppl: 86, 1998.
- HARARY, I. & FARLEY, B. *In vitro* studies on single isolated beating heart cells. *Science* 131: 1674-1675, 1960.
- HENRIQUEZ, D.; PIRAS, R. & PIRAS, M.M. The effect of surface membrane modifications of fibroblastic cells on the entry process of *Trypanosoma cruzi* trypomastigotes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 2: 359-366, 1981.
- HERRERA, E.M.; MING, M.; ORTEGA-BARRIA, R.; PEREIRA, M.E.A. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by heparan sulphate on host cells and penetrin counter-receptors on the trypanosomes. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 65: 73-83, 1994.
- HYDE, T.P., DVORAK, J.A. *Trypanosoma cruzi*: interaction with vertebrate cells in vitro. 2. Quantitative analysis of the penetration phase. *Experimental Parasitology* 34:284-294, 1973.
- KASTEN, F.H. Mammalian Myocardial cells. *Em*: "Tissue culture methods And application", ch. 10, Ed. By P.F. Kruse & M.K. Patterson, J, Academic Press New York, pp. 72-81, 1973.
- KIERSZENBAUM, F.; IVANYI, J. & BUDZKO, D.B. Mechanisms of natural resistance to trypanosomal infection. Role of complement in avian resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. *Immunology*, 30: 1-6, 1976.
- KOFOID, C.A, WOOD, F.D., MCNEIL, E. The cycle of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture of embryonic heart muscle cell. *Unit Californian Publications in Zoology* 41: 23-24, 1935.
- KONIGSBERG, I.R. The differentiation of cross-striated myofibrils on short term cell culture. *Experimental Cell Research*, 21: 414-420, 1960.
- KONIGSBERG, I.R. Clonal analysis of myogenesis. *Science* 140: 1273-1284, 1963.
- LEY, V.; ANDREWS, N.W.; ROBBINS, E.S.; NUSSENZWEIG, V. Amastigotes of *Trypanosoma cruzi* sustain an infective cycle in mammalian cells. *Journal of Experimental Medicine*, 168: 649-659, 1988.
- LOW, H.P.; PAULIN, J.J. & KEITH, C.H. *Trypanosoma cruzi* infection of BSC-1 fibroblasts cells causes cytoskeletal disruption and changes in intracellular calcium levels. *Journal of Protozoology*, 39: 463-470, 1992.
- MEIRELLES, M.N.L. & DE SOUZA, W. Killing of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania mexicana*, survival of *Toxoplasma gondii* in chicken macrophages *in vitro*. *Journal Submicroscopic Cytology & Pathology*, 18: 99-107, 1983.
- MEIRELLES, M.N.L.; ARAUJO-JORGE, T.C. & DE SOUZA, W. Interaction of epimastigote and trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* with chicken macrophages *in vitro*. *Parasitology*, 81: 373-381, 1980.
- MEIRELLES, M.N.L.; ARAUJO-JORGE, T.C. & DE SOUZA, W. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with macrophages *in vitro*: Dissociation of the attachment and internalization phases by low temperature and cytochalasin B. *Zeitschrift Parasitenkunde*, 68: 7-14, 1982.
- MEIRELLES, M.N.L.; SOUTO-PADRON, T.C. & DE SOUZA, W. Participation of the cell surface anionic sites in the interaction between *Trypanosoma cruzi* and macrophages. *Journal Submicroscopic Cytology & Pathology*, 16: 533-545, 1984.
- MEIRELLES, M.N.L.; ARAUJO-JORGE, T.C.; MIRANDA, C.F.; DE SOUZA, W. & BARBOSA, H.S. Interaction of *Trypanosoma cruzi* with heart muscle cells: Ultrastructural and cytochemical analysis of endocytic vacuole formation and effect upon myogenesis *in vitro*. *European Journal of Cell Biology*, 41: 198-206, 1986.
- MEIRELES, M.N.L.; JULIANO, L.; CARMONA, E.; SILVA, S.G.; COSTA, E.M.; MURTA, A.C.M. & SCHARFSTEIN, J. Inhibitors of the major cysteinyl proteinase (GP57/1) impair host cell invasion and arrest the intracellular development of *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. *Molecular and Biochemical Parasitology*, 52: 175-184, 1992.
- MEIRELLES, M.N.L.; PEREIRA, M.C.S.; SINGER, R.H.; SOEIRO, M.N.C.; GARZONI, L.R.; SILVA, D.T.; BARBOSA, H.S.; ARAUJO-JORGE, T.C.; MASUDA, O.M.; CAPELLA, M.A.M.; LOPES, A.G. & VERMELHO, A.B. *Trypanosoma cruzi*-cardiomyocytes: New contributions regarding a better understanding of this interaction. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 94(suppl I):149-152, 1999 in press, 1999.
- MELO, R.C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different *Trypanosoma cruzi* strains. *Journal of Parasitology*, 64: 475-482, 1978.
- MEYER, H., XAVIER DE OLIVEIRA, M. Cultivation of *Trypanosoma cruzi* in tissue culture: A four year study. *Parasitology* 39: 91-94, 1948.
- MEYER, H., PORTER, K.R. A study of *Trypanosoma cruzi* with the electron microscope. *Parasitology* 44: 16-23, 1954.

- MILANI, S.R. & TRAVASSOS, L.R. Anti- α -galactosyl antibodies in chagasic patients; possible biological significance. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 21: 1275-1286, 1988.
- MILDER, R. & KLOETZEL, J. The development of *Trypanosoma cruzi* in macrophages *in vitro*. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitology*, 80: 139-147, 1979.
- MING, M.; CHUENKOVA, M.; OTEGA-BARRIA, E. & PEREIRA, M.E.A. Mediation of *Trypanosoma cruzi* invasion by sialic acid on the host cell and trans-sialidase on the trypanosome. *Molecular Biochemical Parasitology*, 59: 243-252, 1993.
- MORRIS, S.A.; TANOWITZ, H.B.; HATCHER, V.; BILEZIKIAN, J.P. & WITTNER, M. Alterations in the intracellular calcium following infection of human endothelial cells with *Trypanosoma cruzi*. *Molecular Biochemical Parasitology*, 29: 213-221, 1988.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G. Realização *in vitro* do ciclo do *Trypanosoma cruzi* no vertebrado, em meios de caldo de líquido peritoneal. *Revista Brasileira de Biologia*, 6: 467-484, 1946.
- MURTA, A.C.M.; PERSECHINI, P.M.; SOUTO-PADRON, T.; DE SOUZA, W.; GUIMARÃES, J.A. & SHARFSTEIN, J. Structural and functional identification of Gp57/51 antigen of *Trypanosoma cruzi* as a cysteine proteinase. *Molecular Biochemical Parasitology*, 43: 27-38, 1990.
- NAGAMURA, Y. & KOLB, M. Presence of a lectin-like receptor for D-galactose on rat peritoneal macrophages. *FEBS Letters*, 115: 59-61, 1980.
- NERY-GUIMARÃES F.N. & MEYER, H. Cultivo de *Toxoplasma* (Nicolle and Manceaux, 1909) em cultura de tecido. *Revista Brasileira de Biologia*, 2: 123-129, 1942.
- NERY-GUIMARÃES, F.N.; VENANCIO I. & GRYNBERG, N. Refratividade das galinhas ao *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *cruzi*. III Dissociação dos fenômenos da refratividade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 72: 131-136, 1974.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: Mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cell. *Journal of Experimental Medicine*, 143: 1402-1420, 1976.
- OSUNA, A.; JIMENEZ-ORTIZ, A.; MASCARO, C & ALONSO C. *Trypanosoma cruzi*: Arrested division of amastigote forms in enucleated HeLa cells. *Journal of Parasitology* 69:629-631, 1983.
- PAUL, J. Media for culturing cells and tissues. In: *Cell & Tissue Culture*, ch. V, Ed. by J. Paul, Churchill Livingstone, New York, pp 71-89, 1975.
- PECORA, I.L.; DOS REIS, G.A.; BARCINSKI, M.A. & DORIGO, D.D. Frequency distribution of *Trypanosoma cruzi* in macrophages from resistant and susceptible strains of mice. *Experientia* 36: 942-944, 1980.
- PEREIRA, M.C.S.; COSTA, M.; CHAGAS FILHO, C. & MEIRELLES, M.N.L. Myofibrillar breakdown and cytoskeletal alterations in heart muscle cells during invasion by *Trypanosoma cruzi*: Immunological and ultrastructural study. *Journal Submicroscopic Cytology & Pathology*, 25: 559-569, 1993.
- PETRY, K. & VAN VOORHIS, W.C. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that mimic mammalian nervous tissues: investigations of their role in the autoimmune pathophysiology of chronic Chagas' disease. *Research Immunology*, 142: 151-156, 1991.
- SOEIRO, M.N.C.; SILVA-FILHO, F.C. & MEIRELLES, M.N.L. The nature of anionic sites and the endocytic pathway in heart muscle cells. *Journal Submicroscopic Cytology & Pathology*, 26: 121-130, 1994.
- SOEIRO, M.N.C.; SILVA-FILHO, F.C. & MEIRELLES, M.N.L. Alterations in the surface charge of heart muscle cells during interaction with *Trypanosoma cruzi*. *Cell Biophysics*, 26: 21-44, 1995.
- SOEIRO, M.N.C.; PAIVA, M.M.; BARBOSA, H.S.; MEIRELLES, M.N.L. & ARAUJO-JORGE, T.C. A cardiomyocyte mannose receptor system is involved in *Trypanosoma cruzi* invasion and is down modulated after infection. *Cell Structure & Function*, 24: 139-149, 1999.
- STANLEY, P. & SIMINOVITCH, L. Complementation between mutants of CHO cells resistant to a variety of plant lectins. *Somatic Cell Genetics*, 3: 391-405, 1977.
- TARDIEUX, I.; NATHANSON, M.H. & ANDREWS, N.W. Role in host cell invasion of *Trypanosoma cruzi*- induced cytosolic-free Ca^{2+} - transients. *Journal of Experimental Medicine*, 179: 1017-1022, 1994.
- TARLETON, R.L.; ZHANG, G. & DOWNS, M.O. "Auto-immune rejection" of neonatal heart transplants in experimental Chagas disease is a parasite-specific response to infected host tissue. *Proceedings of the National Academy of Science USA*, 94: 3932-3937, 1997.
- TEIXEIRA, A.R.L.; ARGANARAZ, E.R.; FREITAS JR., L.H.; LACAVA, Z.G.M.; SANTANA, J.M. & LUNA, H. Possible integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircles into the host cell genome by infection. *Mutation Research*, 305: 197-209, 1994.
- VAN VOORHIS, W.C. & EISEN, H. Fl-160. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that mimics mammalian nervous tissue. *Journal of Experimental Medicine*, 169: 641-652, 1989.

- VERMELHO, A.B. & MEIRELLES, M.N.L. Sialoglycoconjugates in *Trypanosoma cruzi*-host cell interaction: Possible biological models - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 89: 69-79, 1994.
- VERMELHO, A.B.; MEIRELLES, M.N.L.; PEREIRA, M.C.; POHLENTZ, G. & BARRETO-BERGTER, E. Heart muscle cells share common neutral glycosphingolipids with *Trypanosoma cruzi*. *Acta Tropica*, no prelo, 1997.
- YAFFE, D. Rat skeletal muscle cells. In: *Tissue culture: methods and applications*, ch. 16, Ed. by P.F. Kruse & M.K. Patterson, J, Academic Press New York, pp.106-114, 1973.
- ZINGALES, B. & COLLI, W. *Trypanosoma cruzi*: Interaction with host cells. p. 129-152. *Currents Tropics Microbiology Immunology*, 117, Springer Verlag Berlin-Heidelberg, 1985.

Capítulo 19



Sistematização e Análise de Resultados: Confecção de Planilhas, Tabelas, Gráficos e Análises Estatísticas

Solange L. de Castro, Tania C. Araújo-Jorge & Pedro H. Cabello

Faz-se Ciência com fatos, como uma casa com pedras;
porém, uma acumulação de fatos não é Ciência, exatamente
como um montão de pedras não é uma casa.
(Henri Poincaré)

19.1 A Importância do Registro e da Análise dos Dados Experimentais

A construção de uma casa, a partir de um montão de pedras, é um processo análogo à transformação de dados em informações (cujo acúmulo constitui o conhecimento). Em outras palavras, informação é o produto/ resultado do processamento de dados.

A citação de Poincaré ilustra bem a necessidade de se organizar a coleta dos dados brutos de um experimento, registrando-os de modo a que possam ser compreensíveis e “analisáveis” a qualquer tempo. Os pontos essenciais são: (1) não perder qualquer dado relevante; (2) analisar integralmente cada experimento individual, ou seja, que resposta foi encontrada à pergunta formulada, pois é essa resposta obtida ao final de cada experimento que vai determinar a necessidade de novos experimentos (repetição para confirmação do resultado, alteração de condições experimentais, etc.); (3) jamais fazer uma série de experimentos sequenciais sem sistematização do anterior.

Durante o planejamento do experimento (ver Capítulo 10) ressaltamos a importância da clareza na definição do objetivo, da(s) pergunta(s) que o experimento visa a responder e da escolha dos parâmetros que precisam ser acompanhados para se alcançar o objetivo proposto. Um detalhe de suma importância, anterior ao levantamento dos dados, é a elaboração/formulação de fichas, cadernos, protocolos e formulários onde serão registrados os dados originalmente coletados, que poderão ser codificados, sintetizados e armazenados geralmente em forma de planilhas. Os primeiros constituirão a memória básica do trabalho, enquanto as planilhas devem se tornar a base operacional da manipulação e processamento dos dados. Por isso, a elaboração de planilhas de coleta de dados brutos é um passo fundamental do desenho experimental e qualquer tratamento posterior dos dados poderá ser alterado, mas não a obtenção dos dados originais.

Sejam as anotações do número de parasitas por área, seja o peso dos animais, ou qualquer outro parâmetro a ser avaliado, é essencial que se organize previamente o instrumento de registro desses dados e seu cronograma. No Capítulo 20 inserimos diversos exemplos de planilhas de registro de dados brutos para o estudo *in vivo* de animais infectados pelo *Trypanosoma cruzi*. Trataremos aqui de procedimentos gerais de análise desses dados: a tabulação

e a expressão gráfica dos resultados, bem como a necessidade de análise estatística – quando, como e que testes utilizar.

19.2 O Papel da Análise Estatística dos Dados Obtidos em Animais Experimentalmente Infectados

A análise estatística permite duas abordagens. A primeira refere-se à descrição dos resultados, por isso mesmo é chamada de *estatística descritiva*. Neste procedimento, que se pode fazer tanto em programas de planilhas de cálculo (tipo Lotus ou Excel) como em programas específicos para análises estatísticas, obtém-se informações sobre a tendência central dos dados (média, moda, mediana) e de sua dispersão (desvio-padrão, variância, faixa, quartis e percentis, valores mínimo e máximo, etc.). Na análise descritiva também se avalia o tipo de distribuição dos dados, ou seja, se são normais ou não. Na segunda abordagem, faz-se a *estatística inferencial* (testes de hipóteses), através de um conjunto de métodos analíticos que permitam inferir sobre a validade das proposições feitas; entre esses pode-se mencionar as análises comparativas que permitem testar as semelhanças ou diferenças entre dois ou mais grupos experimentais. Estas semelhanças ou diferenças são tratadas em termos probabilísticos (limites/níveis de significância). A análise descritiva permite determinar o tipo de distribuição dos dados, de importância maiúscula, pois definirá a escolha dos testes estatísticos a serem utilizados posteriormente. A primeira informação importante é *saber se os dados se ajustam a um padrão de distribuição normal*. Para isso eles devem ter valores de média e mediana aproximadamente iguais e de índices de Curtose/Kurtosis (que indicam a forma/altura da curva) e de Assimetria/Skewness aproximadamente iguais a 0 (entre 0 e 1), e desse modo devem acompanhar uma curva de distribuição gaussiana de frequência.

Utilizaremos exemplos de dados reais obtidos com animais infectados experimentalmente com *T. cruzi* para orientar a análise e a interpretação. Em alguns casos, apenas os cálculos de estatística descritiva, bem como os gráficos resultantes de dados individuais ou das tendências centrais da amostragem podem ser suficientes para gerar a resposta desejada. Em outros, além da visualização tabulada ou gráfica dos dados obtidos entre diferentes grupos experimentais, será necessária a análise da significância estatística dessas diferenças. Todos os parâmetros qualitativos e quantitativos que foram descritos nos vários capítulos deste manual podem inicialmente ser descritos com os indicadores da estatística descritiva e ser analisados quanto à sua significância biológica.

19.3 Análises Descritivas dos Dados

Análise do curso da infecção

Código do experimento - INF#1

Objetivo - Acompanhar o curso da infecção em animais a infecção por *T. cruzi*

Pergunta - Como se comporta a cepa X de parasita na linhagem Y de camundongo?

Justificativa - O conhecimento do curso da infecção, período pré-patente, período de aumento e diminuição de parasitemia e período de mortalidade, é essencial para todos os demais experimentos a serem feitos neste modelo de par parasita/hospedeiro.

Cronograma e protocolo (dpi = dias pós-infecção)

- -n dpi (planejamento do experimento: definição dos grupos, do par parasita-hospedeiro, dos inóculos e da via de inoculação). No caso: fêmeas de C57BL/6 + cepa Y 10⁴ par/camundongos via intraperitoneal
- -10 a -7 dpi: pedido dos animais ao biotério para aclimação

- -5 a -1 dpi: pesagem dos animais, distribuição entre os grupos, marcação, coleta de plasma
- 0 dpi: infecção dos animais
- 6-40 dpi: acompanhamento de parasitemia, mortalidade, peso, leucometria e níveis de IgG anti-*T.cruzi*

Acompanhamento da cinética de parasitemia

Planilha de análise: incorporam-se os dados brutos referentes a cada animal e a cada dpi e calcula-se o número de parasitas/ml, de acordo com o método empregado (ver Capítulo 13). Calculam-se também as medidas de tendência central e de dispersão dos dados: média e desvio padrão, mediana e percentis 25 e 75% (Figura 1, Tabela 1).

Tabela 1 – Resultados de contagens de parasitemia do experimento INF#1

	7 dpi (1:3) ¹			8 dpi (1:5)			9 dpi (1:3)		
	par em 50 campos	par/cp	10 ⁴ p/ml ²	par em 50 campos	par/cp	10 ⁴ p/ml ²	par em 50 campos	par/cp	10 ⁴ p/ml ²
cdg-1	5	0,10	9,9	68	1,36	224,4	5	0,10	9,9
cdg-2	5	0,10	9,9	71	1,42	234,3	8	0,16	15,8
cdg-3	17	0,34	33,7	174	3,48	574,2	10	0,20	19,8
cdg-4	23	0,46	45,5	83	1,66	273,9	28	0,56	55,4
cdg-5	12	0,24	23,8	100	2,00	330,0	28	0,56	55,4
cdg-6	3	0,06	5,9	39	0,78	128,7	25	0,50	49,5
cdg-7	3	0,06	5,9	30	0,60	99,0	20	0,40	39,6
cdg-8	3	0,06	5,9	30	0,60	99,0	48	0,96	95,0
cdg-9	2	0,04	4,0	30	0,60	99,0	20	0,40	39,6
cdg-10	5	0,10	9,9	40	0,80	132,0	3	0,06	5,9
média			15,4			219,5			38,6
desvio padrão			13,4			141,7			25,8
mediana			9,9			178,2			39,6
perc 25			5,9			106,4			16,8
perc 75			20,3			264,0			54,0

¹diluição do sangue

²contagem pelo método de Pizzi-Brener com microscópio Axioplan (fator=33x10⁴)

dpi = dias pós-infecção; par/cp = número de parasitas/campo microscópico; cdg = camundongo

Análise da parasitemia máxima

Planilha de análise: dados calculados em número de parasitas/ml e em seu logaritmo decimal. A transformação dos valores reais para logaritmo se deve à necessidade de diminuição da dispersão comumente observada, e conseqüente tentativa de normalização dos dados (Tabela 2). Estatística descritiva dos dados de obtidos no 8 dpi (Tabela 3).

Tabela 2 – Dados reais e em log dos valores de parasitemia máxima e valores de tempo de sobrevida

	10 ⁴ par/ml	log10	dia do pico	TS
cdg-1	224,4	6,351	8	21
cdg-2	234,3	6,370	8	23
cdg-3	574,2	6,759	8	40 ¹
cdg-4	273,9	6,438	8	40 ¹
cdg-5	330,0	6,519	8	29
cdg-6	128,7	6,110	8	40 ¹
cdg-7	99,0	5,996	8	40 ¹
cdg-8	99,0	5,996	8	23
cdg-9	99,0	5,996	8	40 ¹
cdg-10	132,0	6,121	8	40 ¹

¹sobreviventes após 40 dpi, devem ser excluídos da análise de tempo de sobrevida

Tabela 3 – Dados de estatística descritiva referentes ao pico da parasitemia

Indicador	10 ⁴ par/ml	log ₁₀	Indicador	10 ⁴ par/ml	log ₁₀
Contagem (n)	10	10	Intervalo	475,2	0,76
Média	219,5	6,27	Mínimo	99	6,00
Desvio padrão	149,3	0,26	Máximo	574,2	6,76
Mediana	178,2	6,24	Erro padrão	47,221	0,08
Percentil 25%	106,4	6,02	Modo	99	6,00
Percentil 75%	264,0	6,42	Soma	2194,5	62,65
Variância da amostra	22298	0,07	Maior (1)	574,2	6,76
Curtose	3,0146	-0,58	Menor (1)	99	6,00
Assimetria	1,6477	0,60	p Teste W (Shapiro-Wilks)	0,0181	0,217

A simples observação desta tabela já nos indica que

- existe grande dispersão nos dados obtidos. Tomando-se os valores reais de parasitas/ml, o desvio-padrão é 68% do valor da média. Já os valores transformados logaritmicamente não apresentam tamanha dispersão e o desvio encontrado correspondeu a apenas 4% do valor da média;
- a média é relativamente diferente da mediana, no caso dos dados reais, e se aproxima no caso dos valores em log;
- os índices de Curtose e Assimetria dos valores reais são bem diferentes de zero, enquanto os índices respectivos obtidos com os valores transformados são menores que 1;
- estas observações sugerem que os dados reais não possuem distribuição normal, enquanto os dados transformados possivelmente se distribuem normalmente.

Para confirmar se os dados realmente têm distribuição normal, pode-se fazer uma análise específica em programas de estatística. Mostramos abaixo um exemplo, utilizando o programa Statistics for Windows, exatamente sobre estes dados de parasitemia máxima (Fig. 2). Aqui foram obtidos os histogramas de distribuição de frequência (barras), calculada a curva normal esperada (linha) e os valores do teste W de Shapiro-Wilks. Este teste é o mais recomendado. Se seu resultado for significativo ($p < 0,05$) então é porque a distribuição não é normal (rejeita-se a hipótese de que a distribuição seja normal). Se os dados forem normais, p será maior que 0,05 no teste W. Inserimos na Tabela 3 os resultados do teste W, que confirmaram que a distribuição dos dados reais não é normal ($p < 0,05$), enquanto a dos dados transformados para log é normal ($p > 0,05$). As curvas de probabilidade normal também foram obtidas (Figs. 2 a,b) e indicam que os dados reais se correlacionam menos com o esperado, isto é, se afastam mais da linha de regressão do que os dados transformados, que praticamente se superpõem com a linha de regressão.

Acompanhamento da mortalidade e sobrevida

Com base nos dados de sobrevida é construída a planilha de mortalidade cumulativa, como mostrado na Tabela 4. O número de animais mortos a cada dia é indicado na coluna de mortalidade individual (mi) e o número acumulado de animais mortos na de mortalidade acumulada (ma). Neste experimento, como a mortalidade cumulativa foi menor que 50%, não temos o índice M_{50} , temos apenas o valor de tempo de sobrevida (TS) calculado sobre os poucos animais que morreram até o final da observação do experimento (40 dpi) (Tabela 4). A expressão gráfica desses resultados é mostrada na Figura 3. A análise de sobrevida é complementar à de mortalidade (Fig. 3).

Tabela 4 – Valores de mortalidade cumulativa e de tempo de sobrevida

INF#1: mortalidade/sobrevida cumulativa n (inicial) =10					INF#1: tempo de sobrevida (TS)	
dpi	mi	ma	%MC	%SC		Inf
0	0	0	0,0	100,0		
22	1	1	10,0	90,0	cdgo 1	21
23	0	1	10,0	90,0	cdgo 2	23
24	2	3	30,0	70,0	cdgo 3	23
25	0	3	30,0	70,0	cdgo 4	29
30	1	4	40,0	60,0	média	24,0
31	0	4	40,0	60,0	desvio-padrão	3,0
40	0	4	40,0	60,0		
			M₅₀ -			

mi= mortalidade individual; ma= mortalidade acumulada

19.4 Análises Comparativas dos Dados

Mesmo que tenhamos apenas um grupo experimental a analisar, como no caso do experimento INF#1, alguns parâmetros podem ser comparados a diferentes tempos pós-infecção. A análise comparativa pode ser feita, inicialmente, apenas de forma tabulada e gráfica, que indicarão *diferenças óbvias* entre dados quantitativos obtidos em quaisquer parâmetros parasitológicos, imunológicos ou inflamatórios. Essas diferenças podem até dispensar análise estatística detalhada e geralmente indicam processos relevantes do ponto de vista biológico. Porém, muitas vezes devido a heterogeneidades intrínsecas a populações de animais, mesmo às linhagens isogênicas, a existência ou não de diferença nos resultados obtidos precisa ser testada por meio de recursos estatísticos apropriados. A questão imediata que surge é: que teste estatístico usar?

Qualquer livro de estatística aplicada à biologia vai indicar basicamente dois caminhos a seguir: o dos testes paramétricos e o dos não paramétricos. Essa escolha é a primeira e depende essencialmente do tipo de distribuição dos dados a serem comparados, que é analisada pelos indicadores da estatística descritiva, como discutido acima, e pelos testes apropriados para se testar normalidade (por exemplo, o teste W de Shapiro-Wilks).

Se a distribuição for do tipo normal os testes paramétricos poderão ser aplicados. *Se a distribuição não for normal, os testes paramétricos não poderão ser utilizados.* Neste ponto, mais dois caminhos se apresentam: (1) utilizar diretamente testes não paramétricos ou (2) proceder à transformações matemáticas que normalizem a distribuição dos dados, como por exemplo, a transformação para logaritmos decimais, como também apontado anteriormente. Neste caso, mesmo após esta transformação, os novos dados gerados devem passar pelo teste de normalidade, como mostrado acima.

Além da definição de uso de um teste paramétrico ou não paramétrico, a segunda questão que se coloca é definir o nível de significância (p) com o qual os dados serão analisados. Assumir $p < 0,05$ significa trabalhar apenas com 5% de probabilidade de erro do tipo I (rejeitar uma hipótese, sendo ela verdadeira). Mas este limiar pode ser arbitrado em valor maior ou menor. Pode-se inclusive apenas fornecer o valor de p e deixar a interpretação da significância por conta do experimentador ou do leitor.

De qualquer modo, a regra básica aqui é de que *é melhor não fazer qualquer análise estatística sobre diferenças óbvias, do que fazer análises erradas sobre diferenças prováveis.* Ou seja, não aplicar qualquer teste, sem um conhecimento de como aplicá-lo, o que ele mede, e se os dados em questão podem ser analisados por aquele teste. Portanto, se se for trabalhar com estatística, é indispensável que se estude um pouco o assunto, mas também que se converse com quem entende, antes de se aventurar a utilizar erradamente os muitos programas estatísticos disponíveis.

O tamanho da amostragem a ser analisada também é outro indicativo do tipo de teste a ser usado. De um modo geral os estatísticos consideram uma amostragem com $n = 100$ observações, como o mínimo para análises de distribuição de frequência paramétricas. Por outro lado, quando o conjunto de dados for grande ($n > 100$) não faz muito sentido usar estatística não paramétrica, pois com amostragens grandes os dados tendem a distribuir-se normalmente, mesmo que a respectiva variável não seja normalmente distribuída na população. Na maioria destes casos os métodos não paramétricos, que são menos sensíveis (tem menor poder estatístico), podem ser apropriados.

É comum, na experimentação animal, se obter dados que os estatísticos consideram de “baixa qualidade”, ou seja, derivados de amostras pequenas ($n = 4$ a 10), ou de variáveis sobre as quais nada se sabe acerca do tipo de distribuição. Os métodos não paramétricos foram desenvolvidos para serem usados em casos nos quais o pesquisador não sabe nada a respeito dos parâmetros de uma variável de interesse numa população (por exemplo, a parasitemia máxima de um grupo de animais *knock-outs* para certo gene, infectados com uma dada cepa de *T. cruzi*). Daí o nome não paramétrico. Eles não se baseiam no conhecimento da média e do desvio-padrão e portanto dispensam seu cálculo. Os métodos não paramétricos são menos poderosos (menos sensíveis) para discriminar diferenças significativas que os paramétricos (portanto, se indicarem estas diferenças, elas também certamente seriam indicadas se testes paramétricos fossem usados). Em geral, se o resultado de um estudo tem implicações econômicas ou terapêuticas importantes (por exemplo: uma terapia cara e dolorosa pode ajudar a melhorar a qualidade de vida dos pacientes?), então é aconselhável que se aplique aos resultados diferentes testes não paramétricos e se houver discrepância entre eles, procurar entender o porquê destes diferentes resultados. Por outro lado, como são menos sensíveis, os testes não paramétricos podem deixar passar certos pequenos efeitos (por exemplo: um certo aditivo nutricional pode ser perigoso para a população?) e é necessário que se seja bastante cuidadoso na escolha do teste.

A estatística descritiva também deve ser mais cuidadosa quando se trabalha com dados de distribuição não normal. Se uma variável se comporta como uma função logarítmica e não linear, então a média geométrica é mais informativa do que a média aritmética. A estatística descritiva do fenômeno observado deve computar uma variedade mais ampla de medidas de locação (média, mediana, moda, etc.) e de dispersão (variância, desvio médio, faixa de quartis, percentis, etc.) para fornecer um quadro mais completo dos dados.

A seqüência de ações nessa análise é:

- criar uma matriz com a base de dados a analisar, organizando em linhas as informações referentes a cada animal (todos os grupos testados, experimentalmente, e todos os dias) e em colunas as variáveis que indicam seu grupamento (controle, grupo A, grupo B, grupo C; dias pós-infecção, etc.) ou os valores que serão testados tais como parasitemia (ou nível de IgG ou qualquer outro parâmetro medido ao longo do tempo); tempo de sobrevivência, parasitemia máxima, etc.);
- obter os dados de estatística descritiva de cada variável;
- testar se estas variáveis apresentam distribuição normal ou não (teste W);
- em função do resultado, escolher o teste a ser usado;
- escolher os limites de confiança (90 ou 95%);
- verificar o valor de p .

19.5 O Vasto “Menu” de Testes Paramétricos e Não Paramétricos para se Utilizar

Como apontado na Tabela 5, para cada tipo geral de teste paramétrico, existe basicamente pelo menos um teste não paramétrico equivalente numa das seguintes categorias:

- testes de diferenças entre grupos (amostras independentes)
- testes de diferenças entre variáveis (amostras dependentes)
- testes de relações entre variáveis

Observações:

- em todos os testes a hipótese testada é de que sejam iguais (hipótese nula). O valor de p obtido em um teste t representa a probabilidade do erro envolvido no aceite da hipótese sobre a existência de diferença. Em termos práticos, $p < 0,05$ significa que os grupos testados têm mais de 95% de chance de serem diferentes, ou seja, menos de 5% de chance de serem iguais;
- dados não normais indicam que seus valores se dispersam muito em torno da média ou se distribuem assimetricamente; portanto a média não é mais um bom parâmetro para comparar os grupos em questão. Os testes não paramétricos, em geral, comparam medianas, ou seja, ordenam (fazem um *rank*) os dados desde o menor até o maior valor e tomam o valor do posto médio como padrão a ser comparado;
- o teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras é sensível a diferenças entre médias e medianas, mas também é bastante afetado pelas diferenças nas formas das curvas de distribuição dos dados;
- o teste de Wilcoxon para dados pareados assume que se pode ordenar a magnitude das diferenças nas observações pareadas de algum modo com significado biológico. Se não for este o caso, então deve ser usado o teste dos sinais;
- o coeficiente de concordância de Kendall é frequentemente usado para expressar a concordância entre variáveis independentes (por exemplo, IgG total e IgG anti *T. cruzi*) que estão sendo estimuladas pelo mesmo fator (por exemplo, a infecção).

Tabela 5 – Escolha dos testes estatísticos

Para comparar	Teste paramétrico (distribuição normal dos dados ou de sua transformação matemática)	Teste não paramétrico (independentes do tipo de distribuição)
Diferenças entre dois grupos (amostras independentes)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste t para amostras independentes: compara médias de uma variável • Teste F: compara variâncias 	<ul style="list-style-type: none"> • Teste U de Mann-Whitney • Teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras • Teste de Wald-Wolfowitz
Diferenças entre dois grupos (amostras dependentes ou pareadas)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste t para amostras dependentes: compara médias entre variáveis, medidas na mesma amostra ou em amostras pareadas 	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de Wilcoxon para dados pareados • Teste dos Sinais
Diferenças entre mais de dois grupos (amostras independentes)	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de variância (ANOVA): compara médias entre mais de dois grupos, através da análise de sua dispersão indicada pela variância 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de postos de Kruskal-Wallis • Teste de mediana
Diferenças entre mais de duas variáveis entre grupos dependentes	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de variância 	<ul style="list-style-type: none"> • Análise de variância dois -fatores de Friedman
Medidas de frequência (proporções) em tempos diferentes de variáveis dicotomizadas (sim ou não, + ou -)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de Qui-quadrado de McNemar 	<ul style="list-style-type: none"> • Teste T de Cochran
Relação entre variáveis quantitativas	<ul style="list-style-type: none"> • Coeficiente de correlação • Coeficiente de regressão 	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de Kendall Tau • Teste R de Spearman • Coeficiente Gamma
Relação entre variáveis qualitativas (machos x fêmeas, + x -)	<ul style="list-style-type: none"> • Teste de Qui-quadrado 	<ul style="list-style-type: none"> • Coeficiente de concordância de Kendall • Coeficiente de Phi • Teste exato de Fisher

Seguem-se alguns exemplos:

Acompanhamento da série branca

Foi feito esfregaço sangüíneo de animais em diferentes dias pós-infecção e uma contagem do percentual relativo de leucócitos, cujos resultados são mostrados na Tabela 6, cuja expressão gráfica está na Figura 4.

Tabela 6 – Resultados da contagem leucocitária do experimento INF#1

INF#1: contagem de esfregaço sanguíneo									
	% linfócitos			% neutrófilos			% monócitos		
dpi	1	20	40	1	20	40	1	20	40
cdg-1	74		50	15		15	11		35
cdg-2	68	26	43	23	24	32	9	50	25
cdg-3	74	24		19	19		8	67	
cdg-4	76	15	45	17	18	34	7	46	21
cdg-5	80	33	51	14	21	31	6	40	18
cdg-6	80	32		14	28		6	53	
cdg-7	74	25		20	22		6	67	
cdg-8	79	18		12	25		8	58	
cdg-9	80	26	51	17	16	23	3	45	26
cdg-10	60	36	54	33	19	26	7	61	20
média	74,3	26,1	49,0	18,5	21,3	26,8	7,1	54,1	24,2
desvio padrão	6,0	6,5	3,8	5,7	3,6	6,5	2,0	9,2	5,6
W	0,0380	0,7346	0,4177	0,0481	0,9021	0,4877	0,8714	0,6247	0,3616
normal	não	sim	sim	não	sim	sim	sim	sim	sim
p K-W	0,0001	0,0419	0,0001						

Questões

- A distribuição dos dados é normal? Alguns sim, outros não.
- Quantos grupos há a comparar? Três para cada variável.
- Que teste usar? Como alguns dos dados iniciais (linfócitos e neutrófilos no dia 1) não têm distribuição normal, deve-se usar um teste não paramétrico. Como três grupos serão comparados (dias 1, 20 e 40), o teste deve ser o de Kruskal-Wallis.
- O valor de p fornecido pelo teste de Kruskal-Wallis indica variação significativa entre os três grupos? Sim, pois todos são menores que 0.05.
- Quais são os grupos diferentes entre si? Após saber que existe uma diferença significativa entre os grupos, pode-se compará-los dois a dois. Para isso usa-se então o teste U de Mann-Whitney, que, neste caso, forneceu os resultados da Tabela 7. A única comparação onde as diferenças são significativas forma as correspondentes a vinte e quarenta dias pós-infecção.

Tabela 7 – Valores de p do teste U de Mann-Whitney aplicado sobre os dados de análise leucocitária do experimento INF#1

Grupos	Linfócitos	Neutrófilos	Monócitos
1 x 20	0,0002	0,0989	0,0023
1 x 40	0,0011	0,0509	0,0113
20 x 40	0,0140	0,0014	0,0014

Acompanhamento de peso

Os animais infectados e não infectados (controle) foram pesados em diferentes dias pós-infecção e obtidos, assim, os dados da Tabela 8.

Tabela 8 – Valores de peso dos animais do experimento INF#1

dpi	Controle				Infectado			
	0	7	14	20	0	7	14	20
cdg-1	20,4	27,2	30,8	33,6	17,6	24,5	21,8	
cdg-2	17,7	28,6	32,1	32,6	21,5	29,6	27,0	
cdg-3	19,0	30,0	30,2	31,6	20,5	32,5	22,5	
cdg-4	17,0	27,5	32,3	35,6	19,0	22,5	26,5	25,6
cdg-5	20,5	31,2	36,1	38,6	20,5	26,0	30,5	
cdg-6	19,5	26,6	34,8	36,7	19,6	28,2	30,7	18,6
cdg-7	17,3	28,5	33,9	36,4	21,6	32,5	25,9	
cdg-8	17,5	28,0	32,0	32,7	19,0	24,0	24,5	
cdg-9	18,5	24,6	33,9	37,2	20,5	27,3	25,8	
cdg-10	18,5	27,5	30,9	32,6	18,3	24,4		
média	18,6	28,0	32,7	34,8	19,8	27,2	26,1	22,1
desvio padrão	1,2	1,7	1,8	2,3	1,3	3,3	2,9	3,5
W	0,4406	0,8517	0,7422	0,3193	0,6231	0,3920	0,5131	<1
normal	sim	sim	sim	sim	sim	sim	sim	?
F	0,0000001				0,000023			

Questões

- A distribuição dos dados é normal? Sim.
- Quantos grupos há a comparar? Quatro para cada variável (dias 0, 7, 14, 20).
- Que teste usar? Paramétrico. Como há quatro grupos a ser comparados, o teste deve ser ANOVA.
- O valor de p fornecido pelo teste de ANOVA indica variação significativa entre os quatro grupos? Sim, pois todos são menores que 0,05.
- Quais são os grupos diferentes entre si? Após saber que existe uma diferença entre os vários grupos, avança-se no teste ANOVA para saber quais grupos diferem entre si. Um dos testes que pode ser escolhido é o de Student-Neuman-Keuls (SNK), cujos resultados estão mostrados na Tabela 9. Eles indicam que os animais não infectados apresentam uma curva de evolução ponderal crescente, com valores diferentes significativamente a cada semana (estão “engordando” normalmente). Já os animais infectados ganham peso só até a segunda semana, quando por algum motivo param de “engordar”.
- A infecção leva à diferença no peso? Para isso compara-se a cada dia os grupos controle *versus* infectado, com os resultados ANOVA mostrados na Tabela 10. Eles demonstram claramente que os animais infectados não se diferenciam dos normais na primeira semana (7 dpi), mas que após catorze e vinte dias a sua diferença de peso é bastante significativa.

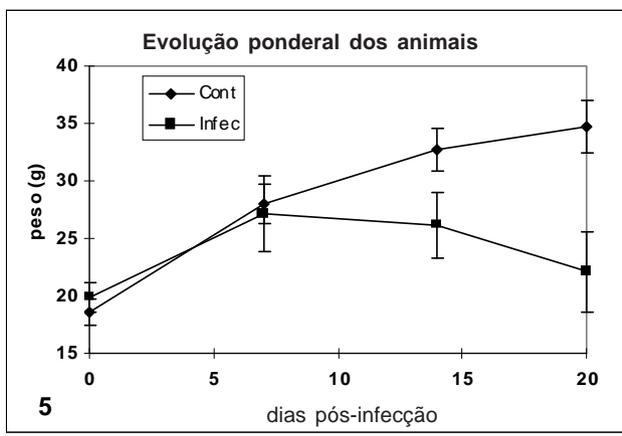
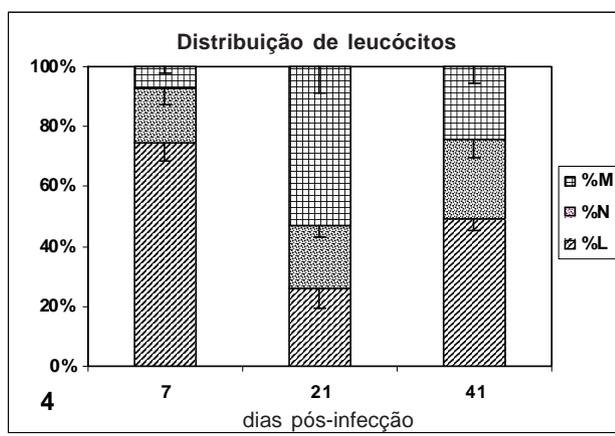
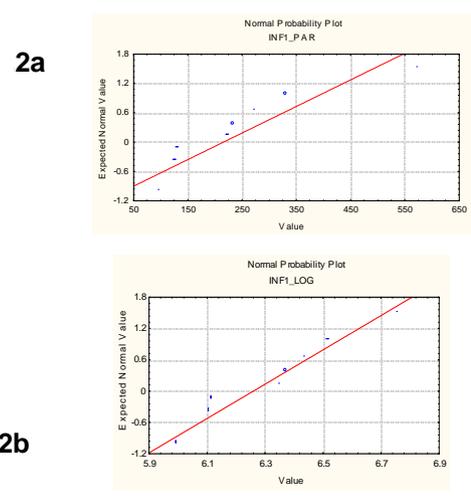
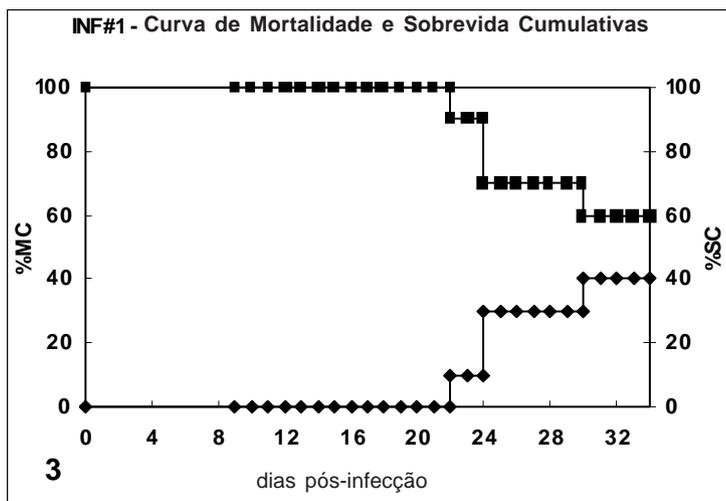
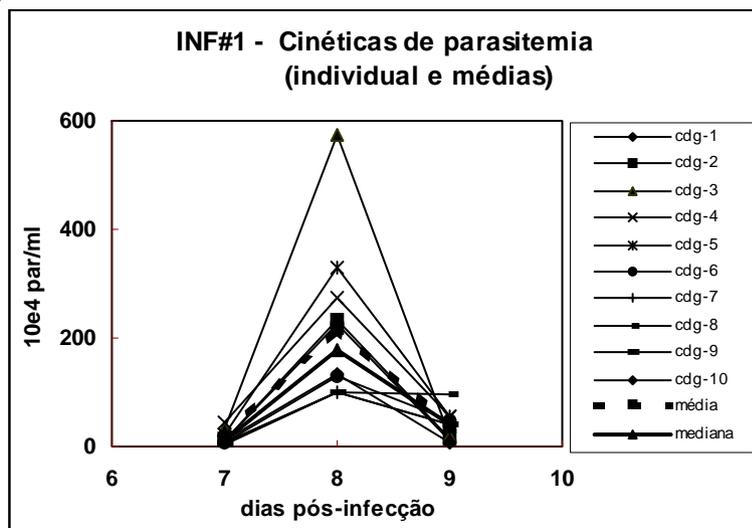
Tabela 9 – Diferenças no peso dos animais a cada dia

Grupos	Não infectado	Significância	Infectado	Significância
dpi 1 x dpi 7	0,000122	sim	0,000189	sim
dpi 1 x dpi 14	0,000127	sim	0,000293	sim
dpi 1 x dpi 20	0,000159	sim	0,318091	não
dpi 7 x dpi 14	0,000123	sim	0,453093	não
dpi 7 x dpi 20	0,000127	sim	0,081881	não
dpi 14 x dpi 20	0,021999	sim	0,087019	não

Tabela 10 – Diferenças no peso dos animais infectados em relação aos controles

Grupos	0 dpi	7 dpi	14 dpi	20 dpi
Cont x Inf	0,049218	0,521147	0,000027	0,000155

Este é o raciocínio básico a ser seguido em todos os casos: análise dos níveis de imunoglobulinas, citocinas, enzimas, ou qualquer outro parâmetro que se pretenda acompanhar.



Figuras 1 a 5 - Resultados do experimento INF#1: (1) expressão gráfica da cinética de variação da parasitemia dos animais infectados: dados individuais, de média e de mediana (programa Excel para Windows); (2) teste de probabilidade de normalidade para os dados de parasitemia máxima em número de parasitas/ml (PAR) (a) e para os dados transformados para logaritmo (LOG) (b) (programa Statistics for Windows); (3) mortalidade e sobrevida acumuladas (programa Excel para Windows); (4) percentagem de monócitos, neutrófilos e leucócitos (programa Excel para Windows); (5) evolução ponderal (programa Excel para Windows)

Teste do efeito de uma droga na evolução da infecção

Código do experimento - DX#1

Objetivo - Testar o efeito do derivado DX sobre a resistência dos animais à infecção por *T. cruzi*

Justificativa - Entre oito derivados sintetizados de uma certa droga, o derivado DX foi o mais efetivo sobre tripomastigotas *in vitro*

Pergunta - DX tem efeito sobre o curso da infecção por *T. cruzi*?

Cronograma e protocolo

- -n dpi (dias pós-infecção): planejamento do experimento: definição dos grupos, do par parasita-hospedeiro, dos inóculos, da via de inoculação e do esquema de administração do DX a ser testado
- -10 a -7 dpi: pedido dos animais ao biotério para aclimação
- -5 a -1 dpi: pesagem dos animais, distribuição entre os grupos, marcação, coleta de plasma
- 0 dpi: infecção dos animais
- 5 dpi: tratamento com o composto DX por administração via oral
- 6-30 dpi: acompanhamento de parasitemia e da mortalidade

Grupos

- Cont: 0,1 ml diluente
- DX100: 0,1 ml de solução contendo 16,8 mg DX

Cálculo da dosagem de DX

Pesagem dos animais em 5 dpi para cálculo da concentração da droga

Peso individual em gramas (n=20)										Média	des. pd.
16,9	16,5	18,0	18,2	19,4	20,8	15,3	20,0	19,5	18,3	16,8	0,4
16,3	17,5	19,6	15,8	19,2	18,2	18,6	18,0	17,3	17,2		

Preparo da suspensão de DX

- administração de dose única por via oral de 100 mg/kg peso de DX no volume de 0,1ml para dez animais (grupo DX100) pesando em média 16,8 g (os outros dez animais serão inoculados com 0,1 ml do diluente - 3% de Tween 80 em água (grupo Cont)

DX		Peso do animal	
100 mg	---	1000 mg	$x = 1,68 \text{ mg/animal}$ —> cada animal deverá receber 1,68 mg de DX
x	---	16,8	

DX		Diluente	
1,68 mg	---	0,1 ml	$y = 16,8 \text{ mg/ml de diluente}$ —> concentração da suspensão a ser preparada
y	---	1,0	

Administração de 0,1 ml (via oral) em dose única (5 dpi) em dez animais

- volume total: 0,1 ml X 10 (animais) = 1,0 ml
- considerando as perdas, preparar 2,0 ml (33,6 mg em 2 ml do diluente)

Acompanhamento da parasitemia

O método de acompanhamento de parasitemia aqui utilizado foi o de contagem em câmara de Neubauer; portanto, os resultados brutos de parasitas contados nos quatro quadrantes da câmara são lançados na planilha (Tabela 11) e calculado o número de parasitas por ml, tendo em vista a correção da diluição. Os resultados de análise descritiva são expressos na Figura 6 e na Tabela 12.

Tabela 11 – Cálculos das curvas de parasitemia do experimento DX#1

Cont	6 dpi				1:20 ¹				7 dpi				1:30 ¹				8 dpi				1:30 ¹				9 dpi				1:30 ¹																																																																																																																																																																																																																													
animal	par/quad				10 ⁴ p/ml				par/quad				10 ⁴ p/ml				par/quad				10 ⁴ p/ml				par/quad				10 ⁴ p/ml																																																																																																																																																																																																																													
cdg-1	3	0	0	1	20,0	46	36	24	45	755,0	44	40	25	31	700,0	4	3	3	3	65,0	4	3	3	3	60,0	1	0	1	0	10,0	16	10	14	14	270,0	15	12	14	18	295,0	3	2	4	3	60,0	3	4	1	4	60,0	92	110	97	1993,3	51	42	62	66	1105,0	2	4	5	1	60,0	7	9	3	10	145,0	64	37	59	1066,7	57	64	67	56	1220,0	2	2	0	3	35,0	3	4	1	3	55,0	40	42	46	57	925,0	36	14	20	28	490,0	2	4	1	2	45,0	0	2	1	0	15,0	3	7	4	10	120,0	7	13	9	12	205,0	0	0	1	2	15,0	7	6	8	13	170,0	42	42	46	43	865,0	24	33	29	40	630,0	1	2	1	3	35,0	4	3	2	3	60,0	32	32	30	626,7	76	84	82	72	1613,3	12	17	9	10	253,3	4	5	3	6	90,0	13	13	20	19	325,0	33	17	27	25	510,0	3	2	5	3	65,0	0	1	0	1	10,0	0	1	5	2	40,0	1	0	2	1	20,0	0	1	1	0	10,0	média				698,7					678,8					64,3	des.pd.				53,6					546,9					471,2					65,8													
DX100	6dpi				1:20¹				7dpi				1:30¹				8dpi				1:30¹				9dpi				1:30¹																																																																																																																																																																																																																													
animal	par/quad				10⁴p/ml				par/quad				10⁴p/ml				par/quad				10⁴p/ml				par/quad				10⁴p/ml																																																																																																																																																																																																																													
cdg-1	3	2	5	4	70,0	9	5	8	4	130,0	4	3	2	2	55,0	1	0	0	0	5,0	1	0	0	0	5,0	1	0	0	0	0,0	1	4	4	3	60,0	5	3	3	3	70,0	0	0	1	1	10,0	0	0	0	0	0,0	3	3	1	1	40,0	4	2	2	3	55,0	2	1	0	0	15,0	0	0	0	0	0,0	2	1	1	4	40,0	4	3	0	2	45,0	1	0	0	0	5,0	0	0	0	0	0,0	0	1	0	1	10,0	3	4	2	3	60,0	2	1	1	0	20,0	1	0	0	0	5,0	1	0	0	0	5,0	3	1	1	1	30,0	4	2	2	0	40,0	1	0	0	0	5,0	0	0	0	1	5,0	6	3	3	0	60,0	1	2	5	5	65,0	1	2	0	0	15,0	1	0	0	0	5,0	1	4	0	1	30,0	5	5	6	5	105,0	1	0	0	0	5,0	0	0	0	0	0,0	1	1	0	1	15,0	0	1	2	1	20,0	0	0	0	1	5,0	0	0	0	0	0,0	2	3	2	1	40,0	1	4	3	1	45,0	1	0	0	0	5,0	0	0	0	0	5,0	média				39,5					63,5					14,0	des.pd.				18,5					30,7					14,6					2,4

¹diluição do sangue

Tabela 12 – Análises descritiva e comparativa da parasitemia máxima do experimento DX#1

Pico de parasitemia				
Animal	10 ⁴ par/ml		log10	
	Cont	DX00	Cont	DX100
cdg-1	755,0	130,0	6,878	6,114
cdg-2	295,0	70,0	6,470	5,845
cdg-3	1993,3	55,0	7,300	5,740
cdg-4	1220,0	45,0	7,086	5,653
cdg-5	925,0	60,0	6,966	5,778
cdg-6	205,0	40,0	6,312	5,602
cdg-7	865,0	65	6,937	5,813
cdg-8	1613,3	105	7,208	6,021
cdg-9	510,0	20	6,708	5,301
cdg-10	40,0	45	5,602	5,653
média	842,2	63,5	6,747	5,752
desvio padrão	594,7	30,7	0,481	0,215
W	0,7328	0,2606	0,1590	0,7667
Normal?	sim	sim	sim	sim
ANOVA	0,000998 (par)		0,000023 (log)	
Teste de mediana	0,0003		0,0003	
Man-Whitney	0,00178		0,00178	

exemplo de cálculo de \log_{10} : $\log 755 \cdot 10^4 = \log 755 + \log 10^4 = 2,878 + 4 = 6,878$

Questões

- A distribuição é normal? Sim.
- Que teste usar? ANOVA ou teste t.
- O pico de parasitemia do grupo tratado é menor do que o do grupo controle? É, pois a comparação do grupo controle com o tratado com a droga DX é altamente significativa, tanto com os dados reais como com as transformações logarítmicas.

Acompanhamento da sobrevida e da mortalidade

As curvas de sobrevida e mortalidade podem ser calculadas e expressas graficamente como demonstrado anteriormente, a partir de planilhas como a da Tabela 13. As Figura 7 e 8 mostram a representação gráfica dos resultados obtidos neste experimento, tanto para percentual de mortalidade ou sobrevida (Figura 7) como para média do tempo de sobrevida (Figura 8). A questão de interesse aqui passa a ser a comprovação estatística de se estas curvas de sobrevida são diferentes entre si ou não, e portanto se tal situação experimental é mais ou menos favorável ao hospedeiro. Para essa análise organiza-se uma base de dados com os animais individuais nas linhas e com três colunas de variáveis: o grupo (controle ou DX), o tempo de sobrevida observado para cada animal, e o indicador de dados a ser censurados, como na Tabela 14. Neste caso serão marcados como “censurados” todos os animais que não tiverem morrido, ou seja, tiverem sobrevivido ao último dia de observação do experimento (no caso, dia quarenta), ou que tiverem sido sacrificados, ou perdidos por qualquer outro motivo. Os programas de análise de sobrevida levam em consideração essa restrição.

Tabela 13 – Planilha de cálculo de mortalidade e sobrevida do experimento DX#1

DX#1: mortalidade cumulativa (%MC)							DX#1: sobrevida cumulativa (%SC)				
dpi	Cont (n=10)			DX100 (n=10)			dpi	Cont (n=10)		DX100 (n=10)	
	mi	ma	%MC	mi	ma	%MC		sobreviventes	%SC	sobreviventes	%SC
0	0	0	0	0	0	0	0	10	100	10	100
13	1	1	10	0	0	0	13	9	90	10	100
14	2	3	30	0	0	0	14	7	70	10	100
15	2	5	50	0	0	0	15	5	50	10	100
16	2	7	70	0	0	0	16	3	30	10	100
17	0	7	70	0	0	0	17	3	30	10	100
19	0	7	70	1	1	10	19	3	30	9	90
20	0	7	70	0	1	10	20	3	30	9	90
22	1	8	80	0	1	10	22	2	20	9	90
23	1	9	90	0	1	10	23	1	10	9	90
24	0	9	90	1	2	20	24	1	10	8	80
25	0	9	90	0	2	20	25	1	10	8	80
26	0	9	90	1	3	30	26	1	10	7	70
27	0	9	90	0	3	30	27	1	10	7	70
40	0	9	90	0	3	30	40	1	10	7	70
	M₅₀=15			M₅₀= -							
	%MC=90			%MC=30							

mi = mortalidade individual; ma = mortalidade acumulada

Tabela 14 – Análise dos dados de sobrevida do experimento DX#1

DX#1: tempo de sobrevida (TS)												
Animal	TS	Grupo	Censura	Testes aplicado para comparar Controle x DX100								
cdg-1	12	Cont	não	Cont	média	15,4	teste	p				
cdg-2	13	Cont	não						des.pd.	3,4	Gehan-Wilcoxon	0,00059
cdg-3	13	Cont	não								F	0,00162
cdg-4	14	Cont	não								Cox	0,00030
cdg-5	14	Cont	não								Log-rank	0,00103
cdg-6	15	Cont	não								Peto & Peto	0,00059
cdg-7	15	Cont	não									
cdg-8	21	Cont	não									
cdg-9	22	Cont	não									
cdg-1	18	DX100	não	DX100								
cdg-2	23	DX100	não	média	22,3							
cdg-3	26	DX100	não	des.pd.	3,3							

Para a análise de sobrevida na pesquisa biomédica utiliza-se um conjunto de testes especialmente desenvolvidos com esta finalidade, geralmente apresentado sob a forma de um módulo específico nos diferentes programas estatísticos. Esses métodos são conhecidos como “técnicas analíticas” (tabela de vida, distribuição de sobrevida e estimativa de sobrevida (TS). Nestas abordagens, alguns dados serão “censurados”. Observações censuradas podem ocorrer quando a variável em questão é o tempo até um evento terminal e a duração do estudo tem um tempo limitado. Por exemplo, limitando-se o acompanhamento da mortalidade de um grupo controle e outro tratado há quarenta dias, observamos que no grupo controle todos os animais morreram enquanto que no tratado apenas três de um total de dez animais; assim temos registrado quando morreu cada um dos animais, porém os seis animais sobreviventes são considerados observações censuradas, na medida em que não podem ser contabilizadas, pois o evento não ocorreu. Uma outra situação neste exemplo é: se algum dos animais morreu comprovadamente por uma outra causa, ele também será uma observação censurada.

Nestes programas geralmente podemos obter as seguintes informações:

- análises de tabelas de vida
- ajuste da distribuição (*fitting*)
- método de Kaplan-Meier (Produto-Limite)
- comparação de sobrevida em dois ou mais grupos
- modelos de regressão para dados censurados
- parâmetros de ajuste para estimativas

Destas opções, as que mais interessam à análise de experimentos de modulação da resistência do hospedeiro e da virulência do parasita nas infecções experimentais são: análises de tabelas de vida, o método de Kaplan-Meier e a comparação de sobrevida em dois ou mais grupos.

A *análise de tabela de vida* é um dos mais antigos testes para análise de sobrevida. Pode ser vista como uma tabela de distribuição de frequência “reforçada”. Os tempos de sobrevida são distribuídos em um certo número de intervalos e para cada intervalo é calculada a frequência de casos (animais) vivos ou mortos que entram em cada intervalo, bem como o número de casos perdidos ou censurados no respectivo intervalo. Com base nestes números e proporções, várias análises adicionais podem ser computadas: o *número de casos sob risco* (número de casos que entram vivos no respectivo intervalo, menos o número de casos censurados no respectivo intervalo); a *proporção de morte* (razão entre o número de casos mortos em cada intervalo e o número de casos sob risco no intervalo); e *proporção de sobrevida* (um menos a proporção de morte). Calcula-se também a *mediana do tempo de sobrevida* (M_{50}), ou seja, o TS no qual a função de sobrevida cumulativa é igual a 0,5. Outros percentis (M_{25} e M_{75}) também podem ser calculados. O *ajuste de distribuição* é usado para verificar se a distribuição de TS se dá de modo exponencial ou linear ao acaso, se segue a distribuição Weibull para eventos extremos, ou se segue a distribuição de Gompertz, os três tipos mais frequentes.

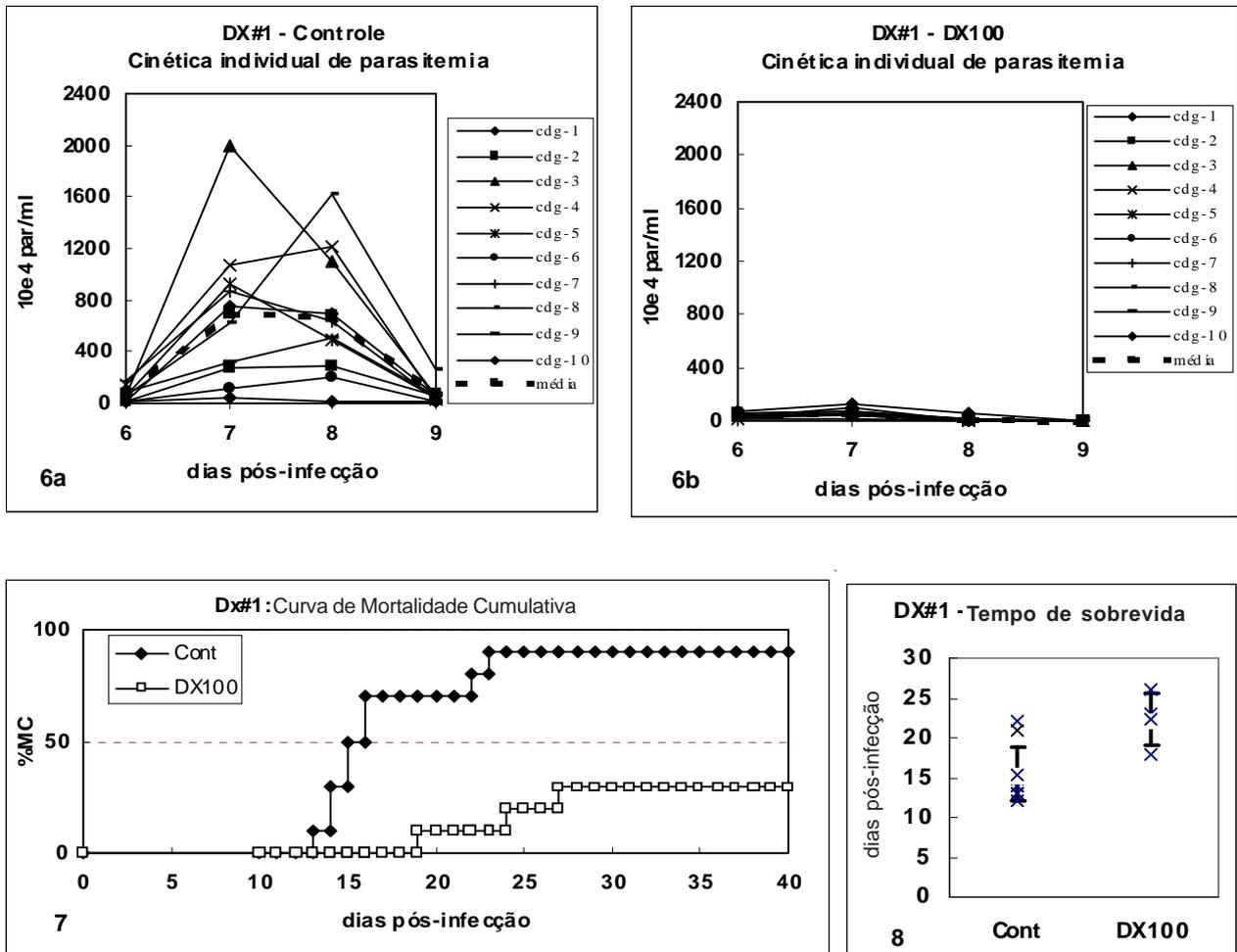
O método de Kaplan-Meier estima a função de sobrevivência diretamente a partir dos tempos contínuos de sobrevivência ou morte. A vantagem sobre a tabela de vida é que o resultado estimado não depende de agrupar os dados em certo número de intervalos de tempo.

Pelo método de comparação de duas ou mais amostras se implementam os testes de Gehan, o teste de Cox-Mantel, o teste F de Cox, o teste de Peto & Peto, e o teste *log-rank*. Em princípio, como os tempos de sobrevivência não são normalmente distribuídos, aplicam-se testes não paramétricos baseados na ordenação (*ranking*). Os testes não paramétricos são para dados censurados. A maioria destes testes além do valor de p, indica também um valor de z, que pode ser usado para cálculos de diferenças entre grupos.

Não há um guia de regras claras para a escolha de um teste em especial para uma situação particular. O teste F de Cox tende a ser mais potente que o de Gehan, quando as amostras forem pequenas ($n < 50$), se seguirem uma distribuição exponencial ou então a distribuição de Weibull, e se não houver observações censuradas. O teste de Cox-Mantel e o de *log-rank* são mais poderosos (independente de censura ou não a dados) quando as amostras vêm de uma população que segue a distribuição exponencial ou a de Weibull.

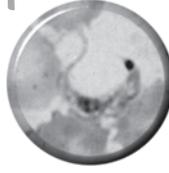
Quando os dados de duas amostras forem comparados, é muito importante examinar o número de observações censuradas em cada grupo. No caso de teste de novas drogas ou terapias, nos quais o animal melhora como resultado do tratamento, e tende a sair do estudo e ser censurado, resulta em números diferentes de observações censuradas em cada grupo. Essa censura sistemática pode levar a problemas nas comparações de resultados.

No caso específico do experimento DX#1, todos os testes indicaram diferenças significativas entre os animais infectados não tratados (Cont) e os tratados com a droga X na concentração de 100 mg/kg de peso (DX100).



Figuras 6-8 – Resultados do experimento DX#1 analisando os grupos Controle e DX100: (6) curva de parasitemia; (7) curva de mortalidade cumulativa; (8) distribuição do tempo de sobrevivência (gráficos obtidos através do programa Excel para Windows)

Capítulo 20



ANEXOS

Conteúdo

- Princípios, normas e legislação para experimentação animal
- Princípios éticos na experimentação animal
- Detalhamento de projetos de pesquisa para obtenção de registro junto à Comissão de Ética
- Agentes comumente usados para eutanásia
- Modelos de aviso de trabalho com *Trypanosoma cruzi*
- Protocolo de descarte de animais infectados
- O que fazer em caso de acidente
- Ficha para planejamento de experimento *in vivo*
- *Check-list* para planejamento de experimento *in vivo*
- Esquema de marcação dos animais
- Modelos de ficha de gaiola
- Ficha de análise individual de camundongos infectados
- Calendário gregoriano
- Programação de experimento
- Coleta de dados para hematócrito e avaliação leucocitária
- Coleta de dados de contagem leucocitária percentual
- Coleta de dados de evolução ponderal
- Coleta de dados de parasitemia pelo método de Pizzi-Brener
- Coleta de dados de parasitemia por contagem em câmara de Neubauer
- Coleta de dados de mortalidade
- Legislação sobre o uso de animais de laboratório

Princípios, normas e legislação para experimentação animal

Desde 1995, quando o Congresso Nacional regulamentou as “Normas para o trabalho com microorganismos patogênicos e geneticamente modificados” (Lei 8974/95) e instituiu pelo decreto 1752/95 a Comissão Técnica Nacional de Biossegurança (CTNBio), as diversas instituições de pesquisa têm procurado constituir Comitês de Ética em Pesquisa com animais. Esses Comitês e Comissões de Pesquisa e Ética são pré-credenciados junto à Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) do Ministério da Saúde e têm elaborado procedimentos específicos a serem seguidos em cada instituição. Essas iniciativas tomaram por base os “Princípios Éticos na Experimentação Animal”, elaborados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA) em 1990/92. Outra instituição que tem sido referência na formulação de normas e códigos de conduta ética nessa área é a Universidade Federal do Rio Grande do Sul, através de sua Comissão de Bioética, que gerou em 1997 resoluções normativas para a Utilização de Animais em Projetos de Pesquisa. Em 1999, tanto a Fundação Oswaldo Cruz (Portaria da Presidência 099/99-PR de 06/04/99), como o Instituto de Biofísica da UFRJ, também instituíram suas comissões de ética para qualificar sob o ponto de vista ético, os protocolos experimentais envolvendo o uso de animais de laboratório no âmbito de seus laboratórios de pesquisa.

Código de conduta aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FIOCRUZ para o uso de animais de laboratório na instituição

- A escolha sempre que possível de métodos alternativos, ou seja, formas de estudo que não utilizem animais;
- A utilização de animais em pesquisa deve estar condicionada à relevância científica e à adequação do método de estudo;
- O pesquisador deve ser treinado para fazer experimentação em animais, e é responsável pelo seu bom uso;
- Deve-se utilizar o menor número possível de animais, necessários para obtenção de resultados válidos;
- A dor e o sofrimento desnecessários são inaceitáveis;
- O transporte, as acomodações e o trato dos animais devem ser feitos com o mínimo de estresse, de forma que seu equilíbrio biológico seja preservado.

Endereços eletrônicos para documentação apropriada referente à legislação e aspectos éticos para o uso de animais em expe- rimentação biológica:

- Fundação Oswaldo Cruz: Vice-Presidência de Pesquisa e Ensino
(<http://www.fiocruz.br/vppqe/etica/>)
- Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA):
(<http://www.meusite.com.br/COBEA/>)
- Comissão de Bioética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul:
(<http://www.ufrgs.br/HPCA/gppg/bioetica.html>)

Princípios éticos na experimentação animal

A evolução contínua das áreas de conhecimento humano, com especial ênfase àquelas de biologia, medicina humana e veterinária, e a obtenção de recursos de origem animal para atender necessidades humanas básicas, como nutrição, trabalho e vestuário, repercutem no desenvolvimento de ações de experimentação animal, razão pela qual se preconizam posturas éticas concernentes aos diferentes momentos de desenvolvimento de estudos com animais de experimentação.

Postula-se:

Artigo I - É primordial manter posturas de respeito ao animal, como ser vivo e pela contribuição científica que ele proporciona.

Artigo II - Ter consciência de que a sensibilidade do animal é similar à humana no que se refere a dor, memória, angústia, instinto de sobrevivência, apenas lhe sendo impostas limitações para se salvaguardar das manobras experimentais e da dor que possam causar.

Artigo III - É de responsabilidade moral do experimentador a escolha de métodos e ações de experimentação animal.

Artigo IV - É relevante considerar a importância dos estudos realizados através de experimentação animal quanto a sua contribuição para a saúde humana em animal, o desenvolvimento do conhecimento e o bem da sociedade.

Artigo V - Utilizar apenas animais em bom estado de saúde.

Artigo VI - Considerar a possibilidade de desenvolvimento de métodos alternativos, como modelos matemáticos, simulações computadorizadas, sistemas biológicos *in vitro*, utilizando-se o menor número possível de espécimes animais, se caracterizada como única alternativa plausível.

Artigo VII - Utilizar animais através de métodos que previnam desconforto, angústia e dor, considerando que determinariam os mesmos quadros em seres humanos, salvo se demonstrados, cientificamente, resultados contrários.

Artigo VIII - Desenvolver procedimentos com animais, assegurando-lhes sedação, analgesia ou anestesia quando se configurar o desencadeamento de dor ou angústia, rejeitando, sob qualquer argumento ou justificativa, o uso de agentes químicos e/ou físicos paralizantes e não anestésicos.

Artigo IX - Se os procedimentos experimentais determinarem dor ou angústia nos animais, após o uso da pesquisa desenvolvida, aplicar método indolor para sacrifício imediato.

Artigo X - Dispor de alojamentos que propiciem condições adequadas de saúde e conforto, conforme as necessidades das espécies animais mantidas para experimentação ou docência.

Artigo XI - Oferecer assistência de profissional qualificado para orientar e desenvolver atividades de transportes, acomodação, alimentação e atendimento de animais destinados a fins biomédicos.

Artigo XII - Desenvolver trabalhos de capacitação específica de pesquisadores e funcionários envolvidos nos procedimentos com animais de experimentação, salientando aspectos de trato e uso humanitário com animais de laboratório.

* Esses princípios foram elaborados pelo COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (1990/92), entidade filiada ao International Council for Laboratory Animal Science (ICLAS). Seguem três princípios básicos: **Sensibilidade, Bom Senso e Boa Ciência**. Este trabalho foi inicialmente elaborado pelo COMITÉ DE ÉTICA E LEGISLAÇÃO DO COBEA, e se baseou em textos internacionalmente adotados, como os do ICLAS, do CALAS (Canadian Association of Laboratory Animal Science) e do CIAL (Centre d'Information sur les Animaux de Laboratoire), adaptados às nossas condições.

COBEA - Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
C.G.C 53.781.159/0001-57
Rua Botucatu, 862 - Vila Clementino
CEP:04023-900 - São Paulo - Brasil
Tel: (11) 576-4558 ou (11) 576-4526

Detalhamento de projetos de pesquisa para obtenção de registro junto à Comissão de Ética

- De modo geral, cada Comissão de Ética nas diferentes instituições disponibiliza formulários próprios (protocolos) para submissão de projetos, que costumam ser encontrados via internet. Na FIOCRUZ, o acesso se dá através da página da Vice-Presidência de Pesquisa e Ensino (www.fiocruz.br/vppqe/etica/).
- Os laboratórios com licença para desenvolver pesquisas que envolvem o uso de animais precisam manter registros de uso para eventuais inspeções, e encaminhar à Comissão de Ética um balanço de todos os animais utilizados anualmente. No registro deverão constar detalhes do início e término da experimentação, procedimento experimental e método de eutanásia empregados;
- Em caso de experimentação envolvendo animais silvestres, é imprescindível a inteira adequação as pré-condições estabelecidas pelo IBAMA.
- A experimentação científica em animais é importante. Algumas pesquisas têm mais importância que outras, porém existem propostas que, por serem inadequadas, desde o ponto de vista ético, moral ou metodológico, devem ser até mesmo impedidas de serem realizadas. Esta posição está de acordo com a nova postura da Ciência, onde não há lugar para a Ciência sem consciência, devido a complexidade de toda a realidade que nos rodeia.
- A possibilidade de generalização dos conhecimentos obtidos em animais não deve justificar todo e qualquer experimento. Nem todos os conhecimentos gerados em modelos animais são plenamente transponíveis ao ser humano, existem idiossincrasias que devem ser continuamente lembradas. O conflito entre o bem dos seres humanos e o bem dos animais deve ser evitado sempre que possível. Ou seja, devemos buscar estabelecer estratégias para minimizar este confronto, porém não negando a sua existência.
- A avaliação da necessidade da utilização de animais em experimentos científicos pode ser realizada em dois diferentes estágios:
 - o pesquisador deve caracterizar que este é o único meio de estudar a situação proposta, não havendo possibilidade de outro método alternativo disponível;
 - a caracterização da necessidade deve demonstrar que a pesquisa é indispensável, imperativa ou requerida.
- A pesquisa é considerada indispensável quando é essencial para que alguma coisa seja feita ou ocorra. Por exemplo, quando realmente pode contribuir para o conhecimento básico ou em atividades de ensino ou formação profissional.
- A pesquisa é considerada imperativa quando está associada a uma prioridade maior, tais como as realizadas com o objetivo de minorar o sofrimento de pessoas com AIDS, câncer ou outras doenças graves.
- A pesquisa é requerida quando é demandada por uma decisão legal. Neste caso enquadram-se os testes de novas drogas e de toxicidade de substâncias.
- Os projetos de pesquisa que envolvem o uso de animais precisam explicitar:
 - a abordagem científica do grupo
 - a relevância do trabalho, destacando o potencial benefício do projeto específico (mais do que a importância do tema do projeto)
 - os procedimentos experimentais que envolvam o uso de animais de laboratório, sua justificativa e grau provável de severidade resultante dos procedimentos aos quais os animais forem submetidos, para que possam ser equilibrados de acordo com os potenciais benefícios.
- A severidade resultante dos procedimentos se divide em três faixas: branda, moderada e substancial. Exemplos de severidade em diferentes procedimentos:
 - 1 – Branda
 - Amostras pequenas de sangue ou pouco freqüentes;
 - Testes de irritação na pele onde espera-se que substâncias produzam somente irritação branda;
 - Procedimentos cirúrgicos menores com anestesia;

- Biópsia superficial ou introdução de cânula nos vasos sanguíneos periféricos sob anestesia;
 - Procedimentos que serão terminados antes que o animal demonstre mais do que pequenas mudanças no seu comportamento habitual.
- 2 - Moderada
- Testes de toxicidade evitando desfecho letais;
 - Maioria dos procedimentos cirúrgicos, desde que o sofrimento possa ser controlado por anestesia e cuidado pós-operatório confiáveis.
- 3 – Substancial
- Qualquer procedimento que resulte em uma maior mudança no estado normal de saúde ou bem-estar dos animais;
 - Procedimentos de toxicidade, aguda ou crônica onde morbidade significativa ou morte é o desfecho final;
 - Cirurgia grave que pode resultar em pós-operatório com sofrimento.
- Quando à metodologia experimental, costuma ser necessário indicar:
 - espécie, linhagem/cepa, sexo e peso dos animais em cada procedimento, e justificar seu uso.
 - fonte(s) provedora(s) dos animais;
 - número aproximado de animais, justificando a sua utilização;
 - as condições gerais, alojamento e alimentação dos animais (local, sala, tipo de alojamento, suas condições ambientais como temperatura, iluminação, umidade, ventilação, etc)
 - o tipo de alimentação (convencional ou outra) e de hidratação (tipo de bebedouro – automático, mamadeira, tijela), e de água (de rede, filtrada, mineral, autoclavada)
 - as condições de biossegurança empregadas no projeto, segundo o nível de risco imposto pelo agente microbiológico
 - as condições de limpeza, desinfecção e esterilização (produto usado: quaternários de amônio, álcool a 70%, iodo, cloro ou outro; protocolo de esterilização de materiais e equipamentos)
 - o tipo de contenção (física ou química) a que os animais precisam ser submetidos para injeção ou coleta de material, para cirurgia, para alimentação de insetos ou outros procedimentos, e por qual período
 - o uso de relaxantes ou paralisantes musculares
 - tipo de anestesia e a situação apropriada em cada modelo animal, e como será avaliado o nível anestésico (pressão arterial, frequência cardíaca e/ou respiratória, EEG, reflexos flexor, da cauda e/ou coreano, ou outros); exemplos de procedimentos que não requerem anestesia: administração de fluidos, imunização, medicamentos orais, coleta de sangue (exceto intracardíaca e periorbital), procedimentos da prática normal de veterinária e outros envolvendo diagnóstico e tratamento de doenças; exemplos de procedimentos que envolvem dor e que requerem anestesia incluem: cirurgia, qualquer agente que induza inflamação excessiva ou necrose, coleta de sangue intracardíaca ou periorbital.
 - se haverá alguma manipulação cirúrgica dos animais (simples ou múltipla), porque descrevê-la brevemente, onde será realizada, se resultarão em sobrevida e que cuidados e terapias pré e pós-cirúrgicas serão utilizados
 - se haverá administração de drogas, reagentes e material radioativo, quais, por que dose/via, com que frequência, e qualquer complicação conhecida do material.
 - se serão extraídos fluidos *antemortem* (p.ex. sangue, urina, bile, líquido) dos animais, com tipo, quantidade da amostra, frequência e método de coleta
 - o procedimento/planejamento de acompanhamento para animais moribundos e o momento no qual será aplicada a eutanásia
 - o método de eutanásia a ser usado nos animais (deslocamento cervical, decapitação, CO₂, dessangramento com anestesia, dose excessiva de anestesia ou outro)
 - condições de descarte de carcaças

Agentes comumente usados para eutanásia

Tabela completa disponível no endereço: <http://www.biof.ufrj.br/>

Agente físico: Deslocamento cervical

- Local de ação: Depressão cerebral direta
- Classificação Hipoxemia devida à ruptura dos centros vitais
- Comentários: Contração muscular violenta pode ocorrer após o deslocamento cervical
- Características do trabalho
 - Segurança do pessoal: Seguro
 - Facilidade de realização: Requer treinamento e qualificação
 - Velocidade: Moderadamente rápido
 - Considerações econômicas: Pouco dispendioso
 - Alterações de tecidos: Útil se tecidos livres de resíduos químicos são necessários
 - Eficiência: Irreversível
 - Adequação à espécie: Adequado somente para galináceos, camundongos de laboratório e ratos com menos de 200gr e coelhos com menos de 1 kg
 - Observação: Aceitável com sedação prévia ou anestesia ligeira (vide texto)

Agente físico: Decapitação

- Local de ação: Depressão cerebral direta
- Classificação Hipoxemia devida à ruptura dos centros vitais
- Comentários: Contração muscular violenta ocorre após a decapitação
- Características do trabalho
 - Segurança do pessoal: Seguro, cuidados com ferimentos mecânicos
 - Facilidade de realização: Facilmente executado com o mínimo de treinamento.
 - Velocidade: Moderadamente rápido, pode manter a consciência por 13 a 14 s
 - Considerações econômicas: Pouco dispendioso
 - Alterações de tecidos: Útil se tecidos livres de resíduos químicos são necessários
 - Eficiência: Irreversível
 - Adequação à espécie: Recomendado para assegurar a morte após o atordoamento por pancada controlada ou tiro em espécies domésticos de grande porte ou coelhos
 - Observação: Aceitável quando precedido de outros métodos que aliviam a ansiedade e consciência

Agente depressor direto dos neurônios: Dióxido de carbono

- Local de ação: Depressão direta do córtex cerebral e das estruturas subcorticais, depressão direta do músculo cardíaco
- Classificação: Hipoxemia devida à depressão dos centros vitais
- Comentários: Inicialmente ocorre a inconsciência, não há ansiedade nem dor; possível atividade motora involuntária após a inconsciência; nenhuma atividade motora após breve período
- Características do trabalho
 - Segurança do pessoal: Risco mínimo
 - Facilidade de realização: Usado em câmara de contenção fechada
 - Velocidade: Moderadamente rápido
 - Considerações econômicas: Pouco dispendioso

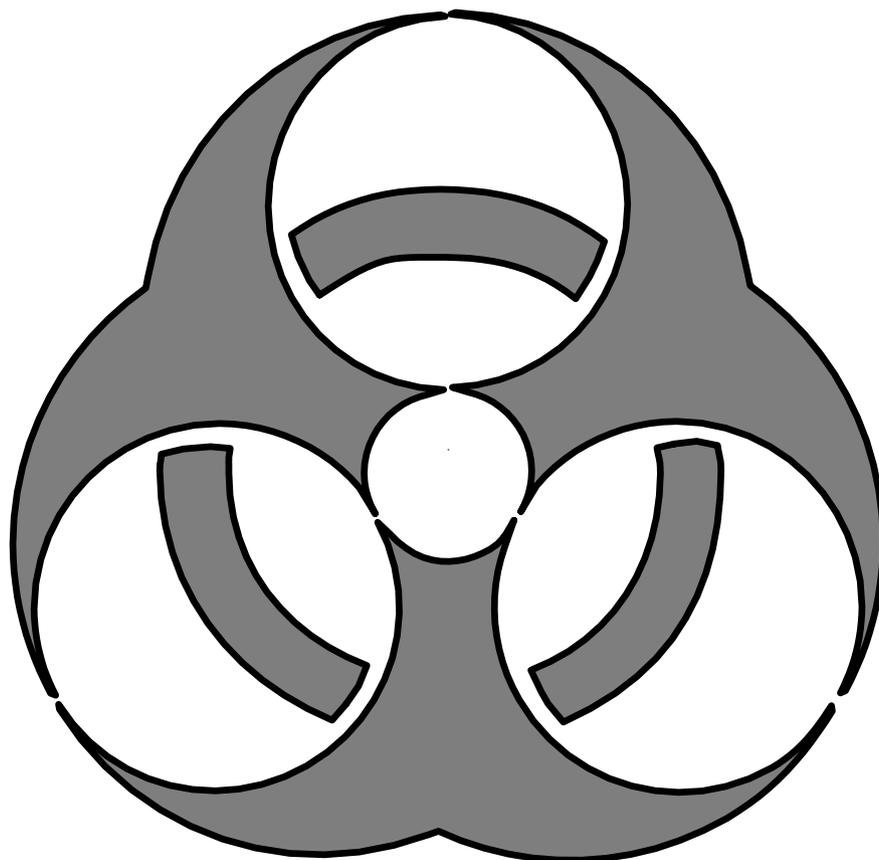
- Alterações de tecidos: Alterações associadas à hipóxia podem ocorrer
- Eficiência: Eficaz
- Adequação à espécie: Pequenos animais de laboratório, aves e pequenos cachorros
- Observação: Aceitável mas o tempo necessário pode ser prolongado em animais imaturos ou neonatos

Agentes depressores diretos dos neurônios: Gases anestésicos (éter, clorofórmio, halotane, óxido nítrico, enflurane e isoflurane)

- Local de ação: Depressão direta do córtex cerebral e das estruturas subcorticais e dos centros vitais
- Classificação: Hipoxemia devida à depressão dos centros vitais
- Comentários: Inicialmente ocorre a inconsciência não há ansiedade nem dor; possível atividade motora involuntária após a inconsciência; nenhuma atividade motora após breve período
- Características do trabalho com **Éter**
 - Segurança do pessoal: Inflamável e explosivo
 - Facilidade de realização: Facilmente realizável em câmara de contenção fechada
 - Velocidade: Início vagaroso da anestesia
 - Considerações econômicas: Relativamente pouco dispendioso
 - Alterações de tecidos: Pequenas alterações podem ocorrer nos órgãos parenquimatosos
 - Eficiência: Altamente eficiente, quando o sujeito for suficientemente exposto
 - Adequação à espécie: Adequado para gatos, cachorros jovens, aves, roedores e outras pequenas espécies. Quando administrado em animais de maior porte, requer equipamento especializado. O início é vagaroso, vapores são irritantes
 - Observação: Aceitável, mas perigoso
- Características do trabalho com **Clorofórmio**
 - Segurança do pessoal: Não inflamável e não explosivo; exposição crônica de animais ou pessoas aos vapores pode ser perigoso por causa de danos potenciais no fígado ou rins e carcinogênese. Seguro quando usado com ventilação
 - Facilidade de realização: Facilmente realizável em câmara de contenção fechada; Pode ser administrado a animais de grande porte por meio de máscara. Usar câmara fechada com enchimento rápido.
 - Velocidade: Início rápido da anestesia
 - Considerações econômicas: Pouco dispendioso
 - Alterações de tecidos: Alterações extensas podem ocorrer nos órgãos parenquimatosos
 - Eficiência: Altamente eficiente, quando o sujeito for suficientemente exposto; pouco eficiente em jovens ou neonatos
 - Adequação à espécie: Adequado para pequenos animais, incluindo aves, roedores e vison. Útil em animais de grande porte em situações de emergência.
 - Observação: Aceitável em animais de pequeno porte somente em condições controladas (vide texto); Aceitável somente em situações de emergência. É um agente eficiente mas outros métodos são preferíveis. Não é aceitável para a maioria dos animais com menos de quatro meses
- Características do trabalho com **Halotane**
 - Segurança do pessoal: Não inflamável, não explosivo, exposição crônica de animais ou pessoas aos vapores pode ser prejudicial
 - Facilidade de realização: Facilmente realizável em câmara de contenção fechada, pode ser administrado a animais de grande porte por meio de máscara
 - Velocidade: Início rápido da anestesia
 - Considerações econômicas: Dispendioso
 - Alterações de tecidos: Pode ocorrer em órgãos parenquimatosos

- Eficiência: Altamente eficiente, quando o sujeito for exposto suficientemente
- Adequação à espécie: Adequado para gatos, cachorros jovens, aves, roedores e outras pequenas espécies. Quando administrado em animais de maior porte, requer equipamento especializado. O início é vagaroso.
- Observação: Aceitável
- Características do trabalho com **Enflurane**
- Segurança do pessoal: Não inflamável, não explosivo, exposição crônica de animais ou pessoas aos vapores pode ser prejudicial
- Facilidade de realização: Facilmente realizável em câmara de contenção fechada; pode ser administrado em animais de grande porte por meio de máscara
- Velocidade: Início rápido da anestesia
- Considerações econômicas: Dispendioso
- Alterações de tecidos: Pode ocorrer em órgãos parenquimatosos, particularmente rins
- Eficiência: Altamente eficiente, quando o sujeito for exposto suficientemente; anestesia profunda pode ser acompanhada de contrações motoras
- Adequação à espécie: Adequado para gatos, cachorros jovens, aves, roedores e outras pequenas espécies.
- Observação: Aceitável, mas não recomendável, devido à atividade motora no plano de anestesia profunda
- Características do trabalho com **Isoflurane**
- Segurança do pessoal: Não inflamável, não explosivo, exposição crônica de animais ou pessoas aos vapores pode ser prejudicial
- Facilidade de realização: Facilmente realizável em câmara de contenção fechada, pode ser administrado em animais de grande porte por meio de máscara facial
- Velocidade: Alta volatilidade e potência. Início rápido da anestesia
- Considerações econômicas: Muito dispendioso
- Alterações de tecidos: Pode ocorrer em órgãos parenquimatosos, particularmente rins
- Eficiência: Altamente eficiente, quando o sujeito for exposto suficientemente; a indução não parece ser estressante
- Adequação à espécie: Adequado para pequenos animais incluindo aves e roedores. Útil em animais de grande porte em situações de emergência
- Observação: Aceitável em animais de pequeno porte; aceitável em animais de grande porte somente em situações emergenciais.
- Características do trabalho com **Óxido Nítrico**
- Segurança do pessoal: Não inflamável, mas alimenta combustão; exposição crônica de animais ou pessoas aos vapores pode ser prejudicial
- Facilidade de realização: Facilmente realizável em câmara de contenção fechada, pode ser administrado a animais de grande porte por meio de máscara facial
- Velocidade: Início de efeito rápido em concentração de 100%
- Considerações econômicas: Relativamente dispendioso
- Alterações de tecidos: Lesões hipóxicas podem ocorrer
- Eficiência: Altamente eficiente, quando o sujeito for exposto suficientemente;
- Adequação à espécie: Adequado para gatos, cachorros jovens, aves, roedores e outras pequenas espécies Não é recomendado sozinho para animais de mau porte
- Observação: Aceitável em animais de pequeno porte; O uso em animais de grande porte requer suplementação com outros agentes

Modelos de aviso de trabalho com *Trypanosoma cruzi*



RISCO BIOLÓGICO: NB 2

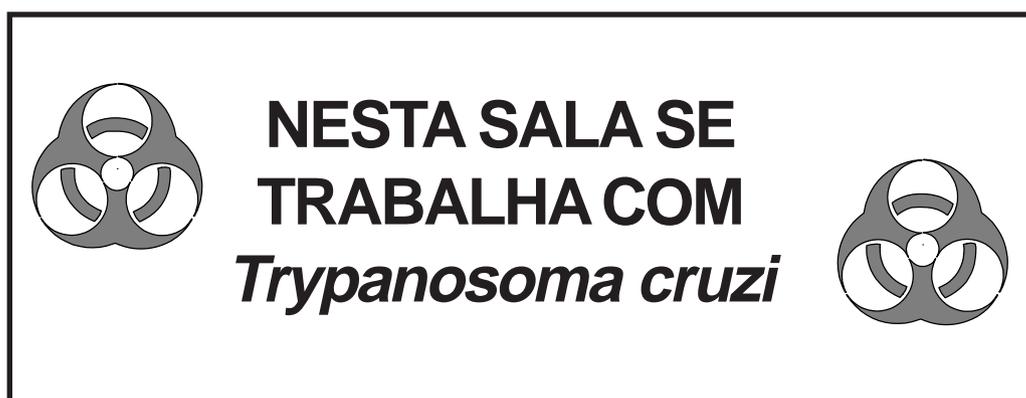
AGENTE DE RISCO: *T. cruzi*

GRUPO DE RISCO: II CLASSE DE RISCO : 2

RESPONSÁVEL PELO LABORATÓRIO:

Tel:

E-mail:



Protocolo de descarte de animais infectados

COMO DESCARTAR CAMUNDONGO INFECTADO (tratamento químico para desinfecção)

Após sangria ou dissecação os animais devem:

- ter o ventre aberto e os órgãos expostos
- ser colocados em sacos plásticos (de lixo)
- ser recobertos com formalina a 4%
- o saco vedado deve ser deixado em repouso por no mínimo 24 h
- o saco com os animais pode então ser descartado

O que fazer em caso de acidente com *Trypanosoma cruzi*

- É obrigatório conter o material contaminado por *T. cruzi*: evitar que líquidos se espalhem, cobrindo com material absorvente seco para em seguida colocar o desinfetante e depois descontaminar o material absorvente (autoclave ou desinfetante); evitar que resíduos sólidos contaminados sejam carregados nas solas de sapato ou roupas;
- Atender o(s) indivíduo exposto aos riscos durante o acidente;
- Quando aerossóis e/ou gotas forem projetados à distância, limpar o local com papel absorvente embebido em álcool a 70%. Na roupa ou na pele, saturar a área com álcool 70%;
- Limpar a pele imediatamente com álcool ou outro desinfetante;
- Se o contato for com os olhos ou mucosas, lavar exaustivamente com água corrente em lava-olhos (se não tiver, lavar com salina ou água boricada);
- As feridas superficiais devem ser lavadas exaustivamente e cauterizadas com nitrato de prata;
- As feridas punctuais (agulha) devem ser espremidas, para obter o máximo de sangue possível, e cauterizadas;
- Informar o acidente ao responsável médico apropriado para que sejam tomadas as providências cabíveis (teste sorológico, tratamento, acompanhamento clínico-laboratorial);
- Colher sangue para teste de parasitemia (pesquisa do parasita em gota espessa e em capilar de microhematócrito, de três em três dias, durante os primeiros quinze dias após o acidente);
- Colher soro ou plasma para sorologia de fase aguda: IgM anti *T. cruzi* nos dias 0, 15 e 30 após o acidente, e se possível dosar proteínas de fase aguda;
- Se houver apenas um risco leve (suspeita) de infecção, monitorar o sangue por alguns meses mais, com sorologia (IgG anti *T. cruzi*);
- Se o risco de infecção for grande (certeza), tratar imediatamente com benznidazol (Rochagan). Não aguardar a evidência de infecção;
- Informar o acidente à autoridade de saúde pública competente, preenchendo o formulário de notificação de acidentes da Instituição; notificar a chefia imediata e à Coordenação de Saúde do Trabalhador.

Ficha para planeamento de um experimento *in vivo*

Título do experimento

Objetivos (perguntas)

Grupos experimentais

Parâmetros que serão acompanhados (individuais ou em *pool*)

· nos animais

· em células

· em tecidos

Previsão de número de gaiolas, de tempo de ocupação do espaço no biotério e de data para chegarem ao infectório

Modelo experimental

animal: _____ sexo: m f idade e/ou peso: _____

parasita/cepa: _____ inóculo: _____ via: _____

esquema terapêutico:

Código de identificação dos animais

— — — — —

_____ _____ _____ _____
 experimento gaiola cdgo dpi

Check-list para um experimento *in vivo*

Identificação do experimento	
Data prevista para infecção	
Pedido dos animais ao biotério	
Planejamento e preparo dos inóculos	
Avaliação de espaço disponível no infectório	
Preparo de gaiolas e mamadeiras	
Preparo de fichas de gaiolas	
Preparo das fichas de acompanhamento	
a. controle de qualidade ambiental	
b. acompanhamento de parasitemia	
c. acompanhamento de mortalidade	
d. acompanhamento de peso	
e. ficha de coleta de dados hematológicos	
Pesagem pré-infecção	
Sangria pré-infecção	
Preparo de rótulos para tubos	
Preparo de planilhas para análise de dados (Excel)	
Registro no livro geral de experimentação animal do laboratório	
Preparo dos avisos de bancada e de parede	

Esquema de marcação dos animais

Pintura Furos na orelha Cortes na orelha

Animal	Marca	Animal	Marca	Animal	Marca	Animal	Marca
c1		c6		c11		c16	
c2		c7		c12		c17	
c3		c8		c13		c18	
c4		c9		c14		c19	
c5		c10		c15		c20	

Exemplos de esquemas

Número do animal	Pintura com ácido pícrico	Furo ou corte das orelhas
	(camundongos brancos)	(camundongos brancos, pretos ou cinzas)
1	Cabeça	1 orelha direita (OD)
2	Orelha esquerda (OE)	1 orelha esquerda (OE)
3	Orelha direita (OD)	2 OD
4	Pata dianteira esquerda (PDE)	2 piques OE
5	Pata dianteira direita (PDD)	3 piques OD
6	Pata traseira esquerda (PTE)	3 piques OE
7	Pata traseira direita (PTD)	1 + 2
8	Dorso	1 + 4
9	Base da cauda	1 + 6
10	Linha crânio-dorsal	sem corte
11	10+1	1 + 6
12 a 19	10+2 a 10+9	sem corte
20	sem marca	

Modelos de ficha de gaiola

Gaiola nº:	Exp:	Resp:	n inicial = em: /
Cepa do camundongo:	Sexo:	Nascimento:	Peso: em: /
<i>T. cruzi</i> cepa:	Inóc:	Via:	Data:
Observações			

Gaiola nº:		Exp:	Resp:	n inicial = em: /	
Cepa do camundongo:		Sexo:	Nascimento:	Peso: em: /	
<i>T. cruzi</i> cepa:		Inóc:	Via:	Data:	
nº mortos:	dia semana	Em: ____/____ ____/____ ____/____ ____/____ ____/____ ____/____	nº mortos:	dia semana	Em: ____/____ ____/____ ____/____ ____/____ ____/____ ____/____

Gaiola nº:	n inicial = em: /
Exp:	Resp:
Animal	Parasita
Sexo:	Cepa:
Nascimento:	Data:
Peso médio: em: /	Inóculo: Via:
Observações:	

Ficha de análise individual de camundongos infectados

Estudo da Cepa - (relação parasita-hospedeiro)¹

Camundongo nº	sexo	inoculado dia ____	com ____	parasitas
Linhagem	idade	morte dia ____	espontânea []	
	peso	sacrificado []		

CURVA DE INFECCÃO² E ALTERAÇÕES PATOLÓGICAS

dia											
curva de infecção											
pêlo arrepiado											
movimento											
edema (localizado)											
olhos											
paralisias											
incontín. urinária											
diarréia											
orelhas											

QUADRO ANÁTOMO-PATOLÓGICO

	Descrição
coração	
fígado	
baço	
outros	
cond. de morte	

¹Ficha adaptada da Figura 1 do artigo de Silva LHP & Nussenzweig V. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin Biol* 20: 191-208, 1953.

²Curva de parasitemia

Calendário Gregoriano

	JAN	FEV	MAR	ABR	MAI	JUN	JUL	AGO	SET	OUT	NOV	DEZ
01	01	32	60	91	121	152	182	213	244	274	305	335
02	02	33	61	92	122	153	183	214	245	275	306	336
03	03	34	62	93	123	154	184	215	246	276	307	337
04	04	35	63	94	124	155	185	216	247	277	308	338
05	05	36	64	95	125	156	186	217	248	278	309	339
06	06	37	65	96	126	157	187	218	249	279	310	340
07	07	38	66	97	127	158	188	219	250	280	311	341
08	08	39	67	98	128	159	189	220	251	281	312	342
09	09	40	68	99	129	160	190	221	252	282	313	343
10	10	41	69	100	130	161	191	222	253	283	314	344
11	11	42	70	101	131	162	192	223	254	284	315	345
12	12	43	71	102	132	163	193	224	255	285	316	346
13	13	44	72	103	133	164	194	225	256	286	317	347
14	14	45	73	104	134	165	195	226	257	287	318	348
15	15	46	74	105	135	166	196	227	258	288	319	349
16	16	47	75	106	136	167	197	228	259	289	320	350
17	17	48	76	107	137	168	198	229	260	290	321	351
18	18	49	77	108	138	169	199	230	261	291	322	352
19	19	50	78	109	139	170	200	231	262	292	323	353
20	20	51	79	110	140	171	201	232	263	293	324	354
21	21	52	80	111	141	172	202	233	264	294	325	355
22	22	53	81	112	142	173	203	234	265	295	326	356
23	23	54	82	113	143	174	204	235	266	296	327	357
24	24	55	83	114	144	175	205	236	267	297	328	358
25	25	56	84	115	145	176	206	237	268	298	329	359
26	26	57	85	116	146	177	207	238	269	299	330	360
27	27	58	86	117	147	178	208	239	270	300	331	361
28	28	59	87	118	148	179	209	240	271	301	332	362
29	29	**	88	119	149	180	210	241	272	302	333	363
30	30	---	89	120	150	181	211	242	273	303	334	364
31	31	---	90	---	151	---	212	243	---	304	---	365

Programação de Experimento

Experimento: _____ Data: _____

dpi	Dia	Mês	Dia semana	Esfr	Lam	Cap	Corte	FACS	Paras	_____	_____
-1											
0											
1											
2											
3											
4											
5											
6											
7											
8											
9											
10											
11											
12											
13											
14											
15											
16											
17											
18											
19											
20											
21											
22											
23											
24											
25											
26											
27											
28											
29											
30											
31											
32											
33											
34											
35											
36											
37											
38											
39											
40											
41											
42											
43											
44											
45											

Coleta de dados para hematócrito e avaliação leucocitária

Gaiola: _____ Exp.: _____
 Cdgo: _____ Cepa: _____ Sexo: _____ Idade na infecção: _____
T. cruzi: _____ Cepa: _____ Inóculo: _____ Via: _____ Data da infecção: _____

dpi	Hematócrito			Leuc. 10 ³ /ml	Contagem leucocitária percentual					
	Hem (cm)	Total (cm)	%		Linf	Neu	Mon	Eo	Bas	Total
c1										
c2										
c3										
c4										
c5										
c6										
c7										
c8										
c9										
c10										

Coleta de dados para contagem leucocitária percentual

Cdgo: _____ Gaiola: _____ Exp.: _____
T. cruzi: _____ Cepa: _____ Sexo: _____ Idade na infecção: _____
 Cepa: _____ Inóculo: _____ Via: _____ Data da infecção: _____

L: linfócitos; N: neutrófilos; M: monócitos; EB: eosinófilos + basófilos

	_____ dpi				_____ dpi				_____ dpi				_____ dpi			
	L	N	M	EB												
c1																
c2																
c3																
c4																
c5																
c6																
c7																
c8																
c9																
c10																

Coleta de dados de parasitemia pelo método Pizzi-Brener

Cdgo: _____ Gatola: _____ Exp.: _____
T. cruzi: _____ Cepa: _____ Sexo: _____ Idade na infecção: _____
 Cepa: _____ Inóculo: _____ Via: _____ Data da infecção: _____

Microscópio: _____; fator multiplicador para n° de parasitas/campo (cp): _____ x 10⁴ par/ml; diluição: _____

	_____ dpi				_____ dpi				_____ dpi										
	n° par	n° cps	par/cp	x dil	xf	10 ⁴ p/ml	n° par	n° cps	par/cp	x dil	xf	10 ⁴ p/ml	n° par	n° cps	par/cp	x dil	xf	10 ⁴ p/ml	
c1																			
c2																			
c3																			
c4																			
c5																			
c6																			
c7																			
c8																			
c9																			
c10																			
média																			
desvio																			

Coleta de dados de parasitemia usando câmara de Neubauer

Cdgo: _____ Exp.: _____ Idade na infecção: _____
T. cruzi: _____ Cepa: _____ Inóculo: _____ Via: _____ Data da infecção: _____
 Gaiola: _____ Sexo: _____

qi: quadrante

	_____ dpi					_____ dpi					_____ dpi									
	1°q	2°q	3°q	4°q	média	xdil 10 ⁴ p/ml	1°q	2°q	3°q	4°q	média	xdil 10 ⁴ p/ml	1°q	2°q	3°q	4°q	média	xdil 10 ⁴ p/ml		
c1																				
c2																				
c3																				
c4																				
c5																				
c6																				
c7																				
c8																				
c9																				
c10																				
média																				
desvio																				

Legislação sobre uso de Animais de Laboratório

Antecedentes históricos

O uso de modelos animais em pesquisas vem sendo feito desde a antigüidade (Goldim & Raymundo, 1997), de Pitágoras (582-500 aC) a Galeno (129-210 dC). A primeira pesquisa a usar sistematicamente animais talvez tenha sido a publicada por William Harvey em 1638, sobre a rede circulatória e seu funcionamento. Quando Darwin publicou “A Origem das Espécies” em 1859, estabeleceu os pressupostos do vínculo existente entre as diferentes espécies animais num único processo evolutivo e, desta forma, possibilitou a extrapolação dos dados obtidos em pesquisas com modelos animais para seres humanos.

A primeira lei a regulamentar o uso de animais em pesquisa foi proposta no Reino Unido, em 1876, através do British Cruelty to Animal Act. No sec. XIX também surgiram as primeiras sociedades protetoras dos animais, na Europa e nos estados Unidos. A primeira publicação norte-americana sobre aspectos éticos da utilização de animais em experimentação foi proposta pela Associação Médica Americana em 1909, mesmo ano da descoberta da doença de Chagas. Durante muitos anos as pesquisas que se utilizaram de modelos animais não foram fortemente questionadas devido ao seu alto impacto social, tais como as que possibilitaram o desenvolvimento das vacinas para raiva, tétano e difteria. Por outro lado, neste mesmo período surgiram inúmeras sociedades de proteção aos animais. No Brasil, o decreto n.º 24.645 de 10 de julho de 1934, definiu regras de proteção aos animais. Em 1959, o zoologista William Russell e o microbiologista Rex Burch publicaram um livro, onde estabeleceram os três “Rs” da pesquisa em animais: Replace, Reduce e Refine. Esta proposta não impede a utilização de modelos animais em experimentação, mas faz uma adequação no sentido de humanizá-la. A substituição dos animais (*replace*) por outros métodos alternativos, tais como: testes *in vitro*, modelos matemáticos, simulações por computador, deve ser estimulada. O estabelecimento de alternativas de modelos não-animais para experimentação e utilização em testes clínicos deve atender a duas importantes exigências: (1) o risco de um teste não-animal, se utilizado como rotina, deve ser igual ou inferior ao gerado pelo teste em animais, já em uso corrente, principalmente no que se refere a taxa de resultados falsos negativos; (2) o novo procedimento deve aumentar a eficiência do teste atualmente utilizado. As justificativas empregadas por vários autores para a redução de pesquisas científicas em animais (*reduce*) envolvem questões éticas e morais; de compaixão; de conservação ambiental; de natureza científica, econômica, política e até mesmo as requeridas por lei. A redução do número de animais utilizados, acompanhada pelo aumento da qualidade do tratamento estatístico dado para pequenas amostras, pode ser uma importante alternativa. O refinamento das técnicas utilizadas (*refine*) tem por objetivo minimizar a dor e o sofrimento nos experimentos em animais. Estes procedimentos incluem cuidados de analgesia e assepsia nos períodos pré, trans e pós-operatório. Podemos incluir também neste item as questões metodológicas e estatísticas que permitem analisar dados obtidos em amostras progressivamente menores.

Em 1978 a UNESCO estabeleceu a Declaração Universal dos Direitos dos Animais, documento no qual estão lançados os grandes temas de discussão sobre este assunto. No Brasil, a lei 6.638, de 08 de maio de 1979, estabeleceu as normas para a prática didático-científica da vivisseção de animais. Estas normas, que nunca foram regulamentadas, estipulam que somente estabelecimentos de terceiro grau podem realizar atividades didáticas com animais. Esta lei estabelece que as pesquisas devem ser realizadas sempre dentro do critério de não causar sofrimento nos animais envolvidos. As Normas de Pesquisa em Saúde (Resolução CNS 01/88), que vigoraram no Brasil de 1988 até outubro de 1996, e propunham que deveriam ser utilizados um mínimo de animais com um máximo de informações. Nas novas Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS196/96) esta colocação não foi mantida e a questão dos animais foi omitida, exceto quanto a sua necessidade prévia a realização de testes em seres humanos.

Durante a década de 80, alguns movimentos de defesa dos direitos dos animais, especialmente na Inglaterra,

praticaram atentados contra laboratórios, biotérios, instalações universitárias e até mesmo contra residências de pesquisadores. Estas ações atingiram tal magnitude, que a Associação Mundial de Medicina publicou uma declaração específica sobre a necessidade de serem estabelecidas garantias de vida para os pesquisadores e seus familiares. Em 1986, a lei inglesa foi atualizada, porém preservando todo o seu corpo doutrinário. Foram publicadas novas normas técnicas para os procedimentos que envolvam animais em projetos de pesquisa. Em 1996 foram apresentados no Brasil vários projetos de lei estabelecendo novas normas para as pesquisas com animais, sem que qualquer um deles tenha sido aprovado, até o presente momento.

GOLDIM, J.R. & RAYMUNDO, M.M. Pesquisa em Saúde e os Direitos dos Animais. 2 ed. Porto Alegre: HCPA, 1997.

Legislação brasileira

- a. Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934: proteção aos animais (em vigor)
- b. Lei nº 6638, de 8 de maio de 1979: vivissecação de animais (em vigor)
- c. Substitutivo do COBEA ao Projeto de Lei nº 1.153/95: animais para atividades de ensino e pesquisa

Decreto nº 24.645 de 10 de Julho de 1934

O chefe do Governo Provisório da República dos Estados Unidos do Brasil, usando das atribuições que lhe confere o art. 1º do dec. n.º 19.398, de 11 de novembro de 1930.

Decreta:

Art. 1º. Todos os animais existentes no País são tutelados ao Estado.

Art. 2º. Aquele que, em lugar público ou privado, aplicar ou fazer aplicar maus tratos aos animais, incorrerá em multa de 20\$000 a 50\$000 e na pena de prisão celular de 2 a 15 dias, quer o delinqüente seja ou não o respectivo proprietário, sem prejuízo da ação civil que possa caber.

Par. 1º. A critério da autoridade que verificar a infração da presente lei, será imposto qualquer das penalidades acima estatuídas, ou ambas.

Par. 2º. A pena de aplicar dependerá da gravidade do delito, a juízo da autoridade.

Par. 3º. Os animais serão assistidos em juízo pelos representantes do Ministério Público, seus substitutos legais e pelos membros das sociedades protetoras de animais.

Art. 3º. Consideram-se maus tratos:

1. Praticar ato de abuso ou crueldade em qualquer animal;
2. Manter animais em lugares anti-higiênicos ou que lhes impeçam a respiração, o movimento ou o descanso, ou os privem de ar ou luz;
3. Obrigar os animais a trabalhos excessivos ou superiores as suas forças e a todo o ato que resulte em sofrimento para deles obter esforços que, razoavelmente, não se lhes possam exigir senão com castigo;
4. Golpear, ferir ou mutilar voluntariamente, qualquer órgão ou tecido de economia, exceto a castração, só para animais domésticos, ou operações outras praticadas em benefício exclusivo do animal e as exigidas para defesa do homem, ou no interesse da ciência;
5. Abandonar animal doente, ferido, extenuado ou mutilado, bem como deixar de ministrar-lhes tudo o que humanitariamente se lhe possa prover, inclusive assistência veterinária;
6. Não dar morte rápida, livre de sofrimentos prolongados, a todo animal cujo extermínio seja necessário para consumo ou não;
7. Abater para o consumo ou fazer trabalhar os animais em período adiantado de gestação;

8. Atrelar, no mesmo veículo, instrumento agrícola ou industrial, bovinos com eqüinos, com muares ou com asininos, sendo somente permitido o trabalho em conjunto a animais da mesma espécie;
9. Atrelar animal a veículos sem os apetrechos indispensáveis como seja balancins, ganchos e lanças ou com arreios incompletos, incômodos ou em mau estado, ou com acréscimo de acessórios que os molestem ou lhes perturbem o funcionamento do organismo;
10. Utilizar, em serviço, animal cego, ferido, enfermo, fraco, extenuado ou desferrado, sendo que este último caso somente se aplica à localidade com ruas calçadas;
11. Açoitar, golpear ou castigar por qualquer forma a um animal caído sob o veículo ou com ele, devendo o condutor desprendê-lo do tiro para levantar-se;
12. Descer ladeiras com veículos de tração animal sem utilização das respectivas travas, cujo uso é obrigatório;
13. Deixar de revestir com couro ou material com idêntica qualidade as correntes atreladas aos animais de tiro;
14. Conduzir veículo de tração animal, dirigido por condutor sentado, sem que o mesmo tenha boléia e arreios apropriados, com tesouras, pontas de guias e retranca;
15. Prender animais atrás dos veículos ou atados às caudas de outros;
16. Fazer viajar um animal a pé, mais de 10 quilômetros, sem lhe dar descanso, ou trabalhar mais de seis horas contínuas sem lhe dar água e alimento;
17. Conservar animais embarcados por mais de 12 horas, sem água e alimento, devendo as empresas de transporte providenciar, sobre as necessárias modificações no seu material, dentro de 12 meses a partir da publicação desta lei;
18. Conduzir animais, por qualquer meio de locomoção, colocados de cabeça para baixo, de mãos ou pés atados, ou de qualquer outro modo que lhes produza sofrimento;
19. Transportar animais em cestos, gaiolas ou veículos sem as proporções necessárias ao seu tamanho e número de cabeças, e sem que o meio de condução em que estão encerrados esteja protegido por uma rede metálica ou idêntica que impeça a saída de qualquer membro do animal;
20. Encerrar em curral ou outros lugares, animais em número tal que não lhes seja possível mover-se livremente, ou deixá-los sem água e alimentos mais de 12 horas;
21. Deixar sem ordenhar as vacas por mais de 24 horas, quando utilizadas na exploração do leite;
22. Ter animais encerrados juntamente com outros que os aterrorizem ou molestem;
23. Ter animais destinados à venda em locais que não reúnam as condições de higiene e comodidades relativas;
24. Expor, nos mercados e outros locais de venda, por mais de 12 horas, aves em gaiolas, sem que se faça nestas a devida limpeza e renovação de água e alimentos;
25. Engordar aves mecanicamente;
26. Depelar ou depenar animais vivos ou entregá-los vivos a alimentação de outros;
27. Ministrare ensino a animais com maus tratos físicos;
28. Exercitar tiro ao alvo sobre patos ou qualquer animal selvagem, exceto sobre os pombos, nas sociedades de caça, inscritos no Serviço de Caça e Pesca;
29. Realizar, ou promover lutas entre animais da mesma espécie ou de espécie diferente, tourada e simulacros de touradas, ainda mesmo que em lugar privado;
30. Arrojar aves e outros animais nas casas de espetáculo e exhibi-los, para tirar sortes ou realizar acrobacias;
31. Transportar, negociar ou caçar, em qualquer época do ano, aves insetívoras, pássaros canoros, beija-flores e outras aves de pequeno porte, exceção feita das autorizações para fins científicos, consignados em lei anterior;

Art. 4º. Só é permitida atração animal de veículo ou instrumento agrícola e industrial, por animais de espécies eqüina, bovina, muar e asinina.

Art. 5º. Nos veículos de duas rodas de tração animal é obrigatório uso de escora ou suporte fixado por dobradiça, tanto na parte dianteira como na traseira, de forma a evitar que, quando o veículo esteja parado, o peso da carga

recaia sobre o animal e também para os efeitos em sentido contrário, quando o peso da carga for na parte traseira de veículo.

Art. 6º. Nas cidades e povoados os veículos à tração animal terão tímpano ou outros sinais de alarme, acionáveis pelo condutor, sendo proibido o uso de guizos, chocalhos ou campainhas ligadas aos arreios ou aos veículos para produzirem ruído constante.

Art. 7º. A carga, por veículo, para um determinado número de animais deverá ser fixada pelas municipalidades, obedecendo sempre ao estado das vias públicas, declives das mesmas, peso e espécie de veículo, fazendo constar nas respectivas licenças a tara e a carga útil.

Art. 8º. Considerando-se castigos violentos, sujeitos ao dobro das pessoas cominadas na presente lei, castigar o animal na cabeça, baixo-ventre ou pernas.

Art. 9º. Tornar-se-á efetiva a penalidade, em qualquer caso, sem prejuízo de fazer cessar o mau trato à custa dos declarados responsáveis.

Art. 10º. São solidariamente passíveis de multa e prisão os proprietários de animais e os que tenham sob sua guarda ou uso, desde que consistam a seus prepostos atos não permitidos na presente lei.

Art. 11º. Em qualquer caso será legítima, para garantia da cobrança da multa ou multas, a apreensão do animal ou do veículo, ou de ambos.

Art. 12º. As penas pecuniárias serão aplicadas pela polícia ou autoridades judiciárias.

Art. 13º. As penas desta lei aplicar-se-ão a todos que infringirem maus tratos ou eliminar um animal, sem provar que foi por este acometido ou que se trata de animal feroz ou atacado de moléstia perigosa.

Art. 14º. A autoridade que tomar conhecimento de qualquer infração desta lei poderá ordenar o confisco do animal ou animais nos casos de reincidência.

Par. 1º. O animal apreendido, se próprio para o consumo, será entregue a instituições de beneficência, e, em caso contrário, será promovida a sua venda em benefício de instituições de assistência social.

Par. 2º. Se o animal apreendido estiver impróprio para o consumo, e estiver em condições de não mais prestar serviços, será abatido.

Art. 15º. Em todos os casos de reincidência ou quando os maus tratos venham a determinar a morte do animal, ou produzir mutilações de qualquer de seus órgãos ou membros, tanto a pena de multa como a de prisão serão aplicadas em dobro.

Art. 16º. As autoridades federais, estaduais e municipais prestarão aos membros das sociedades protetoras de animais a cooperação necessária para fazer cumprir a presente lei.

Art. 17º. A palavra animal, da presente lei, compreende todo ser irracional, quadrúpede ou bípede, doméstico ou selvagem, exceto os daninhos.

Art. 18º. A presente lei entrará em vigor imediatamente, independente de regulamentação.

Art. 19º. Revogam-se as disposições em contrário.

Lei n.º 6.638, de 08 de Maio de 1979.

Estabelece normas para a prática Didático-Científico da vivisseção de animais e determina outras providências.

Art. 1º - Fica permitida, em todo o território nacional, a vivisseção de animais, nos termos desta Lei.

Art. 2º - Os biotérios e os centros de experiências e demonstrações com animais vivos deverão ser registrados em Órgão competente e por ele autorizados a funcionar.

Art. 3º. - A vivisseção não será permitida:

1. Sem o emprego de anestesia;
2. Em centros de pesquisas e estudos não registrados em órgão competente;
3. Sem a supervisão de técnico especializado;
4. Com animais que não tenham permanecido mais de quinze dias em biotérios legalmente autorizados;
5. Em estabelecimento de ensino de primeiro e segundo grau e em quaisquer locais freqüentados por menores de idade.

Art. 4º. - O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos das experiências que constituem a pesquisa ou os programas de aprendizado cirúrgico quando, durante ou após a vivissecação, receber cuidados especiais.

1. Quando houver indicação, o animal poderá ser sacrificado sob estrita obediência às prescrições científicas.

2. Caso não sejam sacrificados, os animais utilizados em experiência ou demonstrações somente poderão sair do biotério trinta dias após a intervenção, desde que destinados a pessoas ou entidades idôneas que por eles queiram responsabilizar-se.

Art. 5º. - Os infratores estão sujeitos:

1. Às penalidades cominadas no artigo 64, *caput*, do Decreto-Lei nº 3.688 de 03.10.1941, no caso de ser a primeira infração;

2. À interdição e cancelamento do registro do biotério ou do centro de pesquisa, no caso de reincidência.

Art. 6º. - O poder Executivo, no prazo de noventa dias, regulamentará a presente Lei, especificando:

1. O órgão competente para o registro e a expedição de autorização dos biotérios e centros de experiências e demonstração com animais vivos;

2. As condições gerais exigíveis para o registro e o funcionamento dos biotérios; III - Órgão e autoridades competentes para a fiscalização dos biotérios e centros mencionados no inciso I.

Art. 7º. - Esta Lei entrará em vigor na data publicada.

Art. 8º. - Revogam-se as disposições em contrário.

Assinado: João Figueiredo, Petrônio Portella, E. Portella e Ernani Guilherme Fernandes da Motta

Substitutivo ao Projeto de Lei n.º 1.153/95

a. Decreto nº 24.645 de 10 de julho de 1934: proteção aos animais

b. Lei nº 6638 de 8 de maio de 1979: vivissecação de animais

c. **Substitutivo ao Projeto de Lei nº 1.153/95:** dispõe sobre a criação e o uso de animais para atividades de ensino e pesquisa.

Esta versão (segundo Boletim Informativo nº1 de julho 1996 do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal, Cobeia), do Anteprojeto de Lei sobre o uso de animais de laboratório no ensino e na pesquisa, foi encaminhada ao Ministério de Ciência e Tecnologia, visando a sua tramitação no Congresso Nacional, através do Poder Executivo.

O Congresso Nacional Decreta

CAPÍTULO I

Das Condições de Criação e Uso de Animais para Ensino e Pesquisa Científica

Art. 1º. - Esta Lei, com fundamento nos artigos 61§1, II, alínea e, 218, §1 e 225, § 1º., VII da Constituição da República Federativa do Brasil, estabelece critérios para a criação e o uso de animais em atividades de ensino e pesquisa, de forma a assegurar-lhes tratamento humanitário.

Art. 2º. - A criação e utilização de animais para ensino e pesquisa científica, em todo o território nacional, é regulada nos termos e condições estabelecidos nesta Lei e nos regulamentos dela decorrentes.

§ 1º. - A utilização de animais em atividades de ensino fica restrita a estabelecimentos de ensino superior ou técnico de 2º grau.

§ 2º. - Para os fins desta Lei, são consideradas como atividades de pesquisa todas aquelas relacionadas com ciência básica, ciência aplicada, desenvolvimento tecnológico, produção e controle da qualidade de drogas, medicamentos, alimentos, imunobiológicos, instrumentos, ou quaisquer outros testados em animais, conforme definido em regulamento próprio.

§ 3º. - Não são consideradas como atividades de pesquisa as práticas zootécnicas relacionadas à agropecuária.

Art. 3º. - O disposto nesta Lei aplica-se aos animais das espécies classificadas como *Filo Chordata*, *Subfilo Vertebrata*.

Art. 4º. - Para as finalidades desta lei entende-se por:

I. *Filo Chordata* - animais que possuem como características exclusivas um eixo dorsal de sustentação, um sistema respiratório derivado da faringe e um sistema nervoso tubular oco e dorsal. Apresentam ainda um coração localizado ventralmente em relação ao tubo digestivo e uma região pós-anal, sem vísceras, a cauda.

II. *Subfilo Vertebrata* - animais que possuem notocorda na fase embrionária, substituída gradativamente pela coluna vertebral cartilaginosa ou óssea. Possuem encéfalo e esqueleto interno cartilaginoso ou ósseo.

III. Ciência básica - domínio do saber científico cujas prioridades residem na expansão das fronteiras do conhecimento, independente de suas aplicações.

IV. Ciência aplicada - domínio do saber científico cujas prioridades residem no atendimento das necessidades impostas pelo desenvolvimento social, econômico e tecnológico.

V. Imunobiológicos - derivados biológicos destinados a imunizações ou reações imunitárias.

VI. Experimentos - procedimentos efetuados em animais vivos visando elucidar fenômenos fisiológicos ou patológicos, obedecendo a técnicas específicas e preestabelecidas.

VII. Eutanásia - prática que acarreta a morte do animal, sem provocar dor ou ansiedade, visando evitar sofrimento, obedecendo a técnicas específicas e preestabelecidas.

VIII. Centro de criação - local onde são mantidos os reprodutores das diversas espécies animais, dentro de padrões genéticos e sanitários preestabelecidos, com a finalidade de pesquisa e/ou ensino.

IX. Biotério - local dotado de características próprias onde são criados e/ou mantidos animais de qualquer espécie, eleita como modelo, destinados ao campo da ciência e tecnologia voltadas à saúde humana e animal.

X. Laboratório de experimentação animal - local provido de condições ambientais adequadas bem como de equipamentos e materiais indispensáveis à realização de experimentos em animais, que não podem ser deslocados para um biotério de experimentação.

Art. 5º. - A criação ou a utilização de animais para ensino e/ou pesquisa ficam restritas, exclusivamente, às instituições credenciadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Art. 6º. - Qualquer instituição científica ou empresa legalmente estabelecida em território nacional que crie ou utilize animais para ensino ou pesquisa deverá requerer credenciamento, junto ao CONCEA, para uso de animais, nas seguintes condições:

I. Satisfazer, no que couber, as exigências estabelecidas pelo CONCEA nos termos desta Lei.

II. Criar Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

§ 1º. - A critério da instituição e mediante autorização do CONCEA é admitida a criação de mais de uma CEUA por instituição.

§ 2º. - Quando se configurar a hipótese prevista no parágrafo anterior, cada CEUA definirá os laboratórios de experimentação animal, biotérios e/ou centros de criação sob seu controle.

Art. 7º. - O animal só poderá ser submetido às intervenções recomendadas nos protocolos dos experimentos que constitui a pesquisa ou programa de aprendizado, quando durante e após o experimento receber cuidados especiais, conforme estabelecido pelo CONCEA.

§ 1º. - Encerrado o experimento, ou verificado, em qualquer fase do mesmo, sofrimento intenso do animal, este será submetido à eutanásia, sob estrita obediência às prescrições pertinentes a cada espécie, preferencialmente com aplicação de dose letal de substância depressora do sistema nervoso central.

§ 2º. - Excepcionalmente, os animais utilizados em experiências ou demonstrações não serão submetidos à eutanásia e poderão sair do biotério após a intervenção, ouvida a respectiva CEUA quanto aos critérios de segurança, desde que destinados a pessoas idôneas, ou entidades protetoras de animais devidamente legalizadas, que por eles queiram responsabilizar-se.

§ 3º. - Sempre que possível as práticas de ensino deverão ser fotografadas, filmadas ou gravadas, de forma a permitir sua reprodução para ilustração de práticas futuras, evitando-se a repetição desnecessária de procedimentos didáticos com animais.

§ 4º. - Os projetos de pesquisa devem demonstrar a provável relevância de seus resultados para o progresso da ciência e indicar a inexistência de métodos alternativos capazes de levar ao mesmo resultado.

§ 5º. - O número de animais a ser utilizado para a execução de um projeto e o tempo de duração de cada experimento será o mínimo indispensável para produzir o resultado conclusivo, poupando-se, ao máximo, o animal de sofrimento.

§ 6º. - Experimentos que possam causar dor ou angústia desenvolver-se-ão sob sedação, analgesia, ou anestesia adequadas.

§ 7º. - É vedado o uso de bloqueadores neuromusculares em substituição a substâncias sedativas, analgésicas ou anestésicas, ou de relaxantes musculares em substituição a substâncias anestésicas.

§ 8º. - É vedada a reutilização do mesmo animal depois de alcançado o objetivo principal do projeto de pesquisa.

§ 9º. - Num programa de ensino, vários procedimentos poderão ser realizados num mesmo animal, desde que todos sejam executados durante a vigência de um único período anestésico e que o animal seja sacrificado antes de recobrar a consciência.

§ 10º. - Para a realização de trabalhos de criação e experimentação de animais em sistemas fechados, serão consideradas as condições e normas de segurança recomendadas pela Organização Mundial da Saúde e/ou Organização Pan-Americana da Saúde.

Art. 8º. - O CONCEA, levando em conta a relação entre o nível de sofrimento para o animal e os resultados práticos que se espera obter, poderá restringir ou proibir experimentos que importem em elevado grau de agressão contra os animais.

Art. 9º. - Todo projeto de pesquisa científica ou atividade de ensino serão supervisionados por profissional de nível superior, graduado, ou pós-graduado na área biomédica, vinculado à entidade de ensino ou pesquisa credenciada pelo CONCEA.

CAPÍTULO II

Do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA)

Art. 10º. - Fica criado, na estrutura básica do Ministério da Ciência e Tecnologia, o Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Art. 11º. - Compete ao CONCEA:

- I. Expedir e fazer cumprir normas relativas a utilização humanitária de animais com finalidade de ensino e pesquisa científica;
- II. Licenciatar as atividades destinadas ao ensino e pesquisa científica tratadas nesta Lei;
- III. Monitorar e avaliar a introdução de técnicas alternativas que substituam a utilização de animais em ensino e pesquisa;
- IV. Estabelecer e rever, periodicamente, as normas para o uso e cuidados com animais para ensino e pesquisa, em consonância com as convenções internacionais das quais o Brasil seja signatário;
- V. Estabelecer e rever, periodicamente, normas técnicas para instalação e funcionamento de centros de criação, de biotérios e de laboratórios de experimentação animal, bem como sobre as condições de trabalho em tais instalações;
- VI. Estabelecer e rever, periodicamente, normas para credenciamento de instituições que criem ou utilizem animais para ensino e pesquisa;
- VII. Manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino ou pesquisa realizados, ou em andamento no país, assim como dos pesquisadores, a partir de informações remetidas pelas CEUAS;
- VIII. Apreçar e decidir recursos interpostos contra decisões de órgãos que lhe sejam subordinados;
- IX. Elaborar e submeter ao ministro da Ciência e Tecnologia, para aprovação, o seu regimento interno;
- X. Assessorar o Poder Executivo naquilo que diga respeito às atividades de ensino e pesquisa tratadas nesta lei.

Art. 12º. - O CONCEA é constituído por: I. Plenário; II. Câmaras Permanentes e Temporárias; III. Secretaria Executiva.

§ 1º. - São Câmaras Permanentes do CONCEA a de Ética, a de Legislação e Normas e a Técnica.

§ 2º. - A Secretaria Executiva é responsável pelo expediente do CONCEA e terá o apoio da administração do Ministério da Ciência e Tecnologia, conforme determinação ministerial.

§ 3º. - O CONCEA poderá valer-se de consultores *ad-hoc* de reconhecida competência técnica e científica, para instruir quaisquer processos de sua pauta de trabalhos.

Art. 13º. - O CONCEA é integrado por:

- I. O Ministro de Estado da Ciência e Tecnologia, que será seu Presidente;
- II. Dois representantes do Ministério da Ciência e Tecnologia;
- III. Um representante do Ministério da Educação;
- IV. Um representante do Ministério do Meio Ambiente, dos Recursos Hídricos e da Amazônia Legal;
- V. Um representante do Ministério da Saúde;
- VI. Um representante do Ministério da Agricultura;
- VII. Um representante da Academia Brasileira de Ciências;
- VIII. Um representante da Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência;
- IX. Um representante da Federação das Sociedades de Biologia Experimental;
- X. Um representante do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal;
- XI. Dois representantes das Sociedades Protetoras de Animais legalmente estabelecidas no país;
- XII. Um representante da Federação Nacional da Indústria Farmacêutica.

§ 1º. - É de quatro anos o mandato dos membros relacionados nos incisos VII a XII.

§ 2º. - Os membros referidos nos incisos II a XII serão indicados pelos seus órgãos específicos, juntamente com seus respectivos suplentes, e designados por ato do Ministério de Estado da Ciência e Tecnologia.

§ 3º. - Os membros referidos nos incisos II, III, IV, V, VII, VIII e IX devem ser profissionais ativos na área das ciências biológicas.

§ 4º. - Os membros referidos nos incisos VI e X deverão ser, obrigatoriamente, médicos veterinários.

§ 5º. - O mandato de conselheiro é gratuito e se constitui em relevante serviço público, sendo prioritário sobre qualquer outra atividade.

Art. 14º. - O CONCEA, mediante Resolução, determinará às agências de amparo ou fomento à pesquisa científica o não-financiamento de projetos:

- I. realizados em instituições por ele não credenciadas;
- II. realizados sem a aprovação da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA), mencionada no artigo 6º. desta Lei;
- III. cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 15º. - O CONCEA, através de Resolução, recomendará aos periódicos científicos nacionais que não publiquem os resultados de projetos:

- I. realizados em instituições por ele não credenciadas;
- II. realizados sem a aprovação da CEUA;
- III. cuja realização tenha sido suspensa pela CEUA.

Art. 16º. - As organizações públicas e privadas, nacionais, estrangeiras ou internacionais, financiadoras ou patrocinadoras de atividades previstas nesta Lei, deverão certificar-se da idoneidade técnico-científica e da plena adesão dos entes financiados, patrocinados ou contratados às normas e mecanismos de salvaguardas previstos nesta Lei, sob pena de tornarem-se co-responsáveis pelos eventuais efeitos advindos de seu descumprimento.

CAPÍTULO III

Das Comissões de Ética no Uso de Animais (CEUA)

Art. 17º. - É condição indispensável para o licenciamento das atividades de ensino e pesquisa com animais, a constituição prévia de Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA).

Art. 18º. - As Comissões de Ética no Uso de Animais são constituídas por:

- I. um médico veterinário, no mínimo;
- II. um representante de sociedades protetoras de animais legalmente estabelecidas no país;
- III. composição majoritária de docentes e pesquisadores na área específica.

Parágrafo único. A falta do representante referido no inciso II não impede a constituição ou o funcionamento da CEUA.

Art. 19º. - Compete à Comissão de Ética no Uso de Animais:

- I. cumprir e fazer cumprir, nos limites de suas atribuições, o disposto nesta Lei e nas demais aplicáveis à utilização de animais para ensino ou pesquisa, especialmente nas Resoluções do CONCEA;
- II. examinar previamente os procedimentos de ensino ou pesquisa a serem realizados na instituição às quais estejam vinculadas para determinar sua compatibilidade com a legislação aplicável;
- III. manter cadastro atualizado dos procedimentos de ensino ou pesquisa realizados, ou em andamento, na instituição, enviando cópia ao CONCEA;
- IV. manter cadastro dos pesquisadores que realizam procedimentos de ensino ou pesquisa, enviando cópia ao CONCEA;
- V. expedir, no âmbito de suas atribuições, certificados que se fizerem necessários junto a órgãos de financiamento de pesquisa, periódicos científicos ou outros;

VI. notificar imediatamente ao CONCEA e às autoridades sanitárias a ocorrência de qualquer acidente, fornecendo informações que permitam ações saneadoras.

§ 1º. - Constatado qualquer procedimento fora dos limites desta Lei, na execução de uma atividade de ensino ou pesquisa, a respectiva CEUA determinará a paralisação de sua execução, até que a irregularidade seja sanada, sem prejuízo de outras medidas cabíveis. A omissão da CEUA acarretará sanções a instituição, nos termos dos artigos 20, 21 e 22.

§ 2º. - Das decisões proferidas pela CEUA cabe recurso, sem efeito suspensivo, ao CONCEA.

§ 3º. - Os membros da CEUA responderão pelos prejuízos que, por dolo, causarem às pesquisas em andamento.

§ 4º. - Os membros da CEUA estão obrigados a resguardar o segredo industrial, desde que o mesmo seja compatível com a presente Lei, sob pena e responsabilidade.

CAPÍTULO IV

Das Penalidades

Art. 20º. - As instituições que executem atividades reguladas por esta Lei estão sujeitas, em caso de transgressão ao disposto nesta Lei e em seus regulamentos, às penalidades administrativas de:

- I. Advertência;
- II. Multa diária;
- III. Interdição temporária;
- IV. Suspensão de financiamentos provenientes de fontes oficiais de crédito e fomento científico;
- V. Interdição definitiva.

Parágrafo único - A interdição por prazo superior a 30 dias somente poderá ser determinada por ato do Ministro de Estado de Ciência e Tecnologia.

Art. 21º. - Qualquer pessoa que execute, de forma indevida, atividades reguladas por esta Lei, ou participe de procedimentos não autorizados pelo CONCEA, será passível das seguintes penalidades administrativas:

- I. Advertência;
- II. Multa diária;
- III. Suspensão temporária;
- IV. Interdição definitiva para o exercício da atividade regulada nesta Lei.

Art. 22º. - As sanções disciplinares previstas nos artigos 20 e 21 serão aplicadas pelo CONCEA, sem prejuízo da responsabilidade penal cabível, em especial aquela prevista no artigo 31 do Código de Contravenções Penais, bem como o do artigo 64, *caput*, da Lei nº 3.688, de 3 de outubro de 1941.

CAPÍTULO V

Das Disposições Gerais e Transitórias

Art. 23º. - A fiscalização das atividades reguladas por esta lei fica a cargo dos órgãos Competentes dos Ministérios da Agricultura, Saúde e do Meio Ambiente, Recursos Hídricos e Amazônia Legal.

Art. 24º. - Qualquer pessoa que, por ação ou omissão, interferir nos centros de criação, biotérios e/ou laboratórios de experimentação animal de forma a colocar em risco a saúde pública e/ou o meio ambiente estará sujeita à responsabilidade penal prevista no Art. 22 desta lei.

Art 25º. - As instituições que criem ou utilizem animais para ensino ou pesquisa existentes no país antes da data de vigência desta Lei deverão adotar as seguintes providências:

I. criação da Comissão de Ética no Uso de Animais no prazo máximo de 90 (noventa) dias após a regulamentação referida no Art. 27;

II. compatibilização total de suas instalações físicas no prazo máximo de 5 (cinco) anos, a partir da entrada em vigor das normas técnicas estabelecidas pelo CONCEA com base no Art. 11º., inciso V, desta lei.

Art 26º. - Os recursos orçamentários necessários à criação e ao funcionamento do CONCEA serão previstos na dotação do Ministério da Ciência e Tecnologia.

Art. 27º. - Esta Lei será regulamentada no prazo de 180 (cento e oitenta) dias.

Art. 28º. - Esta lei entrará em vigor na data de sua publicação.

Art. 29º. - Revogam-se as disposições em contrário, e, em especial, a Lei nº 6.638, de 8 de maio de 1979.

Formato: 21 x 28 cm

Tipologias: American garamond BT
Bergell LET
EnviroD

Papel: Pólen Bold 70 g/m² (miolo)
Cartão Supremo 250 g/m² (capa)

Fotolitos: Laser vegetal (miolo)

Engenho e Arte Editoração Gráfica Ltda. (capa)

Impressão e acabamento: Millennium Print
Rio de Janeiro, abril de 2000.

Não encontrando nossos títulos em livrarias,
contactar a EDITORA FIOCRUZ:
Rua Leopoldo Bulhões, 1.480, térreo - Manguinhos.
Rio de Janeiro, RJ. CEP: 21041-210
Tel.: (21) 598-2701/598-2702.
Telfax: (21) 598-2509.
E-mail: editora@fiocruz.br