



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE FEIRA DE  
SANTANA**



**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA**

**MÁRCIA MARIA NOYA RABELO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM  
IMUNOGLOBULINA HUMANA EM MODELO MURINO DE  
CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

Feira de Santana, BA

Março / 2011

**MÁRCIA MARIA NOYA RABELO**

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA TERAPIA COM  
IMUNOGLOBULINA HUMANA EM MODELO MURINO DE  
CARDIOMIOPATIA CHAGÁSICA CRÔNICA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Estadual de Feira de Santana como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos  
Co-orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milena Botelho Pereira Soares

Feira de Santana, BA  
Março / 2011

À Bianca e Diego: razões de meu existir.

## AGRADECIMENTOS

---

À minha família, por sempre estar ao meu lado, por ter me estimulado a nunca desistir do meu sonho, pelo carinho, pela paciência que sempre tiveram comigo e pelos beijos diários.

Ao meu orientador e novo amigo Prof. Dr. Ricardo Ribeiro dos Santos, responsável direto pela missão que agora se cumpre, por ter acreditado, pela paciência, pelas palavras de carinho, pelas horas ininterruptas de explicações e, principalmente, por ter depositado em meu trabalho a certeza do sucesso.

À minha co-orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Milena Botelho Pereira Soares, pela dedicação e confiança, pelas dicas e correções, pela ajuda nos momentos de desespero, por todo apoio dado ao longo desta temporada.

À minha amiga e colega desta aventura Dr<sup>a</sup>. Ticiania Xavier Ferreira, por toda a disponibilidade, pela companhia nessa etapa, pelas palavras de apoio, pela certeza de continuarmos seguindo em frente na chamada “medicina translacional”.

À Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Lima Leite e ao HEMOPE, por toda a colaboração para realização deste trabalho.

Aos meus pais, por estarem sempre presentes, e principalmente por propiciarem tudo que sou. Às minhas irmãs, Ana Paula, Adriana e Liane, as quais admiro.

À minha nova família, Gel e Suzi, por todo o amor e carinho.

Aos amigos Murilo e Neto, por serem tão prestativos na realização das diversas etapas no laboratório.

Aos amigos do CBTC, que me ajudaram em todas as ocasiões e, sobretudo pela amabilidade.

*“Da semente germina uma raiz, depois um broto; do broto, as folhas embrionadas; das folhas, o caule; ao redor do caule, os ramos; no topo, a flor... Não podemos dizer que a semente ou o solo causam o crescimento. Podemos dizer que as potencialidades para o crescimento encontram-se no interior da semente, no misterioso princípio vital que, quando convenientemente alimentado, assume determinadas formas.”*

M.C. Richards, *Centering in Pottery  
Poetry and the Person*

## RESUMO

---

### **Avaliação dos efeitos da terapia com imunoglobulina humana em modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica.**

**INTRODUÇÃO:** A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é uma das mais importantes causas de insuficiência cardíaca na América. Terapias alternativas vêm sendo investigadas como possíveis opções terapêuticas para pacientes portadores desta doença. Neste estudo foram avaliados os efeitos da terapia com imunoglobulina humana em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica.

**MÉTODOS:** Camundongos C57BL/6 foram infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* e, após oito meses de infecção, foram tratados com imunoglobulina ou com albumina humanas (controle). Antes e após 2 meses do tratamento, os animais chagásicos e controles normais foram submetidos à avaliação cardíaca, incluindo eletrocardiograma, ecocardiograma e teste ergométrico. Os grupos tratados com imunoglobulina e albumina receberam, respectivamente, 1 mg/Kg/dia de imunoglobulina humana ou albumina, via intraperitoneal, por cinco dias consecutivos. Todos os animais foram sacrificados sob anestesia após 2 meses de tratamento, para análise histopatológica do coração.

**RESULTADOS:** Não foi observada uma melhora da função cardiovascular no grupo tratado com imunoglobulina quando comparado ao grupo tratado com albumina. Houve um aumento do número de animais com bloqueio atrioventricular total no grupo imunoglobulina. No entanto, secções de corações de camundongos do grupo imunoglobulina apresentaram uma redução significativa do número de células inflamatórias ( $p < 0,01$ ) e da área de fibrose ( $p < 0,001$ ) em comparação com animais chagásicos tratados com albumina, sendo que nos animais tratados com imunoglobulina foi evidenciada a presença de arterite acentuada, com depósito de imunocomplexos na camada íntima arteriolar. As concentrações de 12 citocinas séricas foram aumentadas no grupo tratado com imunoglobulina em relação aos demais grupos (não infectados e tratados com albumina). Quando avaliada a produção, em extrato de coração, de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-10, não foram observadas diferenças entre os grupos tratados com imunoglobulina e albumina.

**CONCLUSÃO:** Deste modo, concluímos que a terapia com imunoglobulina humana não demonstrou eficácia anti-inflamatória nem induziu a melhora da função cardíaca no modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica.

**PALAVRAS-CHAVE:** cardiomiopatia chagásica crônica, imunoglobulina humana, modelo experimental.

## ABSTRACT

---

### **Evaluation of the therapeutic effects of human immunoglobulin in murine model of chronic chagasic cardiomyopathy.**

**INTRODUCTION:** Chagas disease, caused by the protozoan *Trypanosoma cruzi*, is one of the most important causes of heart failure in America. Alternative therapies have been investigated as potential therapeutic options for patients with this disease. This study evaluated the effects of therapy with human immunoglobulin in an experimental model of chronic chagasic cardiomyopathy.

**METHODS:** C57BL/6 mice were infected with 1000 trypomastigotes of the Colombian strain of *T. cruzi*, and after eight months of infection were treated with intravenous human immunoglobulin or albumin (control). Before and after 2 months of treatment, infected animals and normal controls underwent cardiac evaluation including electrocardiogram, echocardiography and treadmill test. The immunoglobulin and albumin groups were treated, respectively, with 1 mg/kg/day of human immunoglobulin or albumin, intraperitoneally, for five consecutive days. All animals were sacrificed under anesthesia, after 2 months of treatment, for histopathological analysis of the heart.

**RESULTS:** No improvement was observed in cardiovascular function in animals treated with immunoglobulin compared to animals treated with albumin. There was an increasing in the number of animals with complete atrioventricular block in the immunoglobulin group. However, sections of hearts in immunoglobulin group had a significantly reduced number of inflammatory cells ( $p < 0,01$ ) and area of fibrosis ( $p < 0,001$ ), compared to animals treated with albumin. In animals treated with immunoglobulin, there was evidence of arteritis marked with immune complex deposition in the intima of arterioles. The concentrations of serum cytokines were increased in the group treated with immunoglobulin in comparison to the other groups (uninfected and treated with albumin mice). When considering cytokines production in heart extract, there were no differences observed in production of IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-10 between the groups treated with immunoglobulin and albumin.

**CONCLUSION:** Thus, we concluded that immunoglobulin therapy has neither not shown anti-inflammatory efficacy nor improvement in cardiovascular function in a murine model of chronic chagasic cardiomyopathy.

**KEYWORDS:** chronic chagasic cardiomyopathy, human immunoglobulin, experimental model.

## SUMÁRIO

---

### LISTA DE ABREVIATURAS

### LISTA DE FIGURAS

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
1.1	A doença de Chagas .....	13
1.1.1	Aspectos gerais .....	13
1.1.2	Transmissão .....	16
1.1.3	Fase aguda .....	18
1.1.4	Fase crônica .....	20
1.1.5	Forma indeterminada .....	20
1.1.6	Cardiomiopatia chagásica crônica .....	21
1.1.7	Patogênese .....	22
1.1.8	Imunopatologia da doença de Chagas .....	24
1.1.9	Modelos experimentais murinos de cardiomiopatia chagásica ....	27
1.1.10	Tratamento da cardiomiopatia chagásica crônica .....	29
1.2	Imunoglobulina G humana .....	30
1.2.1	Aspectos gerais .....	30
1.2.2	Utilização clínica em insuficiência cardíaca .....	32
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA .....</b>	<b>35</b>
<b>3</b>	<b>HIPOTÉSE .....</b>	<b>36</b>
<b>4</b>	<b>OBJETIVOS .....</b>	<b>37</b>
4.1	Geral .....	37
4.2	Específicos .....	37
<b>5</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>38</b>
5.1	Desenho do estudo experimental .....	38
5.2	Animais .....	39

5.3	Infecção de camundongos por <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	40
5.4	Imunoglobulina humana e tratamento .....	40
5.5	Avaliação eletrocardiográfica .....	41
5.6	Avaliação funcional por ergometria .....	42
5.7	Avaliação funcional por ecocardiograma transtorácico .....	43
5.8	Avaliações histológica e morfométrica .....	44
5.9	Avaliação por imunofluorescência .....	44
5.10	Avaliação das concentrações das citocinas .....	45
5.11	Análise estatística .....	46
<b>6</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>48</b>
6.1	Caracterização do modelo de cardiomiopatia chagásica crônica.	48
6.1.1	Avaliações eletrocardiográficas .....	48
6.1.2	Avaliações ergométricas e respirométricas .....	52
6.1.3	Avaliações ecocardiográficas .....	54
6.2	Avaliações dos efeitos da terapia com imunoglobulina .....	54
6.2.1	Avaliações da função cardíaca .....	55
6.2.1.1	Resultados eletrocardiográficos .....	55
6.2.1.2	Resultados da avaliação funcional ergométrica e respirométrica	59
6.2.1.3	Resultados ecocardiográficos .....	63
6.2.3	Avaliações histológicas e morfológicas .....	64
6.2.4	Avaliação da produção de citocinas .....	76
<b>7</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>81</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSÕES .....</b>	<b>87</b>
<b>9</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>88</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

---

<b>BAV</b>	Bloqueio átrio-ventricular (atrioventricular block)
<b>BPM</b>	Batimentos por minuto (heart rate per minute)
<b>CBTC</b>	Centro de Biotecnologia e Terapia Celular
<b>CCC</b>	Cardiomiopatia chagásica crônica (chronic chagasic cardiomyopathy)
<b>DAPI</b>	4'-6'-diamidino-2-phenylindole
<b>DC</b>	Débito cardíaco (cardiac output)
<b>DDFVE</b>	Diâmetro diastólico final do ventrículo esquerdo (end-diastolic diameter of left ventricle)
<b>DSFVE</b>	Diâmetro sistólico final do ventrículo esquerdo (end-systolic diameter of left ventricle)
<b>ECG</b>	Eletrocardiograma (electrocardiogram)
<b>GE</b>	Gasto energético (energy expenditure)
<b>FE</b>	Fração de ejeção (ejection fraction)
<b>IC</b>	Insuficiência cardíaca (heart failure)
<b>IVIg</b>	Imunoglobulina humana intravenosa
<b>Ig</b>	Imunoglobulina
<b>NIH</b>	National Institutes of Health
<b>OMS</b>	Organização Mundial de Saúde (World Health Organization)
<b>PBS</b>	Phosphate buffered saline
<b>QTc</b>	Intervalo QT corrigido (corrected QT interval)
<b>QR</b>	Quociente respiratório (respiratory quotient)
<b>SEM</b>	Standard error of the mean
<b><i>T. cruzi</i></b>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	Fator de necrose tumoral- $\alpha$ (tumor necrosis factor- $\alpha$ )
<b>US FDA</b>	United States Food and Drug Administration
<b>VE</b>	Ventrículo esquerdo (left ventricle)
<b>VO<sub>2</sub></b>	Consumo de oxigênio (oxygen consumption)
<b>VCO<sub>2</sub></b>	Consumo de gás carbônico (carbon dioxide consumption)

## LISTA DE FIGURAS

---

Fig. 1	Ciclo evolutivo do <i>T. cruzi</i>	17
Fig. 2	Desenho do estudo	39
Fig. 3	Avaliação da infecção aguda pelo <i>T. cruzi</i> através da análise da parasitemia	48
Fig. 4	Avaliação da frequência cardíaca em animais não infectados e chagásicos crônicos	49
Fig. 5	Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais não infectados e chagásicos crônicos	50
Fig. 6	Traçados eletrocardiográficos	51
Fig. 7	Avaliação de arritmias entre animais não-infectados e chagásicos crônicos	51
Fig. 8	Avaliação dos dados ergométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção)	50
Fig. 9	Avaliação dos dados respirométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos	53
Fig. 10	Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais não-infectados e chagásicos crônicos	54
Fig. 11	Sobrevida dos animais não-infectados e chagásicos crônicos do grupo albumina e grupo imunoglobulina	55
Fig. 12	Avaliação da frequência cardíaca em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	56
Fig. 13	Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina	57
Fig. 14	Traçados eletrocardiográficos de animais chagásicos crônicos	58
Fig. 15	Avaliação de arritmias em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina nas diferentes fases do tratamento	59
Fig. 16	Avaliação dos dados ergométricos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina	60
Fig. 17	Avaliação de $VO_2$ e $VCO_2$ em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	61
Fig. 18	Avaliação de gasto energético e quociente respiratório em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	62

Fig. 19	Avaliação da fração de ejeção mensurada pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	63
Fig. 20	Avaliação do diâmetros sistólico e diastólico final do VE mensurados pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina	64
Fig. 21	Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina	65
Fig. 22	Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina	66
Fig. 23	Avaliação morfométrica de secções de corações de animais não-infectados e chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina	68
Fig. 24	Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina ou imunoglobulina – corte na junção atrioventricular	70
Fig. 25	Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina – plexo neuronal	71
Fig. 26	Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina – plexo neuronal	72
Fig. 27	Histologia de secções de músculo esquelético de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina ou imunoglobulina	73
Fig. 28	Imunofluorescência de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina ou imunoglobulina	74
Fig. 29	Imunofluorescência de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina	75
Fig. 30	Concentrações séricas de IL-1 $\alpha$ (A), IL-1 $\beta$ (B), IL-2 (C), IL-3 (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-9 (G) e IL-10 (H)	77
Fig. 31	Concentrações séricas de IL-12p40 (A), IL-12p70 (B), IL-13 (C), IL-17 (D), IFN $\gamma$ (E), TNF $\alpha$ (F), GM-CSF (G) e G-CSF (H)	78
Fig. 32	Concentrações séricas de KC (A), MCP1 (B), MIP1 $\alpha$ (C), MIP1 $\beta$ (D), Eotaxina (E) RANTES e (F)	79
Fig. 33	Concentrações de IFN $\gamma$ (A), TNF $\alpha$ (B), IL-10 (C) no coração	80

# 1. INTRODUÇÃO

---

## 1.1. Doença de Chagas

### 1.1.1. Aspectos gerais

A doença de Chagas foi descoberta em 1908, no Brasil, pelo pesquisador Carlos Chagas, que descreveu no artigo clássico publicado em 1909, não somente a forma clínica característica da doença, mas também o seu agente causador, o principal mecanismo de transmissão e a inoculação transcutânea do parasito por excrementos de insetos hematófagos infectados (CHAGAS, 1909). O agente causador da doença de Chagas é o protozoário flagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), assim designado em homenagem à Oswaldo Cruz.

A infecção pelo *Trypanosoma cruzi* é uma doença enzoótica, que pode levar à doença humana quando os insetos, vetores triatomíneos, passam ao ciclo doméstico, adaptando-se às habitações dos humanos (PRATA *et al.*, 2001). Acredita-se que o parasito que causa a doença de Chagas esteja presente no continente americano há vários milênios, sendo o ciclo silvestre bem mais antigo que o doméstico. A pesquisa de ácido desoxirribonucléico (DNA, *desoxyribonucleic acid*) do *T. cruzi*, com a reação de polimerase em cadeia em fragmentos de tecidos humanos, obtidos de múmias de 09 mil anos a.C., descobertas no deserto de Atacama, região sul do Peru e norte do Chile, mostrou-se positiva em 40% das amostras analisadas (AUFDERHEIDE *et al.*, 2004). Estudos de paleoepidemiologia mostram que houve uma evolução do parasito a partir de ancestrais comuns com tripanossomos australianos, existentes antes da separação dos continentes há cerca de 230 milhões de anos. Apenas à título de curiosidade, suscitou-se que Charles Darwin contraiu a doença durante sua expedição pela América do Sul.

Mesmo após 100 anos de sua descoberta, a doença de Chagas ainda é uma doença desafiadora. Muitas perguntas sobre a patogenia,

características clínicas, e até mesmo o seu tratamento permanecem sem solução. No entanto, com o aumento da consciência mundial, as iniciativas para controle da disseminação, assim como o aumento das pesquisas sobre os mecanismos fisiopatológicos e terapias específicas, trouxeram progressos em nossa compreensão e na capacidade para lidar com esta complexa doença.

A doença de Chagas tem ampla distribuição na América Central e Latina. A real prevalência da doença não é completamente conhecida, já que os estudos epidemiológicos realizados em todos os países atingidos nem sempre são exatos. Esses estudos, realizados entre 1980 a 1985, estimaram uma prevalência de 16 a 18 milhões de pessoas infectadas, com taxa de infecção anual de 300.000, taxa de mortalidade anual > 50.000 pessoas/ano, 100 milhões de pessoas sob risco de adquirir a doença e, aproximadamente 2 milhões de infectados no Brasil (WHO, 2002). A infecção é endêmica nos seguintes países: Argentina, Brasil, Bolívia, Chile, Colômbia, Costa Rica, Equador, El Salvador, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Uruguai, Paraguai, Peru e Venezuela (OOSRTBURG *et al.*, 2005). Entretanto, estas estimativas de prevalência são em grande parte baseadas em resultados de testes de bancos de sangue. Entre 1960 à 1989 a prevalência de sangue contaminado em algumas cidades da América do Sul variou de 1,7% em São Paulo a 53% em Santa Cruz, Bolívia (SCHUMINS, 1999). Felizmente, as estratégias de controle vetorial reduziram a transmissão da doença em vários países da América Latina e, portanto, sua incidência foi reduzida em mais de 65% no ano de 2000 (WHO, 2002).

Inicialmente, constituindo-se apenas uma doença de zonas rurais de países endêmicos, a doença se espalhou para as cidades com a migração urbana. A imigração também levou a doença de Chagas para regiões não endêmicas e países desenvolvidos, notadamente Austrália, Canadá, Estados Unidos e Europa (SCHMUNIS *et al.*, 2007; DOBARRO *et al.*, 2008). De fato, a maioria dos cerca de 100 mil infectados nos Estados Unidos adquiriram a doença enquanto residiam em regiões endêmicas, embora vetores e animais infectados pelo *T. cruzi* sejam encontrados em muitas regiões, e raros casos

de transmissão autóctone tenham sido documentados (BERN *et al.*, 2007a). Em 2006, nos Estados Unidos, foi iniciado um programa de triagem nos bancos de sangue para a doença de Chagas que detectou mais de 500 doações infectadas pelo *T. cruzi*, ajudando, assim, a prevenir a transmissão por via sanguínea e aumentando o temor pela doença (BERN *et al.*, 2007b). Nas regiões não endêmicas a transfusão de sangue, transplante de órgãos e a transmissão vertical são as vias de transmissão mais frequentes pelo *T. cruzi* (PRATA *et al.*, 2001). Casos de transmissão oral têm sido reportados em estados brasileiros, como Rio Grande do Sul, Santa Catarina e Amazonas. Supõe-se que, quando alimentos contaminados são eventualmente consumidos, grandes quantidades de parasito são transportados para o trato gastrointestinal e podem penetrar na barreira epitelial ativamente ou por pequenas lesões. Após incubação, de cerca de cinco dias, a miocardite aguda é observada, apresentando altas taxas de mortalidade e sintomas clínicos mais graves em indivíduos jovens. No entanto, pouco se sabe sobre a evolução desses pacientes à longo prazo, apesar de poderem desenvolver cardiomiopatia (BARBOSA *et al.*, 2006). Como não existem vacinas ou agentes quimioterápicos eficientes, o controle da doença é feito pelo controle do vetor nas áreas endêmicas, com o uso de inseticidas.

No final dos anos 1980, a insistência dos cientistas latino-americanos, apoiados pela Organização Pan-Americana de Saúde, levou a implementação, financiada pelo Banco Mundial, em julho de 1991, da chamada Iniciativa do Cone Sul, um dos maiores programas de cooperação internacional para controle de uma doença transmissível. O objetivo era interromper a transmissão do *T. cruzi* pela erradicação do *Triatoma infestans*, controlar outras espécies vetoras e interromper a transmissão transfusional. No período de 1991 à 1999, países participantes da Iniciativa do Cone Sul, como Argentina, Bolívia, Brasil, Chile, Paraguai e Uruguai, investiram cerca de 350 milhões de dólares no controle epidemiológico da doença, obtendo uma redução média de 94% da sua incidência. Por outro lado, cerca de US\$ 1.140 milhões foram economizados por estes países em gastos médico-hospitalares e com seguridade social (BARBOSA *et al.*, 2006). O Ministério da

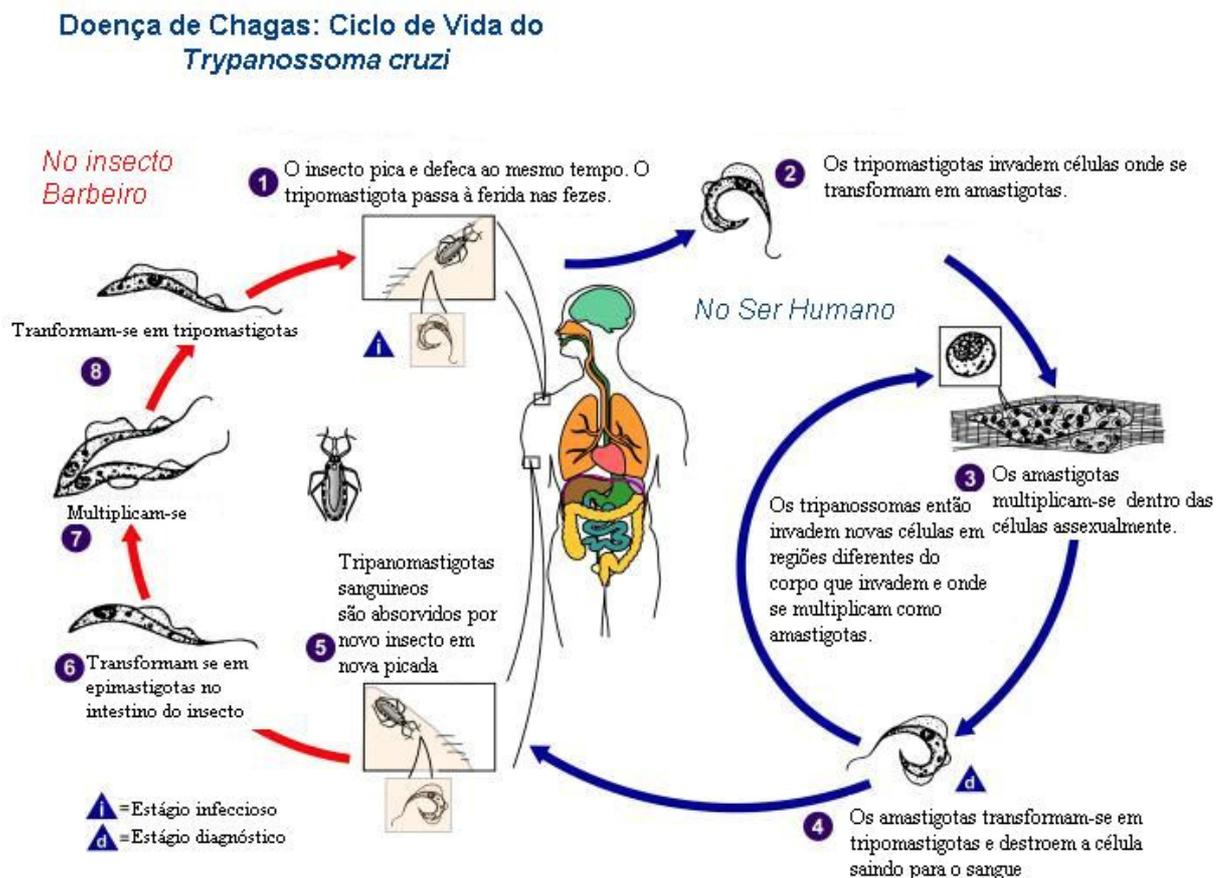
Saúde brasileiro recebeu da Organização Mundial da Saúde, em junho de 2006, o certificado de eliminação de transmissão da doença pelo *Triatoma infestans*. Apesar de ser um fato extremamente importante, não significa a erradicação da doença no território nacional, o que é atestado pelas microepidemias registradas recentemente por contaminação oral.

### **1.1.2. Transmissão**

A maior parte dos casos de infecção em humanos ou outros vertebrados é produzida pelo contato da pele ou mucosas com fezes ou urina de insetos hematófagos. O vetor da infecção é o inseto triatomíneo, também conhecido como “barbeiro”, existindo mais de 130 diferentes espécies com potencial para serem vetores do parasito. Esses insetos medem entre 4 – 45 mm de comprimento. Entretanto, a infecção é transmitida apenas por seis ou sete espécies, sendo a mais comum o *Triatoma infestans*. O inseto, depois de infectado, mantém-se assim por toda a vida podendo transmitir a infecção por vários anos. Além do homem, outros mamíferos podem ser infectados dessa mesma forma, servindo de reservatórios para o parasito. Existem dois ciclos de transmissão do *T. cruzi*, doméstico/peridoméstico e silvestre, sendo determinados pelo tipo de reservatório vertebrado e pelo vetor.

O parasito circula na natureza entre os homens, vetores e reservatórios sob três estágios morfológicos distintos: amastigota, epimastigota e tripomastigota. O vetor se infecta ao se alimentar de sangue contaminado com as formas tripomastigotas metacíclicas. No estômago do inseto, o parasito se transforma em epimastigota. No final do intestino e no reto, as formas epimastigotas se diferenciam em tripomastigotas metacíclicas, a forma infectante do hospedeiro vertebrado. Este tripomastigota tem um flagelo, de 15-20  $\mu\text{m}$ , e um grande cinetoplasto posterior que contém DNA. A infecção humana ocorre após a picada do triatomíneo, quando as formas tripomastigotas, presentes nas fezes do inseto, invadem rapidamente diferentes células do hospedeiro. Os parasitos ficam contidos em estruturas chamadas vacúolos parasitóforos, de onde escapam para o citoplasma e se

diferenciam para as formas amastigotas. Por meio de divisão binária, as formas amastigotas se multiplicam e se transformam novamente em tripomastigotas pouco antes da lise celular. Ocorre então, a liberação de centenas de tripomastigotas, que invadem novas células. Depois de repetidos ciclos, o parasitismo se espalha pelo sangue e tecidos. Os macrófagos têm importante papel na resposta imune inicial ao *T. cruzi*, e também na sua disseminação, carregando o parasito para outros órgãos e tecidos (BARRET *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2005). O ciclo evolutivo encontra-se resumido na figura 1.



**Figura 1: Ciclo evolutivo do *T. cruzi*.**

Fonte: [http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma\\_cruzi](http://pt.wikipedia.org/wiki/Trypanosoma_cruzi)

(Adaptado de: [www.dpd.cdc.gov/dpdx](http://www.dpd.cdc.gov/dpdx))

As regiões endêmicas, normalmente, se localizam nas zonas rurais, onde em geral as condições socioeconômicas são mais precárias. Em razão das dificuldades econômicas, ao longo dos anos, as populações rurais vêm

migrando para as zonas urbanas, diminuindo a população exposta à vetores infectados. No entanto, isso aumenta a possibilidade de transmissão da doença por transfusão de sangue, dado particularmente alarmante em bancos de sangue onde não se testa, como rotina, amostras de sangue por sorologia para doença de Chagas. A transmissão da doença também pode ocorrer por via congênita, embora em menor proporção. No Brasil o risco de infecção por essa via é menor do que 1% do total de casos infectados. Outra possibilidade é a transmissão por transplante de órgãos de indivíduos infectados, principalmente rins, coração, medula óssea e pâncreas, tanto de doadores vivos como cadavéricos (DIAS *et al.*, 2007).

### **1.1.3. Fase aguda**

Há duas fases sucessivas na doença de Chagas: a fase aguda e a fase crônica. A fase aguda é frequentemente assintomática e dura de seis a oito semanas, ocorrendo, com maior frequência, em crianças residentes em áreas endêmicas, geralmente entre 1 e 5 anos de idade. Durante a fase aguda, ocorre uma infecção generalizada pelo *T. cruzi*, sendo possível detectá-lo na circulação. As formas amastigotas podem ser encontradas em células de diferentes tecidos, mais frequentemente na musculatura lisa, estriada esquelética e cardíaca e no sistema nervoso central e, mais raramente no ovário, no testículo e na tireóide. Estima-se, que esta fase seja diagnosticada em menos de 10% dos indivíduos infectados.

A escassez ou ausência de manifestações clínicas ocorre na maioria dos pacientes. No entanto, pode ocorrer inflamação no local de entrada do parasito, em geral próximo aos olhos, causando lesão denominada “sinal de Romana”. Os sintomas mais frequentes são: febre, taquicardia não relacionada à febre, linfadenopatia, hepatomegalia, esplenomegalia, vômito, diarreia, anorexia, edema e linfocitose. Nesta fase da infecção, ocorre miocardite aguda em mais de 90% dos casos em resposta ao intenso parasitismo, com frequentes alterações eletrocardiográficas.

Os resultados dos testes sorológicos para o *T. cruzi* são negativos durante as primeiras semanas, mas o parasito circulante pode ser detectado por xenodiagnóstico e/ou hemoculturas. Em geral, os sintomas desaparecem seis a oito semanas após a infecção, ou em menos tempo, se é de pronto diagnosticado, podendo, assim, ser realizado tratamento específico. A recuperação espontânea é observada em 95% dos pacientes (PRATA *et al.*, 2001; PUNUKOLLU *et al.*, 2007). Na ausência de tratamento cerca de 5% dos infectados morrem por meningoencefalite ou insuficiência cardíaca grave, que ocorre principalmente em crianças no segundo ou terceiro ano de vida (PARADA *et al.*, 1997; RASSI *et al.*, 2000; PUNUKOLLU *et al.*, 2007).

O tratamento é feito com benzonidazol, sendo indicado durante a fase aguda, na infecção congênita e na infecção crônica recente, característica de crianças em idade escolar em zonas endêmicas. Há indicação de tratamento profilático nos casos de acidente laboratorial, mesmo antes da confirmação da doença por exames diagnósticos (PRATA *et al.*, 2001). O tratamento da fase aguda promove melhora dos sintomas, desaparecimento dos parasitos circulantes após cerca de cinco dias de tratamento e, mais tardiamente, a negatificação da sorologia em até 80% dos casos (PRATA *et al.*, 2001; URBINA *et al.*, 2003).

O parasitismo intenso, característico da fase aguda, é controlado pela resposta imune contra o *T. cruzi*, estabelecendo-se uma infecção crônica com baixa parasitemia. Porém, não ocorre eliminação definitiva do parasito, o que é conhecido como “imunidade não estéril” (BARRET *et al.*, 2003). Esse dado é confirmado pela observação de que os pacientes com doença de Chagas, em uso de imunossupressores pós-transplante cardíaco ou com síndrome da imunodeficiência adquirida, apresentam exacerbação da infecção, com aumento da parasitemia, parasitismo tecidual e sinais clínicos de doença parasitária (ROCHA *et al.*, 1994; SARTORI *et al.*, 1995; ALMEIDA *et al.*, 1996).

#### **1.1.4. Fase crônica**

A fase crônica da doença inicia-se quando a parasitemia cai a níveis indetectáveis e quando os sintomas clínicos relacionados à fase aguda desaparecem, ou seja, após 4 a 8 semanas de infecção. Na fase crônica, entre 60% a 70% dos indivíduos infectados permanecem assintomáticos pelo resto da vida, evoluindo na forma chamada indeterminada, laboratorial ou subclínica da doença. No entanto, entre 10 e 30 anos após a infecção aguda, os 30% a 40% restantes desenvolvem manifestações clínicas decorrentes de alterações cardíacas e/ou digestivas. Essas ocorrências são mais frequentes em indivíduos do sexo masculino entre 20 e 45 anos de idade (BARRET *et al.*, 2003; ANDRADE *et al.*, 2005).

Estudos epidemiológicos mostram que a evolução da forma indeterminada para as formas cardíaca e/ou digestiva é maior nos primeiros 10 anos de infecção, desaparecendo progressivamente (PARADA *et al.*, 1997). A cardiomiopatia chagásica, cardiomiopatia dilatada inflamatória, acomete cerca de 30% dos infectados pelo *T. cruzi*; um terço destes desenvolve a doença grave, que inclui arritmias malignas, dilatação ventricular e insuficiência cardíaca (URBINA *et al.*, 2003; DIAS *et al.*, 2007). Por fim, 8% a 10% dos pacientes desenvolvem a forma digestiva com gravidade variada. Nestes casos é frequente observar algum grau de acometimento do sistema nervoso autônomo, que, em geral, precede as alterações de motilidade, com consequente dilatação desses órgãos, levando ao megaesôfago e ao megacólon (PRATA *et al.*, 2001; BARRET *et al.*, 2003).

#### **1.1.5. Forma indeterminada**

O diagnóstico dos pacientes portadores da forma indeterminada baseia-se na sorologia positiva para o *T. cruzi*, ausência de sintomas, além de eletrocardiograma convencional e estudos radiológicos de tórax, esôfago e colón normais (*Reunião pesquisa aplicada em Chagas, 1985*). Apesar do eletrocardiograma normal, exames clínicos mais sensíveis, como o

eletrocardiograma de longa duração, o ecocardiograma e estudos com radioisótopos e angiografias, podem detectar pequenas alterações em diferentes órgãos quando os pacientes na forma indeterminada são comparados a indivíduos soronegativos. Outros estudos também mostraram alterações no sistema nervoso autônomo (OLIVEIRA *et al.*, 2002; MOLINA *et al.*, 2006). Além disso, cerca de 11% dos pacientes na forma indeterminada e exame radiológico de esôfago normal apresentam alguma alteração em testes manométricos com ingestão de bário (RIBEIRO *et al.*, 2000). A mortalidade desses pacientes é a mesma que a da população em geral. Em virtude da ausência de sintomas, esses pacientes são normalmente identificados em bancos de sangue, quando a sorologia para o *T. cruzi* é positiva.

#### **1.1.6. Cardiomiopatia chagásica crônica**

A cardiomiopatia chagásica crônica é resultante do progressivo dano ao miocárdio devido à miocardite fibrosante, característica da doença. De maneira importante, apenas 30% dos infectados pelo *T. cruzi* desenvolvem algum grau de doença cardíaca; destes, 30% podem apresentar manifestações clínicas mais graves e evolução para óbito. As causas de óbito mais frequentes nos pacientes com doença de Chagas são: insuficiência cardíaca, tromboembolismo pulmonar e sistêmico, e arritmias graves.

A morte súbita é característica da cardiomiopatia chagásica. Em um estudo de coorte com 411 indivíduos, observou-se que a morte súbita ocorreu em 60% dos pacientes crônicos, em uma taxa anual de 2,4%, sendo a taxa de mortalidade como um todo de 3,9% ao ano (RASSI *et al.*, 2006). Outros trabalhos mostraram que a sobrevivência dos pacientes com cardiomiopatia chagásica é de 2 a 4 vezes menor que a dos pacientes com cardiomiopatia dilatada idiopática (MADY *et al.*, 1994; RASSI *et al.*, 2006).

A cardiomiopatia chagásica corresponde a um terço dos casos de insuficiência cardíaca no Brasil (MENDEZ *et al.*, 2001). Um estudo

multicêntrico mostrou que a cardiomiopatia chagásica é a terceira maior causa de indicação para transplante cardíaco no Brasil (BOCCHI *et al.*, 2001).

O diagnóstico da cardiomiopatia chagásica crônica é feito pelo teste sorológico positivo para o *T. cruzi*, presença de sintomas clínicos e alterações no eletrocardiograma, sendo frequentemente observados distúrbios de condução intraventricular e atrioventricular, e de ritmo. A cardiomegalia é, na maioria dos casos, detectada por meio do exame radiológico e do ecocardiograma bidimensional, que revelam dilatação global e hipocontratilidade do ventrículo esquerdo (PRATA *et al.*, 2001; BARRET *et al.*, 2003; PUNUKOLLU *et al.*, 2007; MARIN-NETO *et al.*, 2007). Um aspecto peculiar observado em paciente com cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) é o afinamento da ponta do ventrículo esquerdo, conhecido como aneurisma apical. O aneurisma apical ocorre em cerca de 20% dos pacientes com CCC, e entre 50 a 60% nos pacientes graves (PRATA *et al.*, 2001; BORGES-PEREIRA *et al.*, 1998). Alguns estudos mostram associação desses aneurismas com arritmia malignas e morte súbita (BESTETTI *et al.*, 1997).

#### **1.1.7. Patogênese**

Apesar de decorridos 100 anos desde a descrição inicial da doença, por Carlos Chagas, a patogênese da cardiomiopatia chagásica crônica (CCC) ainda não é inteiramente compreendida (MARIN-NETO *et al.*, 2007). Evidências de diversos estudos na literatura demonstram que diferentes fatores na fase aguda e/ou na forma indeterminada da doença de Chagas podem contribuir de forma marcante para o desenvolvimento da doença cardíaca. Os principais mecanismos patogênicos sugeridos para a miocardiopatia da doença de Chagas são: lesão miocárdica causada pelo *T. cruzi*, pelo sistema imune, por alterações microvasculares e por alterações do sistema nervoso autônomo (MARIN-NETO *et al.*, 2007).

Os mecanismos mais estudados envolvem inflamação em resposta ao parasito e a autoimunidade na suscetibilidade diferencial das formas clínicas

da doença de Chagas. Vale ressaltar ainda que nenhum dos mecanismos citados é mutuamente excludente. Na fase aguda, foram descritas alterações em componentes do sistema  $\beta$ -adrenérgico cardíaco de transdução de sinais, que incluem a redução dos níveis plasmáticos de catecolaminas, a diminuição de afinidade do agonista pelo receptor  $\beta$ -adrenérgico cardíaco, e a elevação dos níveis de AMP cíclico (adenosina 3',5'-monofosfato cíclico) na célula cardíaca (BUSTAMANTE *et al.*, 2003a; LO PRESTI *et al.*, 2006).

Na forma indeterminada foi observado que a regulação da função cardíaca pela noradrenalina também está comprometida e, provavelmente, associada às modificações no sistema adrenérgico cardíaco que ocorreram no início da infecção. Além disso, a cepa do parasito, fatores genéticos do hospedeiro e reinfecções nas fases aguda e forma indeterminada podem agravar o comprometimento cardíaco (BUSTAMANTE *et al.*, 2002; BUSTAMANTE *et al.*, 2003b, BUSTAMANTE *et al.*, 2007). Segundo Gironès e Fresno (2003), a cronicidade da lesão ao miocárdio decorre da ativação da resposta imune ao parasito, juntamente aos múltiplos antígenos cardíacos. Na realidade, o mimetismo molecular entre os antígenos do hospedeiro e do parasito resultaria em resposta das células efectoras T e B contra os antígenos cardíacos, levando à lesão do miocárdio. Essa agressão crônica ao coração culmina em dano progressivo às fibras miocárdicas e, conseqüente, formação de cicatriz fibrótica. Contudo, ainda não há evidência que defina a etiologia da miocardite crônica e insidiosa que resulta na CCC.

Estudos clínicos revelaram, em pacientes cardiopatas de etiologia chagásica, um padrão de citocinas mais predominante de resposta Th1, com produção de IFN- $\gamma$  e níveis elevados de TNF- $\alpha$ , especialmente em pacientes com comprometimento mais severo (SILVA *et al.*, 1992; ABEL *et al.*, 2001). Os modelos experimentais da doença de Chagas, aguda e crônica, revelaram que as citocinas são elementos importantes na geração e controle da resposta imune, que pode levar ao dano tecidual (SILVA *et al.*, 1992; SOARES *et al.*, 2001). Diversas citocinas são produzidas na infecção por *T. cruzi*, e seus efeitos são influenciados por vários fatores como a virulência da

cepa, fatores genéticos do hospedeiro e a presença, ou não, de reinfecções (SAMUDIO *et al.*, 1998; REVELLI *et al.*, 1999).

### **1.1.8. Imunopatologia da doença de Chagas**

Embora os mecanismos patogênicos envolvidos no desenvolvimento da cardiomiopatia chagásica não estejam completamente elucidados, não há dúvida de que o infiltrado inflamatório cardíaco seja o efector último da lesão no coração. Portanto, existem aspectos imunopatológicos nas fases aguda e crônica da doença de Chagas que podem explicá-lo. O aspecto histopatológico característico da cardiomiopatia dilatada da doença de Chagas é a presença de miocardite difusa com intenso infiltrado linfomononuclear, destruição de fibras cardíacas e fibrose, com escassez de ninho do parasito (HIGUCHI *et al.*, 1987; HIGUCHI *et al.*, 1993). Fibrose e inflamação crônica atingem também o sistema de condução cardíaco, o que pode explicar as frequentes arritmias observadas nos pacientes cardiopatas (ENGMAN *et al.*, 2002).

O acúmulo de fibrose intersticial na miocardite chagásica também explica a diminuição da contratilidade do miocárdio e a dissincronia na contração dos ventrículos durante a sístole, contribuindo para a disfunção ventricular (ROSSI *et al.*, 1998). A miocardite ativa, bem como, o grau de fibrose, tem sido associada ao desenvolvimento da insuficiência cardíaca nos pacientes com CCC (HIGUCHI *et al.*, 1987; RIBEIRO *et al.*, 2007). Resultados em modelo animal, que reproduz as características da cardiomiopatia chagásica, confirmam a associação entre a intensidade da miocardite e a disfunção ventricular (MILEI *et al.*, 1992).

O infiltrado inflamatório é constituído de macrófagos (50%), linfócitos T (40%) e linfócitos B (10%) (MILEI *et al.*, 1992). Com relação à resposta imune celular, observa-se que existe predomínio de linfócitos T CD8<sup>+</sup> sobre os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, numa proporção de 2:1 (REIS *et al.*, 1993; TOSTES *et al.*, 1994). Histiócitos e células endoteliais do tecido cardíaco de pacientes

com cardiomiopatia chagásica apresentam aumento da expressão de moléculas antígeno leucocitário humano (HLA, *human leukocyte antigen*) de classe I e II. Essas moléculas estão envolvidas na apresentação de antígenos para os linfócitos T CD8<sup>+</sup> e T CD4<sup>+</sup>, respectivamente.

Os cardiomiócitos também apresentam um aumento de expressão de HLA classe I. Além disso, as células endoteliais expressam moléculas de adesão, como moléculas de adesão à célula vascular do tipo 1 (VCAM-1, *vascular cell adhesion molecule 1*) e molécula de adesão intercelular 1 (ICAM-1, *intercellular cell adhesion molecule 1*), que favorecem a infiltração e a permanência de células do sistema imune no local (REIS *et al.*, 1993; BENVENUTTI *et al.*, 2000). O aumento da expressão de moléculas de adesão e moléculas de HLA é sugestivo da presença de citocinas pró-inflamatórias no local, que sabidamente agem sobre o controle de expressão dessas moléculas. Estudos em tecido cardíaco de pacientes com cardiomiopatia chagásica identificaram a presença de citocinas inflamatórias como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-6 (REIS *et al.*, 1993; REIS *et al.*, 1997). Além disso, linhagens de células T CD4<sup>+</sup>, obtidas de infiltrados cardíacos de pacientes com cardiomiopatia chagásica, são capazes de produzir IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  após estímulo em cultura (ABEL *et al.*, 2001). Também já foi demonstrado que linfócitos T CD8<sup>+</sup> periféricos e de infiltrado cardíaco de pacientes cardiomiopatas crônicos reconhecem peptídeos derivados de antígenos de *T. cruzi* (cruzipaína e FL-160) e respondem produzindo IFN- $\gamma$ . Esse dado sugere que as células T CD8<sup>+</sup> devam ter um papel importante na patogênese da doença (FONSECA *et al.*, 2005). Além disso, foi observada a expressão aumentada de quimiocinas induzidas por IFN- $\gamma$ , como MIG (*monokine induced by IFN- $\gamma$* ) e IP-10 (*IFN- $\gamma$ -inducible protein*) em corações de pacientes cardiomiopatas crônicos em um estudo de expressão de genes pelos cardiomiócitos (CUNHA-NETO *et al.*, 2005).

Em concordância com o que se observa no coração, vários trabalhos com células do sangue periférico de pacientes com doença de Chagas têm mostrado que a infecção crônica induz desvio da resposta imunológica para um perfil pró-inflamatório, com produção de citocinas do tipo Th1 e supressão

de citocinas anti-inflamatórias do tipo Th2, como IL-4, IL-5 e IL-10 (CUNHA-NETO *et al.*, 1998; ABEL *et al.*, 2001; GOMES *et al.*, 2003; MARIN-NETO *et al.*, 2007). O aumento de produção de IFN- $\gamma$  por pacientes cardiopatas crônicos, comparado ao apresentado por pacientes na forma indeterminada, parece estar associado à diminuição de IL-10 por esses pacientes (GOMES *et al.*, 2003). O número de linfócitos produtores de IFN- $\gamma$  de pacientes cardiopatas crônicos é significativamente maior do que o de pacientes na forma indeterminada, indicando uma capacidade aumentada destes pacientes em responder ao estímulo pró-inflamatório do parasito (ABEL *et al.*, 2001).

Os níveis de TNF- $\alpha$  estão significativamente mais elevados em pacientes com doença de Chagas do que em indivíduos normais, sendo observados níveis ainda mais altos nos pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica sem disfunção ventricular ou na forma indeterminada (FERREIRA *et al.*, 2003; TALVANI *et al.*, 2004). A elevação do TNF- $\alpha$  observada nos pacientes com disfunção ventricular é provavelmente secundária à insuficiência cardíaca em si (LEVINE *et al.*, 1990). Entretanto, o aumento do TNF- $\alpha$  observado em cardiopatas crônicos sem disfunção ventricular sugere a existência de um estímulo contínuo para a produção de citocinas inflamatórias ao longo da infecção, o que pode contribuir para o desenvolvimento ou a progressão da cardiomiopatia.

Com relação à resposta imune humoral, alguns trabalhos têm mostrado o papel patogênico de anticorpos no soro de pacientes com doença de Chagas que reagem contra receptores muscarínicos e adrenérgicos dos cardiomiócitos (BORDA *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2007). A produção de anticorpos contra esses receptores pode interferir nas atividades mecânicas e elétricas das células do miocárdio (CHIALE *et al.*, 1995; KAPLAN *et al.*, 1997; COSTA *et al.*, 2000). Anticorpos reativos para regiões da proteína P ribossomal do *T. cruzi* (P0 e P<sub>2</sub> $\beta$ ), que reconhecem a segunda alça extracelular do receptor  $\beta$ 1-adrenérgico, também foram detectados em pacientes com cardiomiopatia chagásica (FERRARI *et al.*, 1995; KAPLAN *et al.*, 1997). Além disso, foi mostrado que a imunização de camundongos com proteínas recombinantes P0 e P<sub>2</sub> $\beta$  do *T. cruzi* levou à produção de altos

títulos de anticorpos com reatividade cruzada com o receptor  $\beta$ -adrenérgico. Esses anticorpos se correlacionam com a presença de arritmias ventriculares, alterações de repolarização e defeitos de condução nesses animais (BERGAMI *et al.*, 2001). No entanto, os autores demonstraram que a presença desses anticorpos funcionais não se correlaciona com a sintomatologia cardíaca, mas sim com a disfunção do sistema nervoso autônomo (GOIN *et al.*, 1997). Porém, não está claro se todos esses autoanticorpos de fato têm papel patogênico ou se são resultantes da exposição de antígenos cardíacos e ativação imune.

#### **1.1.9. Modelos experimentais murinos de cardiomiopatia chaqásica**

Os modelos experimentais de cardiopatias tornam-se cada dia mais imprescindíveis na elucidação dos mecanismos patogênicos e na busca de novas opções terapêuticas. No que tange à doença de Chagas, grande parte do nosso conhecimento provém do estudo experimental desenvolvido em modelo murino (PAIVA *et al.*, 2002). A utilização de camundongos como modelo da CCC proporciona uma rápida evolução da doença, reprodução em larga escala, baixo custo e fácil manuseio. Outra vantagem a ser ressaltada, além da grande semelhança entre o processo patológico humano e o murino, é a disponibilidade de animais isogênicos e de vários reagentes (sondas moleculares, anticorpos, etc.).

Desde o início do século XX, linhagens de camundongos vêm sendo utilizadas para compreensão dos mecanismos fisiopatológicos da doença de Chagas, bem como, para avaliar a eficácia de novas intervenções terapêuticas (POSTAN *et al.*, 1983). Estudos realizados em diferentes linhagens de camundongos mostram a presença de lesões inflamatórias e degenerativas no coração do hospedeiro, sendo esse comprometimento muito semelhante ao existente em humanos (ANDRADE *et al.*, 1990). Cabendo ressaltar que os estudos comparativos entre diferentes linhagens de camundongos infectados por *T. cruzi* resultam também em diferentes formas de progressão da doença que podem servir de suporte para avaliação da

influência de componentes genéticos no curso da CCC. As linhagens C57BL/6, BALB/c e A estão entre as mais estudadas, sendo a primeira a que apresenta maior resistência à infecção. Segundo a literatura, o modelo de BALB/c infectado com a cepa Colombiana do parasito mostra-se adequado para o estudo da dilatação miocárdica, sendo a linhagem A a de maior importância na fase aguda, devido à alta susceptibilidade e intensa resposta inflamatória (PARADA *et al.*, 1997). Além de fatores genéticos influenciarem os mecanismos imunológicos e fisiopatológicos, relacionados à progressão da doença (SOUZA *et al.*, 2001), o sexo também influencia o curso das cardiopatias de etiologias diversas, inclusive da CCC.

A influência do sexo do hospedeiro sobre a infecção por *T. cruzi* tem sido investigada em modelos experimentais e humanos há muito tempo. Muitos estudos já indicam que a incidência e gravidade da doença de Chagas é maior no gênero masculino do que no feminino (GOBLE *et al.*, 1970), sendo também descrito que camundongos machos são geralmente mais susceptíveis na fase aguda da infecção por *T. cruzi* do que as fêmeas (HAUSCHKA *et al.*, 1947; GOBLE *et al.*, 1970). Animais ooforectomizados infectados com *T. cruzi* apresentam níveis de parasitemia bem mais elevados do que os animais infectados não-operados, assim como, a reposição hormonal com estrogênio e progesterona reduzem os níveis de parasitemia (HAUSCHKA *et al.*, 1947). Estes e outros estudos apontam para o papel modulador do estrogênio sobre a infecção por *T. cruzi*, bem como, a influência da carga genética investigada em diferentes linhagens com o mesmo modelo de infecção (SOUZA *et al.*, 2001).

Esses estudos têm sido aprimorados pela utilização de técnicas não-invasivas de avaliação da função cardíaca que incluem, principalmente, a ecocardiografia transtorácica e a ressonância magnética (SIRI *et al.*, 1997; JELICKS *et al.*, 1999; YANG *et al.*, 1999). Este tipo de investigação, por métodos não invasivos, permite que o procedimento seja repetido no mesmo animal diversas vezes, possibilitando a realização de estudo longitudinal e, desta forma, acompanhamento da progressão da doença e da resposta ao

tratamento. Ressalte-se, por oportuno que, outro fator de grande importância, é a redução do número de animais utilizados neste tipo de estudo.

Atualmente, com a sofisticação da tecnologia de ultrassom já existem potentes ecocardiógrafos capazes de discriminar detalhes em corações murinos. De forma semelhante aos humanos, a ecocardiografia experimental utiliza ferramentas como o *doppler* tecidual e pulsátil, modo-M e o modo bidimensional na detecção de anormalidades da função cardíaca. Já foi demonstrado que a ecocardiografia em camundongos é um procedimento factível e válido para avaliação da morfologia e da função cardíaca, em inúmeros modelos experimentais de doenças cardíacas, como infarto agudo e crônico do miocárdio (ROELL *et al.*, 2002; DEWALD *et al.*, 2003), cardiomiopatia dilatada (PONTEN *et al.*, 2003), cardiomiopatia hipertrófica (LIAO *et al.*, 2002) e cardiomiopatia chagásica (CHANDRA *et al.*, 2002). Portanto, a ecocardiografia, em estudos pré-clínicos, surge como ferramenta indispensável na investigação dos mecanismos envolvidos na patogênese da CCC, no diagnóstico e prognóstico desta cardiomiopatia, e na investigação da eficácia de diferentes tipos de intervenções terapêuticas que visam ao reparo da estrutura e ao restabelecimento da função do miocárdio acometido pela IC de etiologia chagásica.

#### **1.1.10. Tratamento da cardiomiopatia chagásica crônica**

A terapia disponível para doença de Chagas consiste no uso do benzonidazol, eficaz na erradicação do parasito na fase aguda da doença. No entanto, sua eficácia na cura da CCC estabelecida é bastante discutida apesar de ensaios experimentais recentes apontarem um efeito benéfico do uso do referido medicamento, na fase crônica da doença, ao reduzir os distúrbios cardíacos característicos da CCC (GARCIA *et al.*, 2005). De forma geral, o paciente recentemente diagnosticado como portador da doença de Chagas deverá, inicialmente, além da história clínica e exame físico detalhado, realizar eletrocardiograma de 12 derivações com registro de 30 segundos na derivação D2. Caso esta avaliação inicial não apresente

alterações deverá ser mantido em acompanhamento em nível ambulatorial anualmente. Se os achados da avaliação inicial evidenciarem comprometimento cardíaco o paciente deverá ser submetido ao Holter 24 horas, ecocardiograma e teste ergométrico. No caso de sintomas gastrointestinais, além dos já mencionados, é recomendado a realização de exame contrastado com bário do trato digestivo (BERN *et al.*, 2007).

O tratamento etiológico específico com droga anti-tripanosoma deverá ser adotado para todos os casos de doença de Chagas na fase aguda, por transmissão congênita, quando da reativação da infecção e em pacientes portadores da forma crônica com menos de 18 anos de idade. Naqueles com idade entre 19 e 50 anos, na ausência de IC avançada, o tratamento etiológico poderá ser iniciado com o objetivo de redução da progressão da doença, devendo ser considerado opcional para aqueles com idade maior do que 50 anos (BERN *et al.*, 2007).

A única alternativa para os pacientes com CCC, agravada pela insuficiência cardíaca (IC), é o transplante de órgão. Portanto, a CCC tem frequentemente um curso fatal, já que o tratamento é sintomático e a possibilidade de realização de transplantes cardíacos é bem menor que a demanda (DIAS *et al.*, 1997). Este procedimento é dispendioso e complexo, e, no caso específico da insuficiência cardíaca de etiologia chagásica, apresenta ainda o agravante de que o uso de imunossupressores pós-transplante pode reativar a infecção devido ao parasitismo tecidual persistente na fase crônica da infecção. Ainda como agravante do tratamento, grande parte dos indivíduos com CCC, que evoluem para insuficiência cardíaca congestiva franca, pertencem a camadas socioeconômicas mais desfavorecidas, para a qual o acesso aos tratamentos clínico e cirúrgico adequados, transplante cardíaco e o uso de drogas imunossupressoras é limitado. A IC grave impossibilita o indivíduo de trabalhar, acarretando ônus para o Estado e baixa qualidade de vida para o enfermo. Portanto, o estabelecimento de uma terapia eficaz reduzirá, consideravelmente, os custos com internações hospitalares e aposentadorias precoces.

## 1.2. Imunoglobulina G humana

### 1.2.1. Aspectos Gerais

A imunoglobulina G humana é usada no tratamento de uma variedade de doenças por imunodeficiências, tanto primárias quanto secundárias, além de doenças autoimunes e inflamatórias. O primeiro uso da imunoglobulina como terapia foi, provavelmente, no final do século XIX, com o uso de soro para tratamento de varíola, raiva e difteria. Posteriormente, foi tentado soro imune de cavalos para tratamento de uma série de doenças infecciosas, porém sem êxito em decorrência ao desenvolvimento de doença do soro ou mediada por imunocomplexo. Os primeiros relatos de preparações de imunoglobulina à partir de plasma humano ocorreu na II Guerra Mundial, assim como, rapidamente relatado a possibilidade de prevenção de hepatite e sarampo (BERGER *et al.*, 2002). Na década de 1950, a imunização passiva intramuscular com uso de preparados de imunoglobulina humana mostrou ter grande impacto na prevenção de sepse grave e infecções bacterianas invasivas em indivíduos sem imunoglobulina (BRUTON *et al.*, 1952). Somente em 1960 tornou-se disponível a formulação para uso intravenoso, embora impurezas e agregados de proteínas causassem reações anafiláticas graves (PIERCE *et al.*, 2003). Entretanto, o progressivo refinamento na forma de preparo tornou segura a administração por via intravenosa, inclusive o uso de doses mais elevadas que se aproximam dos níveis fisiológicos.

A imunoglobulina humana está aprovada pelo US FDA (*United States Food and Drug Administration*) para uso nas seguintes doenças: púrpura trombocitopênica idiopática, imunodeficiência primária e secundária, infecção pelo HIV em pediatria, síndrome de Kawasaki, prevenção da doença enxerto hospedeiro e polineuropatia desmielinizante inflamatória crônica.

Os mecanismos de ação do uso da imunoglobulina não são totalmente bem esclarecidos. Destacam-se os seguintes: IVIg pode reduzir a atividade imunológica através da interação com os receptores FC sobre as células efetoras, ou pela presença de anticorpos anti-idiotípicos contra idiotipos de

auto-anticorpos circulantes (SAMUELSON *et al.*, 2001); pode promover a solubilização e a remoção de depósitos de complexos imunes (SAMUELSON *et al.*, 2001); pode conter anticorpos neutralizantes (ASHKENAZI *et al.*, 1988); pode acelerar o catabolismo da IgG através do aumento da concentração plasmática da IgG total, assim eliminando as moléculas de IgG patogênicas a uma taxa proporcional à sua concentração no plasma (YU *et al.*, 1999; BLEEKER *et al.*, 2001); pode alterar o número de células T e de subpopulações de células T (KOFFMAN *et al.*, 1997); pode aumentar o efeito das células T reguladoras contribuindo para a manutenção da auto-tolerância imunológica (KESSEL *et al.*, 2007) ou pode servir como local alternativo de ligação do sistema complemento (SPYCHER *et al.*, 2009).

Em 1982 e 1989, a Organização Mundial de Saúde (WHO, 1982) publicou normas mínimas para fabricação de preparações de imunoglobulina humana que são: conter a menor quantidade de IgA possível, ser extraída de um conjunto de pelo menos 1000 doadores saudáveis, mínima modificação das moléculas de IgG que devem manter sua capacidade de opsonização e fixação do complemento e estar livre de conservantes ou estabilizantes que possam se acumular *in vivo*. Atualmente são observadas pequenas diferenças nos procedimentos de produção da imunoglobulina pelos mais diversos fabricantes, tendo todos como objetivo a solução final obter um produto altamente purificado de IgG polivalente (>90%). Os produtos diferem nos requisitos de armazenamento e vida útil, assim como, nos estabilizadores que podem incluir os açúcares, como sacarose, maltose ou glicose.

### **1.2.2. Utilização na prática clínica em insuficiência cardíaca**

Apesar do desenvolvimento exponencial do tratamento medicamentoso a insuficiência cardíaca crônica é uma doença progressiva, com alta morbidade e mortalidade. Além do que, observamos pouca representatividade dos pacientes portadores de cardiomiopatia chagásica crônica nos grandes ensaios clínicos multicêntricos.

Desde a observação inicial de Levine (1990), diversos estudos têm demonstrado aumento das citocinas inflamatórias tais como TNF- $\alpha$ , interleucinas IL-1 $\beta$  e IL-6, com níveis progressivamente mais elevados de acordo com a severidade da doença, avaliados por características clínicas, parâmetros hemodinâmicos e neuro-hormonais (MANN *et al.*, 2002; AUKRUST *et al.*, 2005). Interessante é que o aumento dos mediadores inflamatórios não é acompanhado por incremento das citocinas anti-inflamatórias, tais como, IL-10 (AUKRUST *et al.*, 1999). Além do que, uma série de estudos experimentais, incluindo estudos em animais geneticamente modificados, têm demonstrado que os efeitos biológicos dessas citocinas pró-inflamatórias podem explicar diversos mecanismos de progressão da doença tais como, indução de apoptose, degradação da matriz extracelular e desenvolvimento de fibrose, efeitos diretos nos processos dependentes de Ca<sup>2+</sup> e sinais de transdução de sinais pela via *b*-adrenérgica (MANN *et al.*, 2002). Notadamente, a infusão de TNF- $\alpha$ , em concentrações comparáveis aos níveis circulantes na IC, pode promover disfunção ventricular esquerda em camundongos (BOZKURT *et al.*, 1998).

A descrição de ativação das citocinas em insuficiência cardíaca levanta a possibilidade de utilizarmos imunoglobulina venosa procurando seu efeito benéfico através da imunomodulação. Apesar da atraente hipótese poucos são estudos disponíveis na literatura visando esta forma de tratamento.

Especificamente em IC, os benefícios da terapia com imunoglobulina humana intravenosa (IVIg) foram inicialmente demonstrados em miocardiopatia periparto (McNAMARA *et al.*, 1997; BOZKURT *et al.*, 1999). Lars Gullestad e colaboradores (2001) demonstraram que o uso de IVIg em IC congestiva com fração de ejeção < 0,40 aumentou significativamente a LVEF de 0,26 para 0,31, independente da etiologia da cardiomiopatia (idiopática ou isquêmica). Em contrapartida, McNamara (2001) não evidenciou nenhuma alteração em pacientes com insuficiência cardíaca de recente começo (< 6 meses). Existem diversas razões para a discrepância entre os dois estudos, dentre elas destacam-se: uso de diferentes esquemas terapêuticos e insuficiência cardíaca em fases diferentes (crônica e aguda).

Os mecanismos propostos para efetividade do uso de IVIg em cardiopatias são: neutralização de antígenos (TAKEI *et al.*, 1993; BALLOW *et al.*, 1997), bloqueio dos receptores Fcγ nos macrófagos e aumento da expressão inibitória do FCγRIIB (BALLOW *et al.*, 1997), regulação da resposta inflamatória, inibição da ativação e depósito do complemento e diminuição da adesão leucocitária à célula endotelial (VASSILEV *et al.*, 1999).

Neste contexto de elucidação dos mecanismos patogênicos da CCC e de busca por uma intervenção eficaz para o tratamento desta doença, destaca-se o uso de modelos experimentais para CCC visando desenvolver novas modalidades terapêuticas. Por estes motivos e diante dos fatos abordados, a realização de um trabalho experimental de terapêutica em murinos com cardiopatia chagásica crônica é de suma importância, procurando estabelecer o efeito cardioprotetor resultante do uso de imunoglobulina humana intravenosa através da avaliação morfométrica, imunológica e funcional, como forma de terapêutica eficaz para o tratamento da CCC.

## 2. JUSTIFICATIVA

---

A cardiomiopatia chagásica crônica é uma doença endêmica e debilitante, que leva a uma perda estimada de cerca de 750 mil anos de vida produtiva anualmente, por morte prematura, nos países da América Latina (SCHOFIELD e DIAS, 1991). Estima-se que mais de 60 milhões de pessoas estejam sob risco de transmissão da doença de Chagas em cerca de 18 países endêmicos (WHO, 2002).

Apesar da grande evolução para o tratamento da insuficiência cardíaca nos últimos 20 anos, ainda não foi demonstrada uma estratégia terapêutica suficientemente eficaz para os pacientes portadores de cardiopatia chagásica crônica.

Para o desenvolvimento de novas terapias que possam ser utilizadas em pacientes, é fundamental o auxílio da pesquisa em modelos experimentais, utilizando modelos animais que reproduzam condições semelhantes às observadas em seres humanos. Para a doença de Chagas, especificamente, o modelo de infecção pela cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos tem sido muito estudado (SOARES *et al.*, 2001).

O surgimento de um protocolo terapêutico eficaz capaz de alcançar uma melhora importante na capacidade funcional dos portadores de cardiomiopatia chagásica crônica, bem como na qualidade de vida e na função ventricular, poderá contribuir para uma menor morbi-mortalidade e uma menor taxa de hospitalizações por insuficiência cardíaca.

### 3. HIPÓTESE

---

O presente estudo testou a hipótese de que a terapia com imunoglobulina venosa humana é capaz de reduzir inflamação e fibrose e melhorar a função cardiovascular em um modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica em camundongos.

## 4. OBJETIVOS

---

### 4.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial terapêutico da imunoglobulina G humana em modelo experimental da cardiomiopatia chagásica crônica induzida pela infecção com a cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos C5BL/6.

### 4.2. Objetivos específicos

- Avaliar os efeitos do tratamento com imunoglobulina humana na inflamação e fibrose no coração de camundongos com cardiomiopatia chagásica crônica.
- Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas em camundongos chagásicos crônicos tratados ou não com imunoglobulina humana.
- Avaliar os efeitos do tratamento com imunoglobulina humana na função cardiorrespiratória dos camundongos chagásicos crônicos, utilizando análises por ecocardiograma, eletrocardiograma e ergometria.

## 5. MATERIAL E MÉTODOS

---

### 5.1. Desenho do estudo experimental

Este projeto experimental foi conduzido após aprovação do Comitê de Ética do Uso Animal (CEUA) do Centro de Biotecnologia e Terapia Celular (CBTC), Hospital São Rafael, Salvador - BA. Trinta camundongos da linhagem C57BL/6, pesando entre 23 - 28 g, sexo feminino, foram obtidas do biotério central do Centro Multidisciplinar para Investigação Biológica na Área de Ciência em Animais de Laboratório (CEMIB), da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Campinas – SP. Os camundongos foram randomizados em 3 grupos: grupo controle (n=10), grupo albumina (n=10) e grupo imunoglobulina (n=10).

Não foi realizado nenhum tipo de tratamento ou intervenção nos animais do grupo controle, enquanto que nos outros dois grupos (albumina e imunoglobulina) foram inoculados, por via intraperitoneal, com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. No 15<sup>o</sup> dia pós infecção, foi realizada leitura em microscópio óptico com a finalidade de acompanhamento da parasitemia. No 40<sup>o</sup> e 180<sup>o</sup> dias pós-infecção, todos os animais foram submetidos a avaliação funcional cardíaca, que consistiu na realização de eletrocardiograma, ecocardiograma e teste ergométrico. Após 9 meses da infecção, os animais do grupo imunoglobulina receberam dose de 1 mg/kg/dia de imunoglobulina humana diluída em salina durante 5 dias, por via intraperitoneal. Os animais do grupo albumina receberam 1mg/kg/dia de albumina humana (Albumina Sérica Humana Normal à 20% - Baxter Bioscience) diluída em salina durante 5 dias, também por via intraperitoneal. Três meses após uso de imunoglobulina ou albumina, os animais dos 3 grupos realizaram nova avaliação funcional cardíaca, sendo posteriormente sacrificados e submetidos à avaliação morfométrica e dosagem de citocinas (Figura 2).

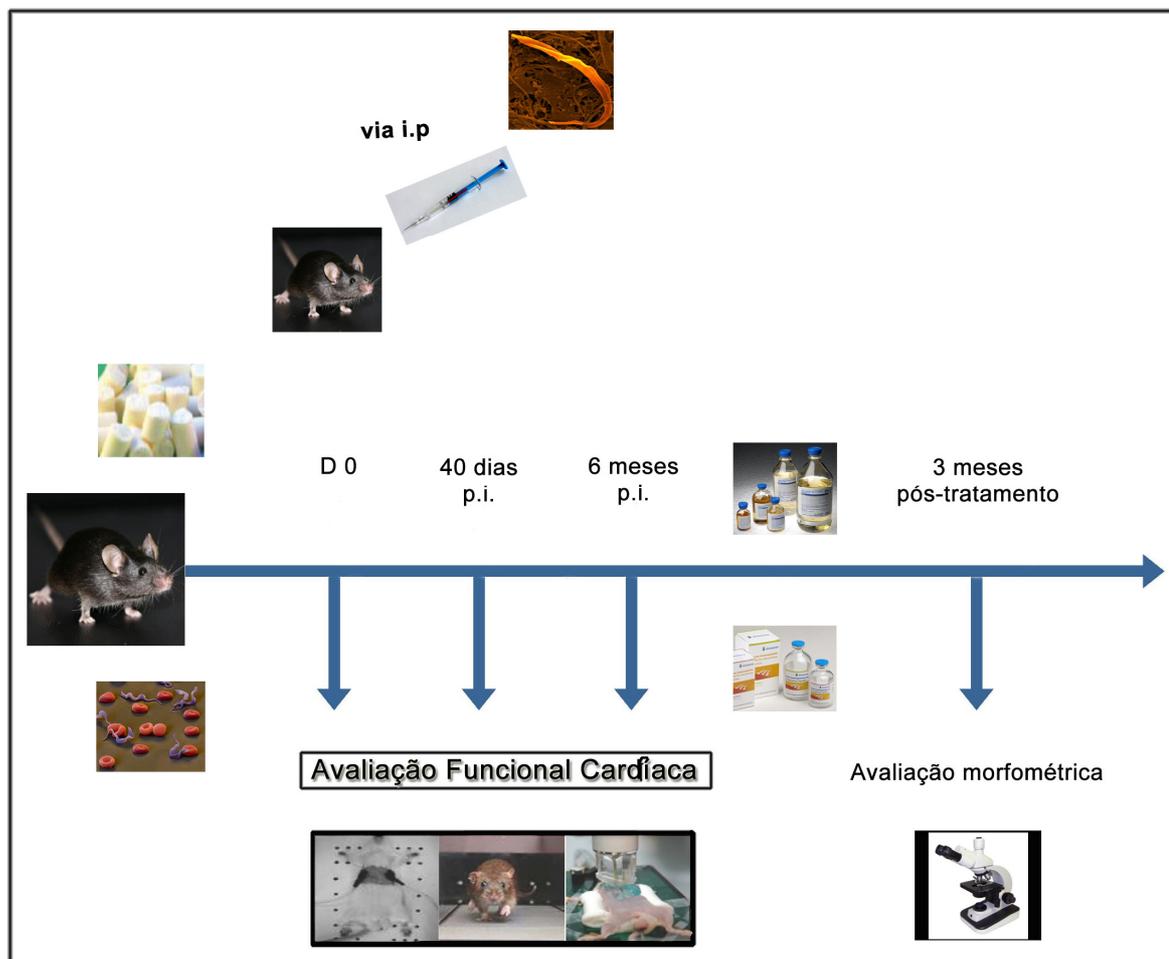


Figura 2: Desenho do estudo.

## 5.2. Animais

Trinta camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6 foram mantidos no biotério do CBTC (Centro de Biotecnologia e Terapia Celular) com água e comida *ad libitum*, sob condições ideais de temperatura e luminosidade. Todo o protocolo foi acompanhado por veterinário do biotério do CBTC, e as manipulações foram feitas de acordo com as normas de manipulação de animais do *National Institutes of Health* (NIH).

## 5.3. Infecção de camundongos por *T. cruzi*

Vinte camundongos fêmeas da linhagem C57BL/6, com 6 a 8 semanas de idade, foram inoculados por via intraperitoneal com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* (FEDERICI et al., 1964), obtidos do sobrenadante de cultura de células da linhagem LCC-MK2 infectadas. A avaliação da infecção aguda foi feita através da parasitemia periódica. Os níveis parasitêmicos dos camundongos infectados foram acompanhados a partir do 15º dia pós-infecção pela contagem em microscópio óptico dos parasitos presentes em 50 campos (magnitude de 400x), em uma lâmina contendo 5 µl de sangue periférico obtido da cauda do animal e coberto com uma lamínula 24 x 24 mm (MELO *et al.*, 1978).

#### **5.4. Imunoglobulina humana e tratamento**

A imunoglobulina humana foi produzida na Fundação HEMOPE (Fundação de Hematologia e Hemoterapia de Pernambuco), sob a coordenação da Dr<sup>a</sup>. Ana Cristina Lima Leite. Esta fundação foi criada em 1977 tendo caráter científico, educacional e assistencial, vinculada à Secretaria Estadual de Saúde do estado de Pernambuco.

Inicialmente foi feito o fracionamento por etanol à frio de lotes de plasma humano proveniente de doadores saudáveis aptos à doação de sangue. Os lotes foram submetidos a uma primeira etapa de precipitação utilizando álcool q.s.p 8% em pH 7,2 e temperatura de - 3º C para precipitação do fibrinogênio e lipoproteínas. O precipitado foi separado por centrifugação. O sobrenadante foi tratado com etanol q.s.p 19% pH 5,8 e temperatura de - 5º C para precipitação da fração bruta de imunoglobulinas com 75% de pureza. A separação dessa fração foi feita também por centrifugação.

Em seguida, foi feita a purificação com polietilenoglicol (PEG). A pasta bruta de imunoglobulinas foi ressolubilizada em solução tampão apropriada e posta para precipitar sob ação de polietilenoglicol (PEG) a 12%. Sob essa condição, a fração de imunoglobulina foi separada por centrifugação com pureza superior a 95%. Para a inativação viral solvente/detergente, o precipitado obtido pela ação do PEG foi solubilizado em água para injetável e concentrado a 10 g/L; nessa concentração, sofre ação de uma mistura de um solvente tri-n-butil fostato e um detergente, o cholato de sódio.

Finalmente, a purificação final foi feita por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), visando eliminar os agregados protéicos decorrentes da ação do etanol. O eluato da cromatografia foi submetido à ultra-filtração e formulado para se obter uma concentração final de 5 g/L. A preparação obtida foi analisada com eletroforese. A banda com mobilidade correspondente à fração gamaglobulina foi de 96.8%, dentro dos padrões da RDC nº46 (que solicita para IVIg acima de 95%). Desta fração de gamaglobulina, 96.5% correspondem à IgG. Foi feita uma preparação intravenosa a 5% em glicina 0,3 M.

Dez camundongos chagásicos crônicos (com 9 meses de infecção) foram alocados no grupo imunoglobulina (Ig), e receberam uma administração de 1 mg/Kg/dia de Ig em salina durante 5 dias, por via intraperitoneal. Outros 10 camundongos, com mesmo tempo de infecção, receberam solução contendo 1 mg/Kg/dia de albumina humana (Albumina Sérica Humana Normal à 20% - Baxter Bioscience) em salina durante 5 dias, também por via intraperitoneal. Os animais foram acompanhados durante este período para observar possíveis efeitos tóxicos dos tratamentos.

### **5.5. Avaliação eletrocardiográfica**

As análises do ECGs incluíram a mensuração da frequência cardíaca, além das medidas dos intervalos PR e QT corrigido (QTc), e a avaliação quanto à presença de distúrbios de condução e arritmias. A fim de minimizar as interferências do ambiente sobre os registros foi utilizado um filtro de corte de 0,1 a 1 Hz.

Como os ECGs de roedores não apresentam a onda T separada do complexo QRS (BESTETTI *et al.*, 1990), o intervalo QTc foi mensurado no lugar da duração do complexo QRS. O intervalo QT foi medido utilizando como referência o início do complexo QRS e o final da onda T. Para encontrar o QTc, utilizou-se a medida do QT dividida pela raiz quadrada do intervalo RR.

Após a indução de anestesia utilizando o sistema de isoflurano (0,5 a 2%), foi iniciada a aquisição dos registros eletrocardiográficos. Os registros de eletrocardiogramas foram adquiridos usando um equipamento Bio Amp PowerLab System (PowerLab 2/20;

ADInstruments, Castle Hill, Australia), que permite o registro de sinais biológicos em animais com total isolamento elétrico. Os dados foram adquiridos e armazenados em computador, e analisados no programa Chart 5 for Windows (Power Lab; ADInstruments, Castle Hill, Australia).

### **5.6. Avaliação funcional por ergometria**

Dentre os parâmetros que avaliam o grau de acometimento do coração na CCC, a tolerância ao esforço é o de maior significado. O teste ergoespirométrico é um exame importante na avaliação funcional cardíaca em geral. Quando comparados a indivíduos saudáveis, os pacientes cardiopatas habitualmente apresentam menor tempo de exercício e distância percorrida.

Quanto aos parâmetros espirométricos, no início do exercício, observa-se que a produção de  $\text{CO}_2$  aumenta linearmente com o consumo de  $\text{O}_2$ , mantendo uma relação  $\text{VCO}_2/\text{VO}_2$  (também chamada de quociente respiratório) próxima de 1. Com a progressão do esforço, a produção de  $\text{CO}_2$  ultrapassa o consumo de  $\text{O}_2$ , e começa a haver aumento do QR, que é um indicador do substrato energético utilizado pelo organismo.

Para os estudos de ergometria, foi utilizado o equipamento LE 8700 – CO (Panlab, Barcelona, Espanha), com fluxo de ar na câmara controlado por um trocador de gases (LE 400, Panlab). A amostra de gases foi levada por um circuito fechado ao analisador de gases (OXYLET 00, Panlab), sendo os dados enviados ao computador através de um amplificador contendo uma placa analógico-digital (ML 820, PowerLAB, ADInstruments, Austrália). Os dados foram armazenados em computador para análise no programa Chart 5 for Windows – Metabolism for PowerLab System.

Os animais foram colocados na esteira 20 minutos antes de iniciar o exercício. A velocidade inicial foi de 12 cm/s, com modificação do estágio a cada 5 minutos, com incrementos na velocidade de 6 cm/s. Os testes foram realizados até os animais entrarem em exaustão, caracterizada pela permanência por 5 segundos ou mais na área de choque. Os parâmetros avaliados foram tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final, estágio máximo alcançado, consumo de oxigênio, produção de dióxido de carbono, quociente respiratório e gasto energético.

### **5.7. Avaliação funcional por ecocardiograma transtorácico**

O ecocardiograma transtorácico é um exame complementar de baixo custo, que fornece informações fundamentais sobre a função ventricular esquerda e direita, sistólica e diastólica, sobre os volumes e diâmetros das cavidades cardíacas, sobre o funcionamento das válvulas, dentre outras. Na CCC, em sua forma dilatada, observa-se disfunção ventricular de grau variados, associada à dilatação de câmaras cardíacas, marcadamente do ventrículo esquerdo.

Para aquisição das imagens, foi utilizado equipamento desenhado para pequenos roedores, o Vevo da Visual Sonics (Toronto, Canadá), que dispõe de transdutor de 30 Mhz e propicia elevado detalhamento da anatomia cardíaca. Os exames foram gravados no disco rígido do próprio equipamento.

Para a realização do estudo ecocardiográfico, os animais foram anestesiados com isoflurano (0,5 a 2%) por via inalatória, sendo controlada a concentração do anestésico ofertado pela frequência cardíaca, que deveria manter-se acima de 350 bpm (STYPMANN *et al.*, 2007). Apesar de o anestésico deprimir a frequência cardíaca, a relação frequência cardíaca/fração de encurtamento mantém-se constante (ROTTMAN *et al.*, 2007). Anestesiado, o animal foi colocado em decúbito dorsal em mesa móvel, facilitando a aquisição da imagem nas diferentes janelas acústicas, e aquecida a 37° C, com o intuito de evitar hipotermia. A avaliação ecocardiográfica transtorácica foi realizada utilizando como ferramentas os modos unidimensional (modo-M) e bidimensional, e o *doppler* pulsado.

A função sistólica do ventrículo esquerdo (VE) foi avaliada utilizando as janelas paraesternal longitudinal, paraesternal transversal e paraesternal direita. O diâmetro ventricular foi mensurado em cinco ciclos cardíacos seguidos.

### **5.8. Avaliações histológica e morfométrica**

Após eutanásia dos animais, os corações e fragmentos de músculo esquelético foram removidos e fixados em formalina 4%, para processamento histológico. Secções dos corações e dos músculos dos animais foram coradas por hematoxilina e eosina e analisadas por microscopia de campo claro, para a contagem de células inflamatórias, ou por tricrômio de Masson, para a avaliação do percentual de fibrose.

As quantificações foram realizadas em cortes de coração inteiro depois de escaneamento das lâminas utilizando o sistema Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Vista, CA). As imagens foram analisadas com o programa Image Pro Plus (versão 7.0, Media Cybernetics, San Diego, CA).

### **5.9. Avaliação por imunofluorescência**

Secções de coração com cortes de 4 µm foram desparafinizadas (xilol 1 e 2 - 10 minutos cada), reidratadas (álcool absoluto, álcool 90%, álcool 70%, álcool 30% e água destilada - 5 minutos cada) e submetidas a recuperação antigênica em tampão citrato (Zymed, San Francisco, CA) a temperatura controlada (95° C - 98° C) por 20 minutos. Após esfriar, as lâminas foram lavadas em PBS, incubadas 10 minutos com *background blocker* (Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA) para bloqueio das ligações inespecíficas e incubadas com anti-IgG humana conjugada com Alexa Fluor 488 (1:200, Molecular Probes, MD, USA) por 12 h a 4° C. Posteriormente, as lâminas foram lavadas com PBS Tween 20 0,05%, contracoradas com azul de Evans 0,001% (10 minutos), e lavadas com PBS. As lâminas foram montadas com lamínulas de vidro utilizando-se o meio de montagem Vectashield (Vector Laboratories, Inc., Burlingame, CA) contendo DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) para marcação dos núcleos.

As quantificações foram realizadas em cortes de coração inteiro depois do escaneamento das lâminas utilizando o sistema Aperio ScanScope (Aperio Technologies, Vista). As imagens foram obtidas em microscópio confocal Fluoview 1000 (FV 1000, Olympus, Japão).

### **5.10. Avaliação das concentrações de citocinas**

O perfil de citocinas, produzido nos diferentes grupos experimentais, foi analisado em amostras de soro dos animais usando o kit Bio-Plex de citocinas para camundongos (Bio-Rad), de acordo com as instruções do fabricante. Foram analisadas as seguintes citocinas: IL-1 α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-17, Eotaxina, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ, KC, MIP-1 α, MIP-1 β, MCP-1, RANTES e TNF-α.

As amostras de soro, diluídas 1:4, assim como as citocinas recombinantes, foram incubadas com microesferas fluorescentes ligadas a anticorpos, e depois com o anticorpo de detecção conjugado com biotina, seguido de incubação com estreptavidina-ficoeritrina. As microesferas foram contadas no Sistema Bio-Plex 200 (Bio-Rad), sendo os dados analisados com auxílio do software Bio-Plex Manager.

Foram mensuradas as concentrações de TNF-α, IFN-γ e IL-10 em extrato de coração. As proteínas do coração foram extraídas de 100 mg de tecido/mL em solução salina e adicionados 0,4 mmol/L de cloreto de sódio, 0,05% Tween 20, e inibidores da protease (0,1

mmol/L de fenilmetilsulfonilfluoride, 0,1 mmol/L cloreto de benzetônio, 10 mmol/L de ácido etilenodiaminotetracético e 20-KI A/100 aprotinina mL). Posteriormente, as amostras foram centrifugadas por 10 min a 3000 g, com manutenção dos sobrenadantes congelados a 70<sup>o</sup> C. As concentrações de citocinas no extrato foram estimadas usando kits de ensaio imunoenzimático TNF-  $\alpha$ , IFN-  $\gamma$  e IL-10 (R & D Systems), de acordo com as instruções do fabricante. A reação foi revelada após incubação com conjugado de estreptavidina-peroxidase, seguido por detecção utilizando 3,3' 5,5' - tetrametylbenzidina e com realização da leitura em 450 nm.

### **5.10. Análise estatística**

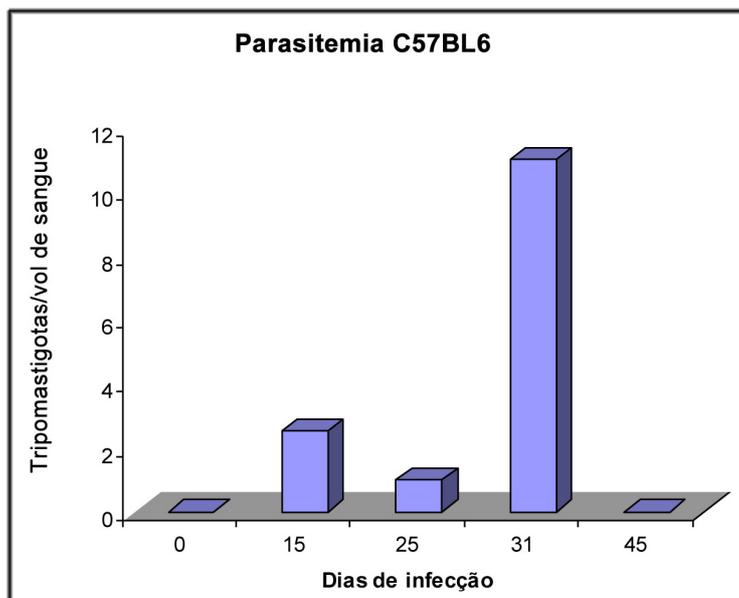
As variáveis eletrocardiográficas (IPR, QTc e FC) foram comparadas pelo one-way ANOVA com pós-teste Tukey nos grupos controle, albumina e imunoglobulina. O teste de Fisher foi utilizado para comparar a frequência da arritmia entre os animais tratados e não tratados com imunoglobulina. Variáveis ecocardiográficas, avaliadas sequencialmente no mesmo animal, foram comparadas entre os grupos por ANOVA de medidas repetidas (repeated measures) com o pós-teste Tukey nas avaliações ecocardiográficas. O teste t de *student* não pareado foi utilizado na ergometria, ecocardiografia e histopatologia para comparar os animais crônicos com os controles não infectados de mesma idade, e para comparar os animais chagásicos crônicos dos dois grupos. A avaliação das citocinas foi feita através do teste ANOVA seguido de teste de comparações múltiplas de Neuman-Keuls. Os resultados foram considerados significantes quando  $p < 0,05$ . Os dados obtidos foram avaliados considerando distribuição paramétrica com o auxílio dos programas Graphpad Prism 5 (2007) e BioCalc.

## 6. RESULTADOS

---

### 6.1. Caracterização do modelo de cardiomiopatia chagásica crônica

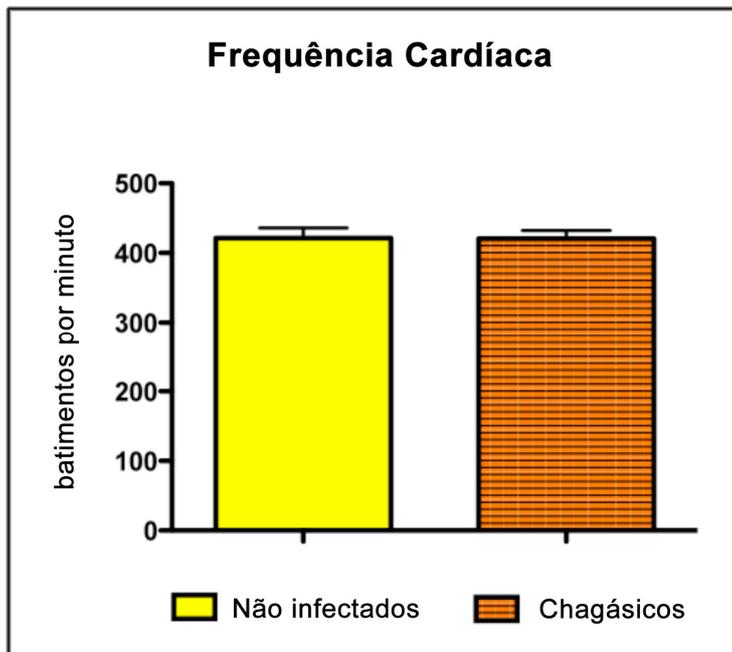
Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A avaliação da infecção aguda foi feita através da parasitemia periódica. A parasitemia dos camundongos infectados foi detectável a partir do 15<sup>o</sup> dia pós-infecção, tendo sido observado o pico de parasitemia por volta do 30<sup>o</sup> dia (Figura 3).



**Figura 3: Avaliação da infecção aguda pelo *T. cruzi* através da análise da parasitemia.** Camundongos da linhagem C57BL/6 foram infectados com 1000 tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi*. A contagem das formas tripomastigotas no sangue foi realizada em diferentes dias pós-infecção. Dados representam a mediana da parasitemia de 20 animais por ponto.

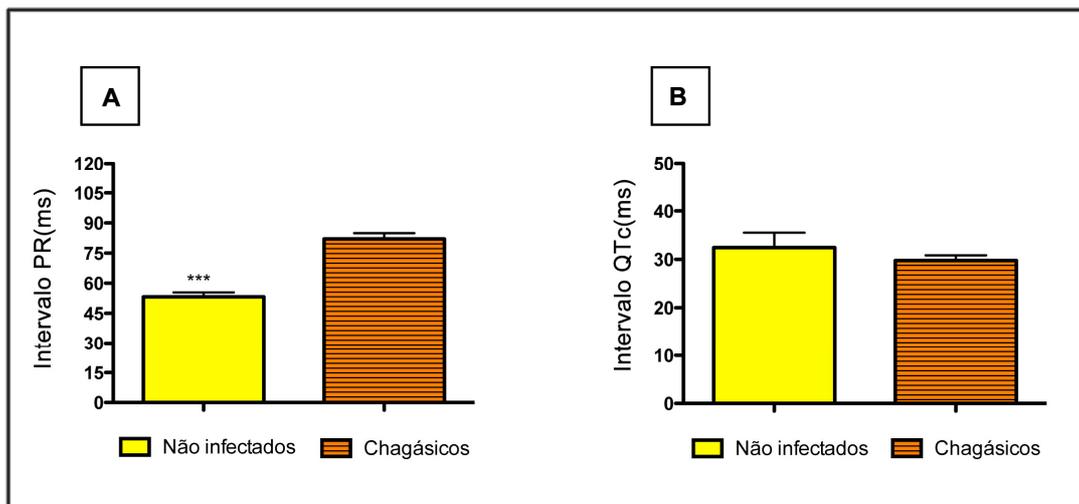
#### **6.1.1. Avaliações eletrocardiográficas**

Para esta análise foram utilizados os dados eletrocardiográficos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. Avaliada de forma isolada a frequência cardíaca (FC), entre os animais não infectados (n=9) e chagásicos (n=19), não observamos diferença com significância estatística, com FC:  $421,3 \pm 14,53$  bpm no grupo não infectado e FC:  $420,7 \pm 11,55$  bpm nos animais chagásicos (IC 95%: -39,71 - 0,41;  $p = 0,97$ ).



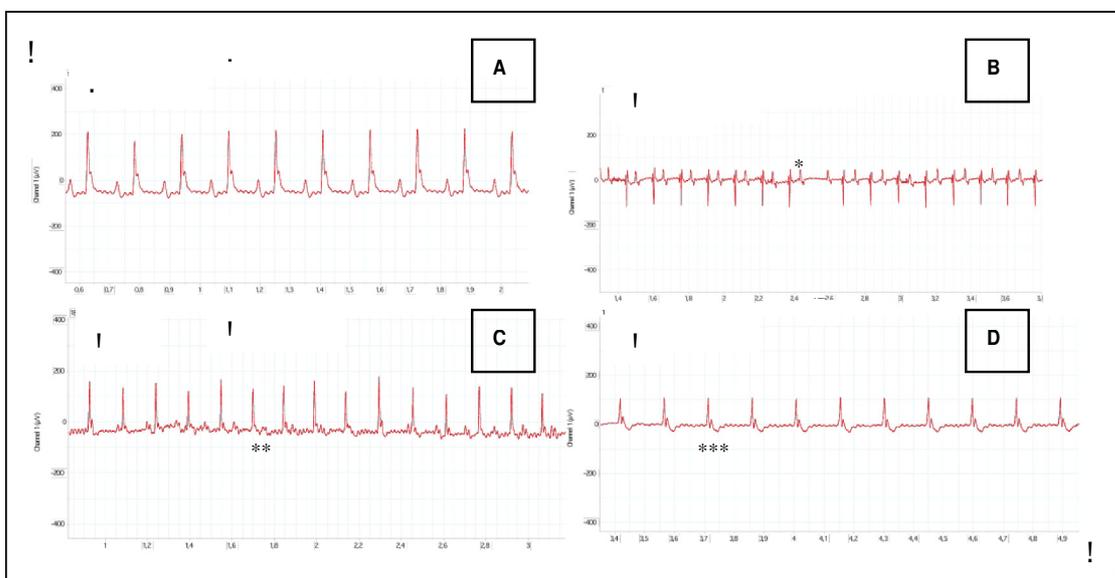
**Figura 4: Avaliação da frequência cardíaca em animais não infectados e chagásicos crônicos.** Resultados são expressos como a média  $\pm$  SEM de 9 dos animais não infectados e 19 animais chagásicos crônicos (6 meses pós infecção).

O prolongamento do intervalo PR, que indica o retardo na condução entre os átrios e os ventrículos, foi observado apenas nos animais chagásicos crônicos, que tiveram duração do intervalo PR maior do que os animais não-infectados ( $73,53 \pm 5,34$  ms  $\times$   $58,56 \pm 16,37$  ms; IC 95%= -32,93 - -2,98;  $p=0,098$ ), porém sem atingir significância estatística (Figura 5A). Não houve diferença entre os animais dos dois grupos quanto à duração do intervalo QTc ( $29,84 \pm 2,34$  ms  $\times$   $28,5 \pm 3,11$  ms; IC 95%= -9,43-6,74;  $p=0,73$ ) (Figura 5B).

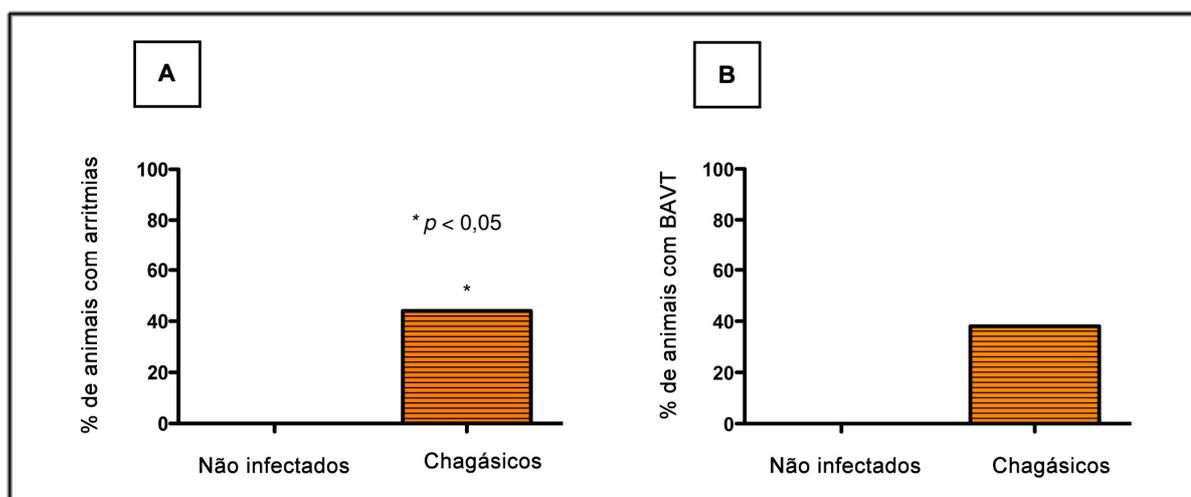


**Figura 5: Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais não infectados e chagásicos crônicos.** Duração do intervalo PR (A) e do intervalo QTc (B) nos camundongos não-infectados e chagásicos (6 meses pós-infecção). Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 9 dos animais não infectados e 19 animais dos animais chagásicos.

Os animais não-infectados (n=9) não apresentaram arritmias cardíacas as quais foram observadas nos animais chagásicos crônicos. Dos 19 animais infectados crônicos 3 evoluíram para ritmo de BAVT e 5 evoluíram com diversas bradiarritmias (Figuras 6 e 7).



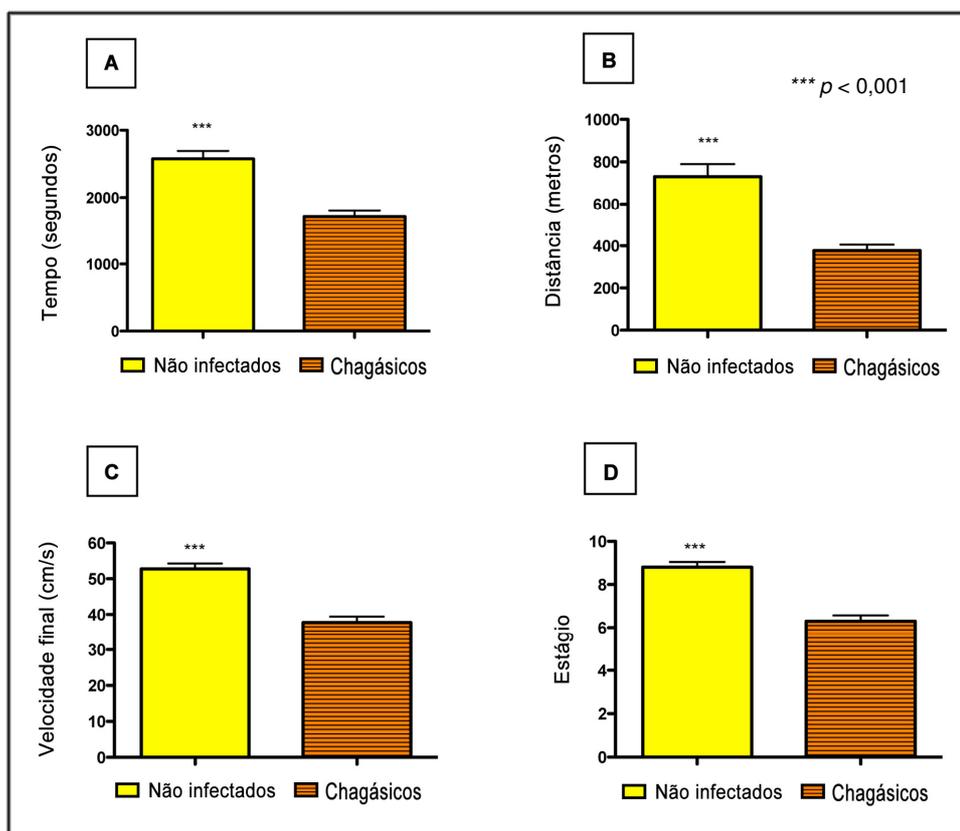
**Figura 6: Traçados eletrocardiográficos.** (A) ECG de camundongo não-infectado. Observam-se todos os complexos QRS precedidos por onda P, com intervalo PR normal. (B) ECG de camundongo chagásico, com evidência de BAV de 2º grau Mobitz tipo II. Os intervalos PRs são constantes, com presença de uma onda P bloqueada (\*), não seguida de QRS. (C) ECG de camundongo chagásico, com evidência de BAV de 3º grau, no qual onda P (\*\*) e QRS não se correlacionam; os átrios e os ventrículos estão dissociados. (D) ECG de camundongo chagásico, com evidência de ritmo juncional, no qual se observa onda P (\*\*\*) retrógrada, localizada após o QRS.



**Figura 7: Avaliação de arritmias entre animais não-infectados e chagásicos crônicos.** Percentual de arritmias (A) e BAVT (B) nos camundongos não-infectados e em chagásicos crônicos (6 meses). Resultados expressos em percentuais de 9 dos animais não infectados e 19 animais dos animais chagásicos.

### 6.1.2. Avaliações ergométricas e respirométricas

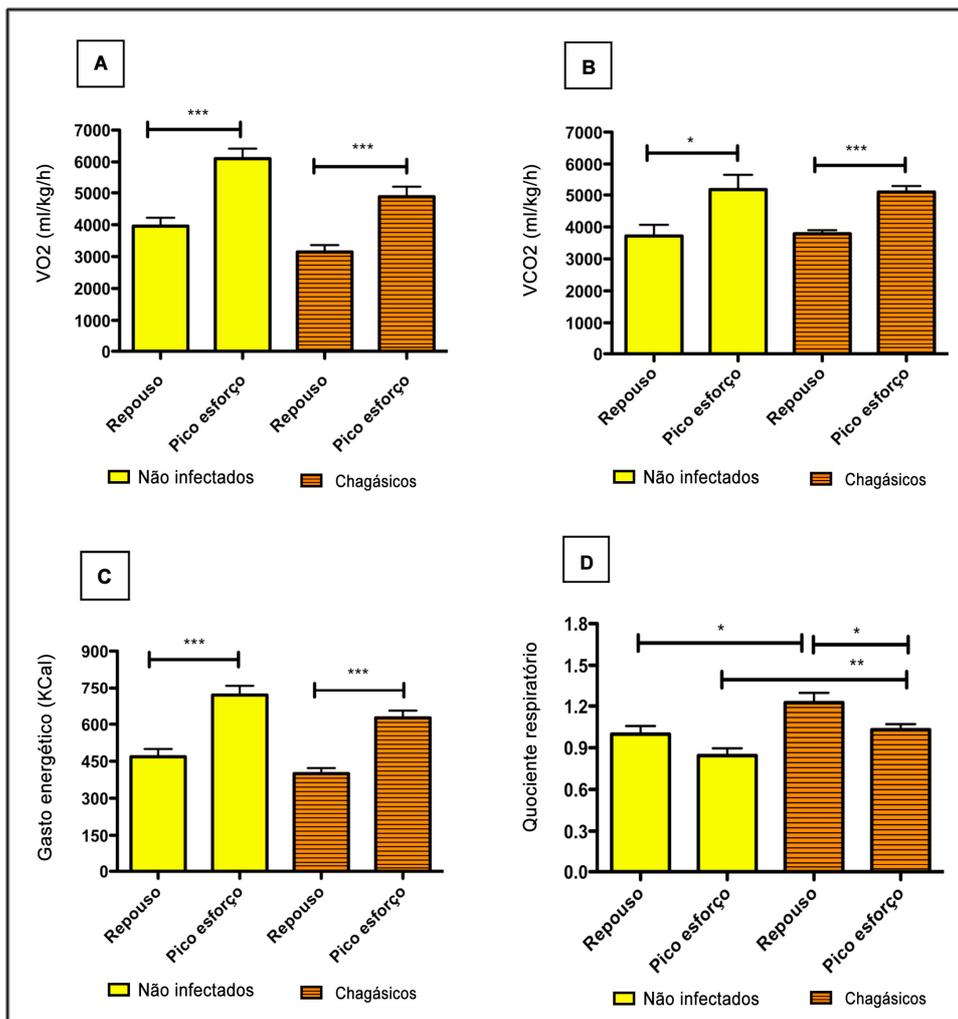
Para esta análise foram utilizados os dados eletrocardiográficos e respirométricos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. O tempo de exercício ( $2.577 \pm 117,3$  s  $\times$   $1.688 \pm 83,95$  s; IC 95%: 587,1-1.190;  $p = <0,0001$ ), a distância percorrida ( $730,4 \pm 59,19$  m  $\times$   $348,6 \pm 25,73$  m; IC95%: 269,7-493,8;  $p = <0,0001$ ), o estágio alcançado ( $8,8 \pm 0,25$   $\times$   $6,18 \pm 0,28$ ; IC95%:1,69-3,55;  $p = <0,0001$ ) e a velocidade final atingida ( $52,8 \pm 1,50$  cm/s  $\times$   $37,09 \pm 1,70$  cm/s; IC95%:10,12-21,3;  $p = <0,0001$ ) foram significativamente maiores entre os animais não-infectados, quando comparados aos animais chagásicos (Figura 8).



**Figura 8: Avaliação dos dados ergométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos (6 meses pós-infecção).** (A) Tempo de exercício. (B) Distância percorrida. (C) Velocidade final alcançada. (D) Estágio máximo atingido. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 9 dos animais não infectados e 19 animais dos animais chagásicos.

Os animais não infectados e chagásicos tiveram um aumento nos valores de  $VO_2$ ,  $VCO_2$  e gasto energético com a progressão do esforço, com significância estatística, porém não foi detectada diferença entre os dois grupos nestes parâmetros. Os valores de quociente respiratório (QR), tanto em repouso quanto no pico do esforço, foram maiores nos animais chagásicos, que tiveram uma discreta queda no QR no pico do esforço, o que não ocorreu nos animais não-infectados (Figura 9).

\*  $p < 0,05$   
 \*\*  $p < 0,01$   
 \*\*\*  $p < 0,0001$

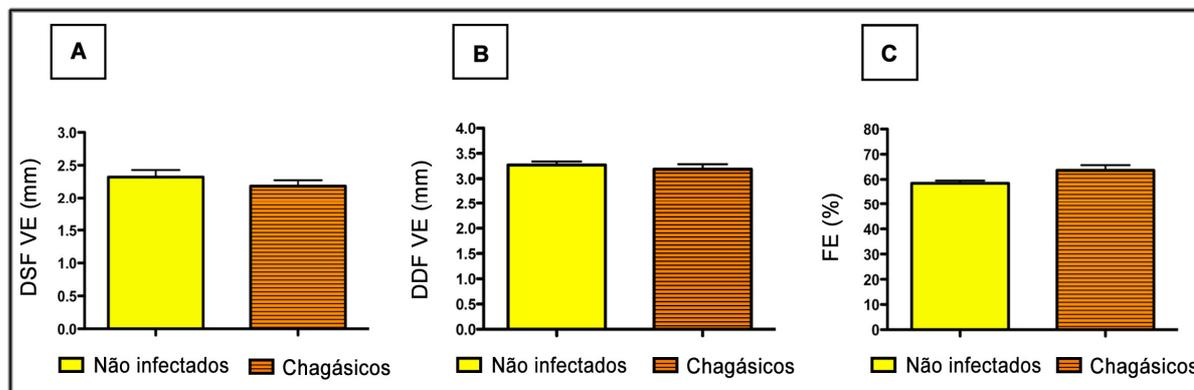


**Figura 9: Avaliação dos dados respirométricos em animais não-infectados e chagásicos crônicos.** (A) VO<sub>2</sub>. (B) VCO<sub>2</sub>. (C) Gasto energético. (D) Quociente respiratório. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais não infectados e 18 animais dos animais chagásicos.

### 6.1.3. Avaliações ecocardiográficas

Para esta análise foram utilizados os dados ecocardiográficos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. Não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre o grupo de camundongos não-infectados e o de chagásicos crônicos, quando avaliados fração de ejeção ( $63,89 \pm 3,68 \% \times 66,5 \pm 3,39 \%$ ; IC95%:-14,33-9,11;  $p=0,64$ ), diâmetro diastólico ( $3,27 \pm 0,07 \text{ mm} \times 3,05 \pm 0,07 \text{ mm}$ ; IC95%:-0,02-0,44;  $p=0,07$ ) e diâmetro sistólico ( $2,32 \pm 0,10 \text{ mm} \times 1,94 \pm 0,08 \text{ mm}$ ; IC95%: 0,09-0,65;

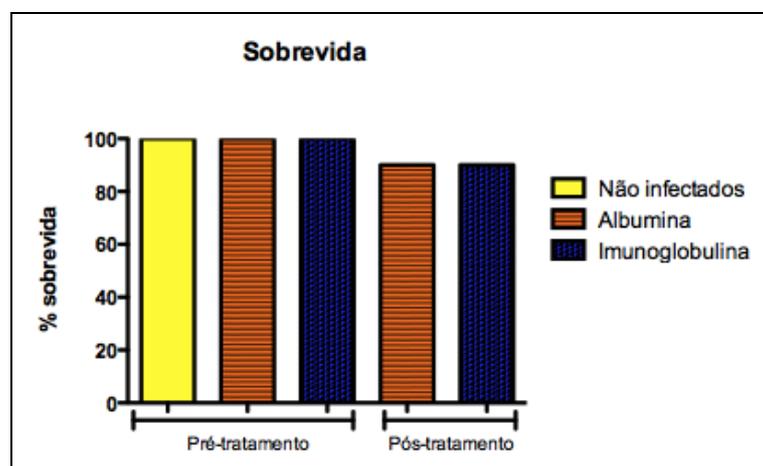
$p=0,06$ ) do ventrículo esquerdo (Figura 10), evidenciando que neste modelo os animais não evoluem com dilatação ventricular e disfunção sistólica.



**Figura 10: Avaliação dos parâmetros ecocardiográficos em animais não-infectados e chagásicos crônicos.** Diâmetros sistólico (A) e diastólico (B) finais do ventrículo esquerdo. (C) Fração de ejeção. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais não infectados e 18 animais dos animais chagásicos.

## 6.2. Avaliação dos efeitos da terapia com imunoglobulina

Os animais chagásicos foram divididos em dois grupos, sendo que um recebeu albumina e o outro imunoglobulina G humana, ambos por via intraperitoneal. Dos 20 animais iniciais (10 grupo albumina e 10 grupo imunoglobulina) ocorreram 02 óbitos, sendo 01 em cada grupo, assim, restando 18 animais para serem avaliados. As avaliações cardiológicas foram repetidas nos 18 animais chagásicos após 120 dias da infusão de albumina ou imunoglobulina (Figura 11).

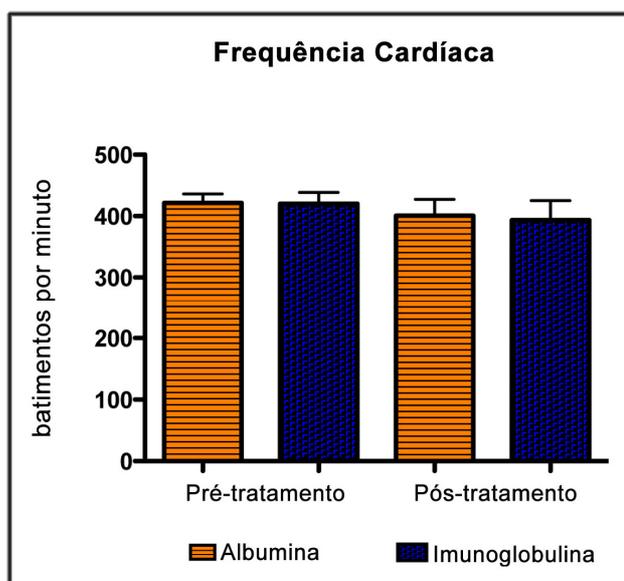


**Figura 11: Sobrevida dos animais não-infectados e chagásicos crônicos do grupo albumina e do grupo imunoglobulina.** Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais não infectados e 18 animais dos animais chagásicos.

### 6.2.1. Avaliações de função cardíaca

#### 6.2.1.1. Resultados eletrocardiográficos

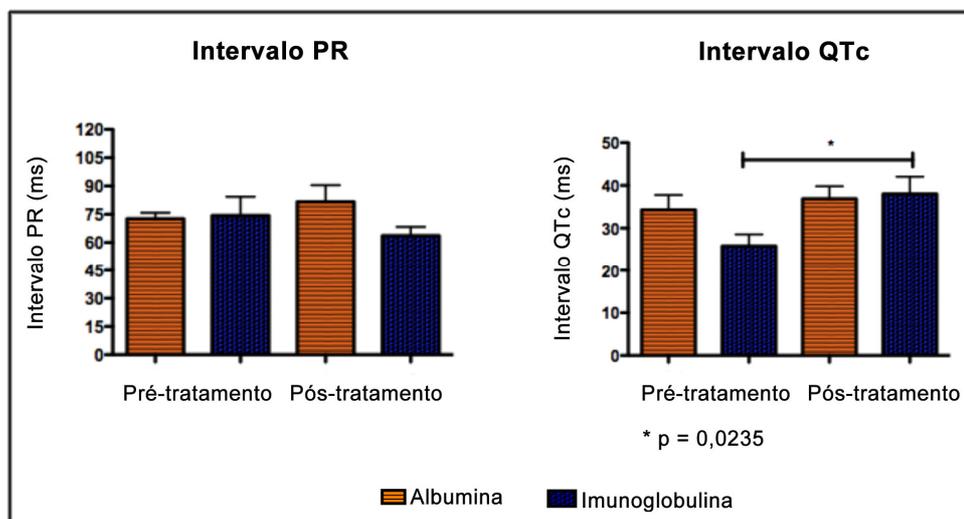
Para esta análise foram utilizados os dados eletrocardiográficos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. À avaliação da frequência cardíaca, entre os animais chagásicos tratados com albumina e imunoglobulina (Figura 12), não foi observado diferença com significância estatística com FC:  $421,3 \pm 14,53$  bpm no grupo albumina e FC:  $420,1 \pm 18,49$  bpm no grupo imunoglobulina (IC 95%: -40,18 – 52,65;  $p = 0,95$ ).



**Fig. 12. Avaliação da frequência cardíaca em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina.** Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

Também, não houve diferença com significância estatística, quando avaliado o intervalo PR, entre os animais chagásicos tratados com albumina, quando comparados entre si ( $72,3 \pm 3,26$  ms  $\times$   $81,5 \pm 8,84$  ms; IC95%:-27,31-9,55;  $p=0,31$ ), ou no grupo imunoglobulina no pré e pós tratamento ( $74,3 \pm 9,97$  ms  $\times$   $63,6 \pm 4,70$  ms; IC95%:-29,4-50,77;  $p=0,56$ ). Entretanto, houve influência da terapia com imunoglobulina no prolongamento do intervalo

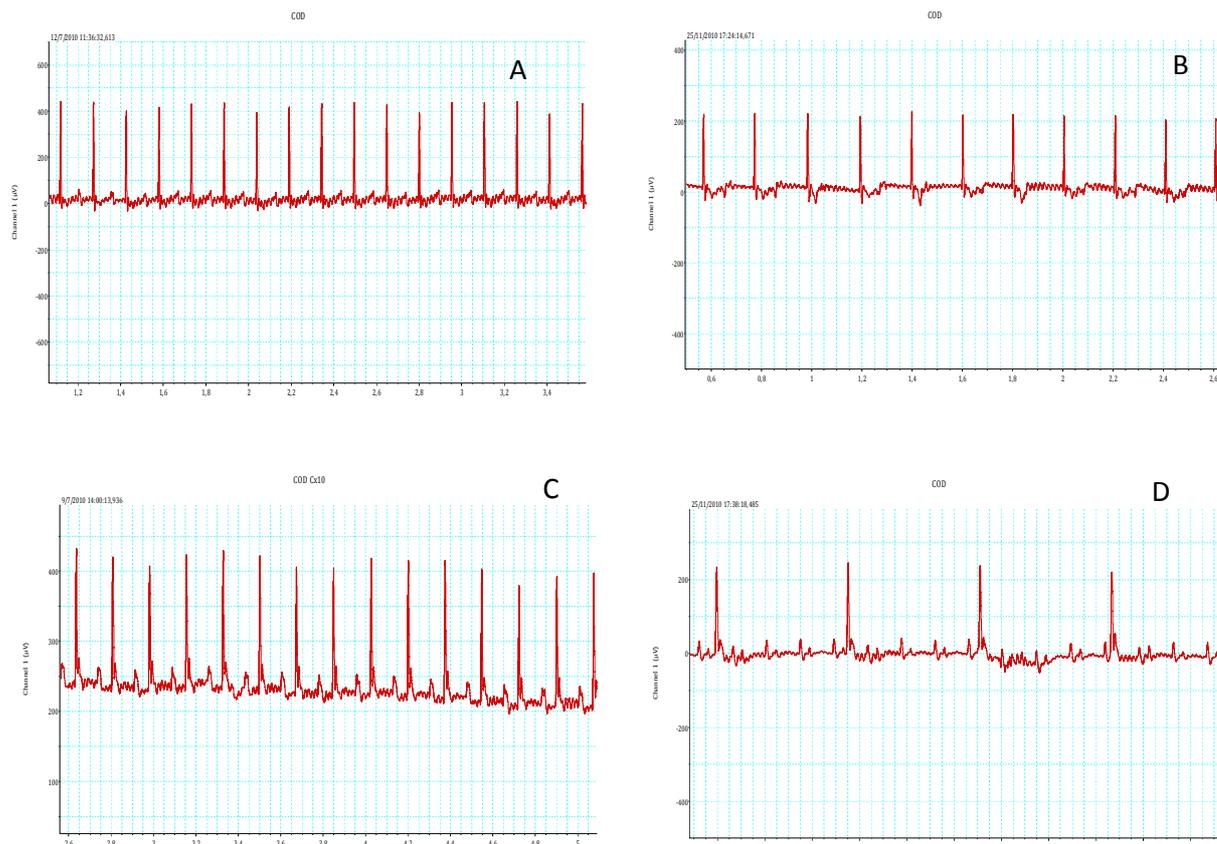
QTc, quando avaliado este grupo nas fases pré e pós-tratamento ( $25,8 \pm 2,76$  ms  $\times$   $38,0 \pm 4,08$  ms; IC95%:-22,5- -1,84;  $p=0,02$ ) (Figura 13).



**Fig. 13. Avaliação dos intervalos eletrocardiográficos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina.** Duração do intervalo PR (A) e do intervalo QTc (B) nos camundongos chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina nas fases pré- (6 m.p.i) e pós-tratamento (8 m.p.i). Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

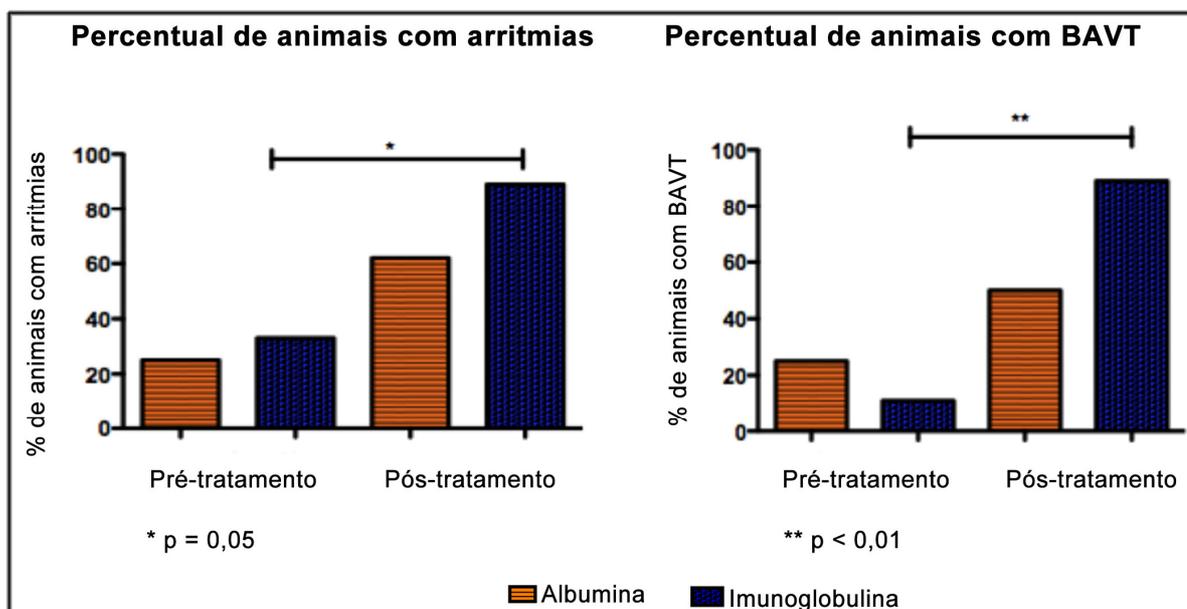
No grupo albumina, dos 09 camundongos analisados, 07 inicialmente encontravam-se em ritmo sinusal e 2 animais em BAVT. Após o uso da albumina, apenas 04 dos 07 animais mantiveram-se em ritmo sinusal. Dos 05 animais restantes, 02 permaneceram em BAVT, 01 animal evoluiu para ritmo juncional e 02 para BAVT, totalizando 05 animais com progressão doença de doença arritmica (Figura 14).

No grupo imunoglobulina, dos 09 animais analisados, 06 inicialmente encontravam-se em ritmo sinusal, 02 animais em BAV 2<sup>o</sup> grau Mobitz II, e 1 em BAVT. Após o uso de imunoglobulina apenas 01 animal manteve-se em ritmo sinusal, sendo observada a progressão da doença arritmica nos 08 animais restantes que evoluíram para ritmo de BAVT (Figura 15).



**Figura 14: Traçados eletrocardiográficos de animais chagásicos crônicos.** ECG de camundongo albumina pré-tratamento, em ritmo sinusal (A) e pós-tratamento, em BAVT (B). ECG de camundongo imunoglobulina pré-tratamento, em ritmo sinusal (C) e pós-tratamento, em BAVT (D).

As diferenças entre os percentuais de arritmias em geral e de BAVT não atingiram significância estatística quando comparados os grupos tratado com albumina ou com imunoglobulina. Porém, foi evidenciado maior ocorrência de arritmias nos animais tratados com imunoglobulina entre as fases pré e pós tratamento (Figura 15).



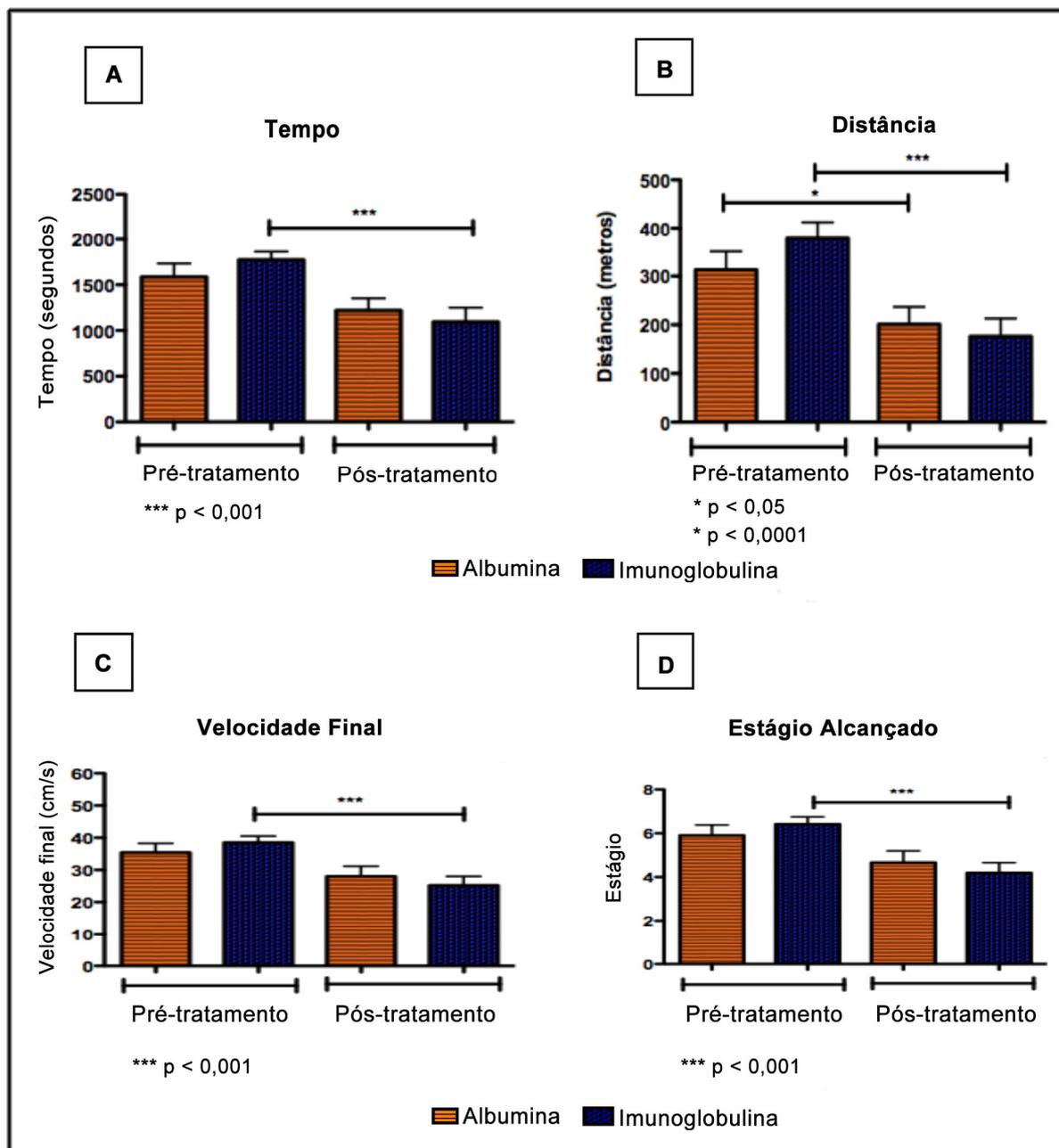
**Figura 15: Avaliação de arritmias em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina nas diferentes fases do tratamento.** Percentual de arritmias (A) e BAVT (B) nos camundongos chagásicos nas fases pré- (6 m.p.i) e pós-tratamento (8 m.p.i). Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

### 6.2.1.2. Resultados da avaliação funcional ergométrica e respirométrica

Para esta análise foram utilizados os dados dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. Quando considerados os parâmetros de tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final e estágio máximo alcançado, observamos uma diferença com significância estatística entre os animais chagásicos dos dois grupos, com importante piora funcional nos animais tratados com imunoglobulina (Figura 16).

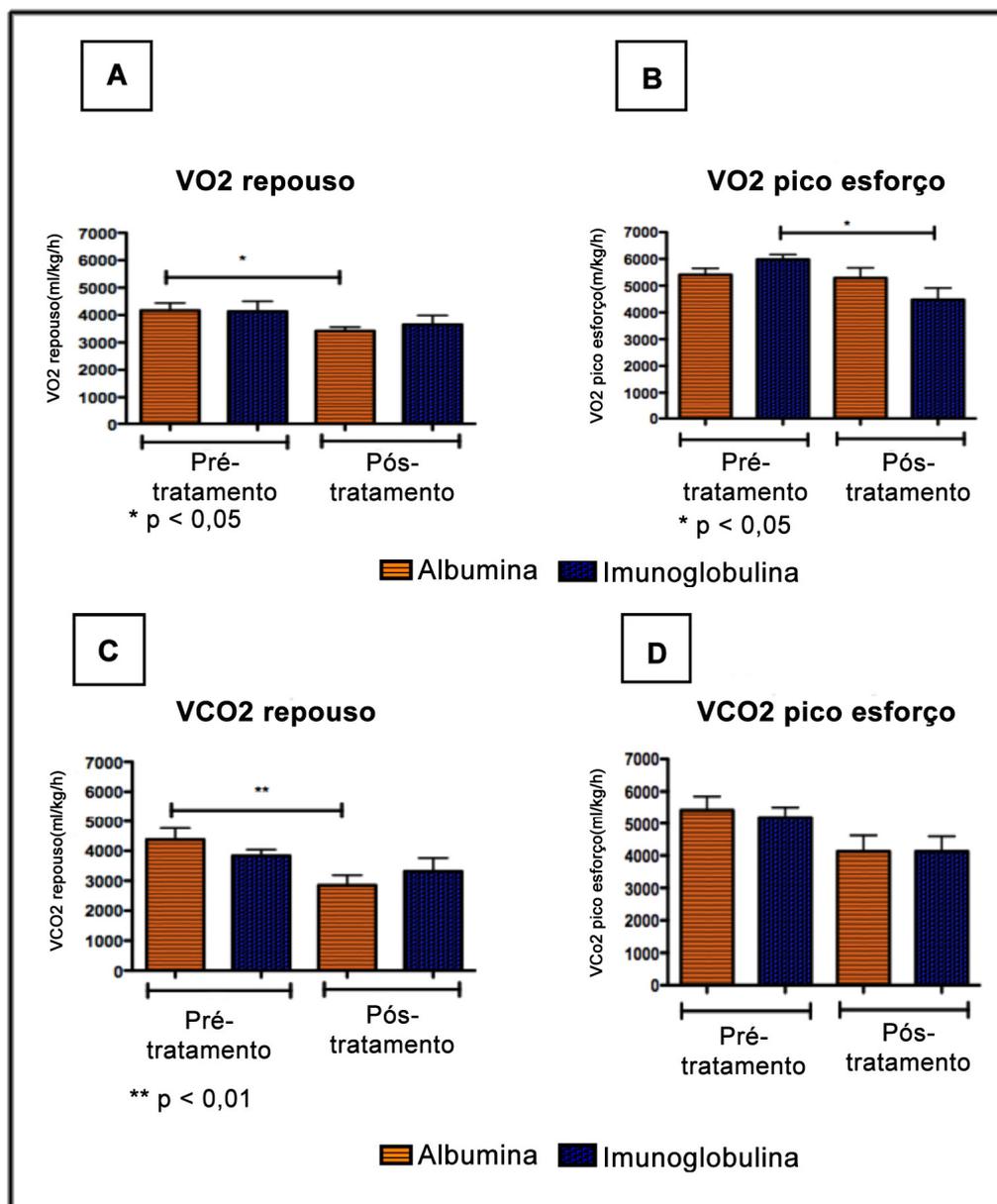
Nos animais tratados com imunoglobulina, observamos uma redução significativa do tempo de exercício ( $1774 \pm 91,06$  s  $\times$   $1096 \pm 156,1$  s; IC95%: 315,8-1040;  $p < 0,001$ ), distância percorrida ( $378,3 \pm 34,0$  m  $\times$   $175,9 \pm 37,0$  m; IC95%: 97,34-307,3;  $p < 0,001$ ), velocidade final alcançada ( $38,5 \pm 2,01$  cm/s  $\times$   $25,2 \pm 2,80$  cm/s; IC95%: 6,26-20,34;  $p < 0,001$ ) e estágio final ( $6,41 \pm 0,33$   $\times$   $4,20 \pm 0,46$ ; IC95%: 1,04-3,39;  $p < 0,001$ ) quando comparamos pré e pós

uso da terapia com imunoglobulina humana. Entretanto, não evidenciamos uma redução significativa dos parâmetros acima mencionados (tempo de exercício, velocidade final e do estágio máximo alcançado) no grupo albumina.



**Figura 16: Avaliação dos dados ergométricos em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina.** (A) Tempo de exercício. (B) Distância percorrida. (C) Velocidade final alcançada. (D) Estágio máximo atingido. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

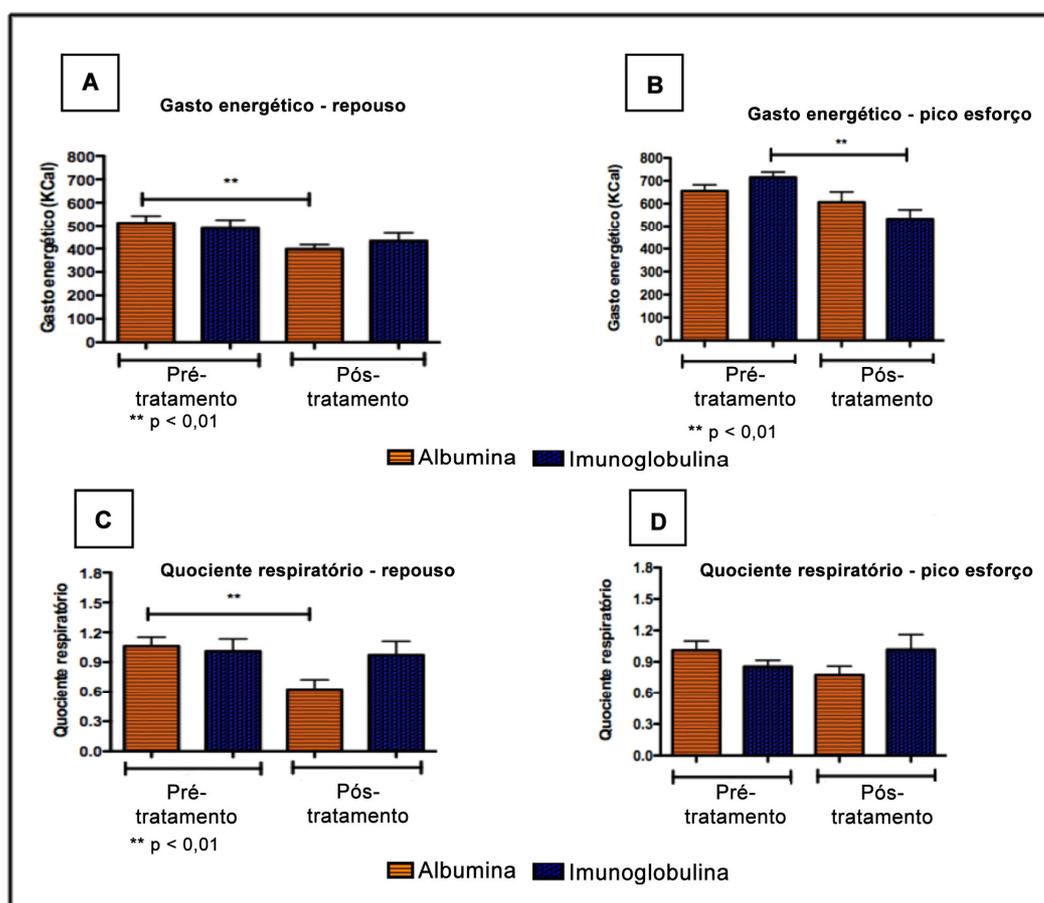
O grupo imunoglobulina evoluiu com redução do  $VO_2$  no pico do esforço ( $5981 \pm 185,2$  ml/Kg/h  $\times$   $4479 \pm 436,7$  ml/Kg/h; IC95%:403,9-2600;  $p < 0,05$ ), com significância estatística, não sendo observado alterações no grupo albumina (Figura 17).



**Figura 17: Avaliação de  $VO_2$  e  $VCO_2$  em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina.**  $VO_2$  de repouso (A) e de pico do esforço (B).  $VCO_2$  de repouso (C) e de pico do esforço (D). Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

Quanto à produção de dióxido de carbono, pôde-se observar queda acentuada no  $VCO_2$  em repouso no grupo albumina, não sendo evidenciadas alterações significativas no grupo tratado com imunoglobulina (Figura 17).

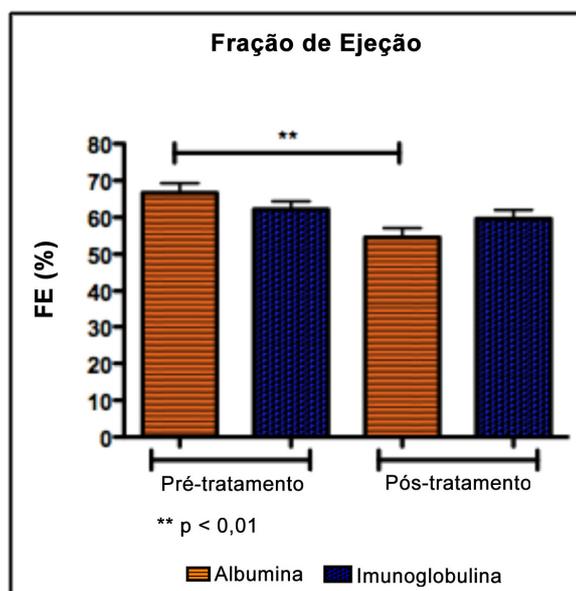
Os animais de ambos os grupos apresentaram gasto energético similar em repouso, porém com piora do gasto energético no pico do esforço no grupo tratado com imunoglobulina ( $715,3 \pm 23,2$  Kcal  $\times$   $532,1 \pm 40,8$  Kcal; IC95%: 76,3-290;  $p < 0,001$ ), não sendo evidenciadas variações no grupo albumina. Observou-se ainda queda do quociente respiratório nos dois grupos, sem significância estatística no pico do esforço (Figura 18).



**Figura 18: Avaliação de gasto energético e quociente respiratório em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina.** Gasto energético em repouso (A) e no pico do esforço (B). Quociente respiratório em repouso (C) e no pico do esforço (D). Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

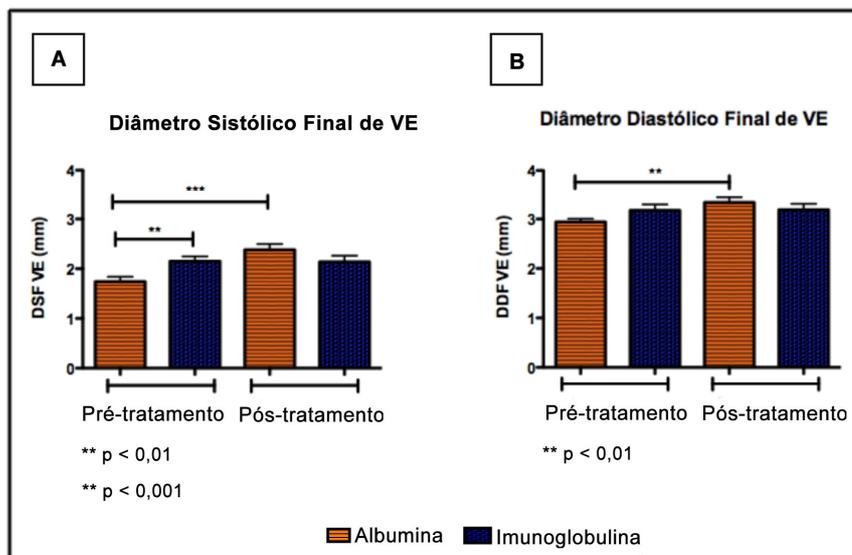
### 6.2.1.3. Resultados ecocardiográficos

Para esta análise foram utilizados os dados ecocardiográficos dos animais cujos traçados permitiram avaliação acurada dos intervalos medidos. Foi evidenciada uma queda da fração de ejeção mensurada ao ecocardiograma em ambos os grupos, porém com significância estatística apenas no grupo albumina ( $66,6 \pm 2,65 \% \times 54,5 \pm 2,54 \%$ ; IC95%: 4,27-19,89;  $p < 0,01$ ) (Figura 19).



**Figura 19: Avaliação da fração de ejeção mensurada pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina.** Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

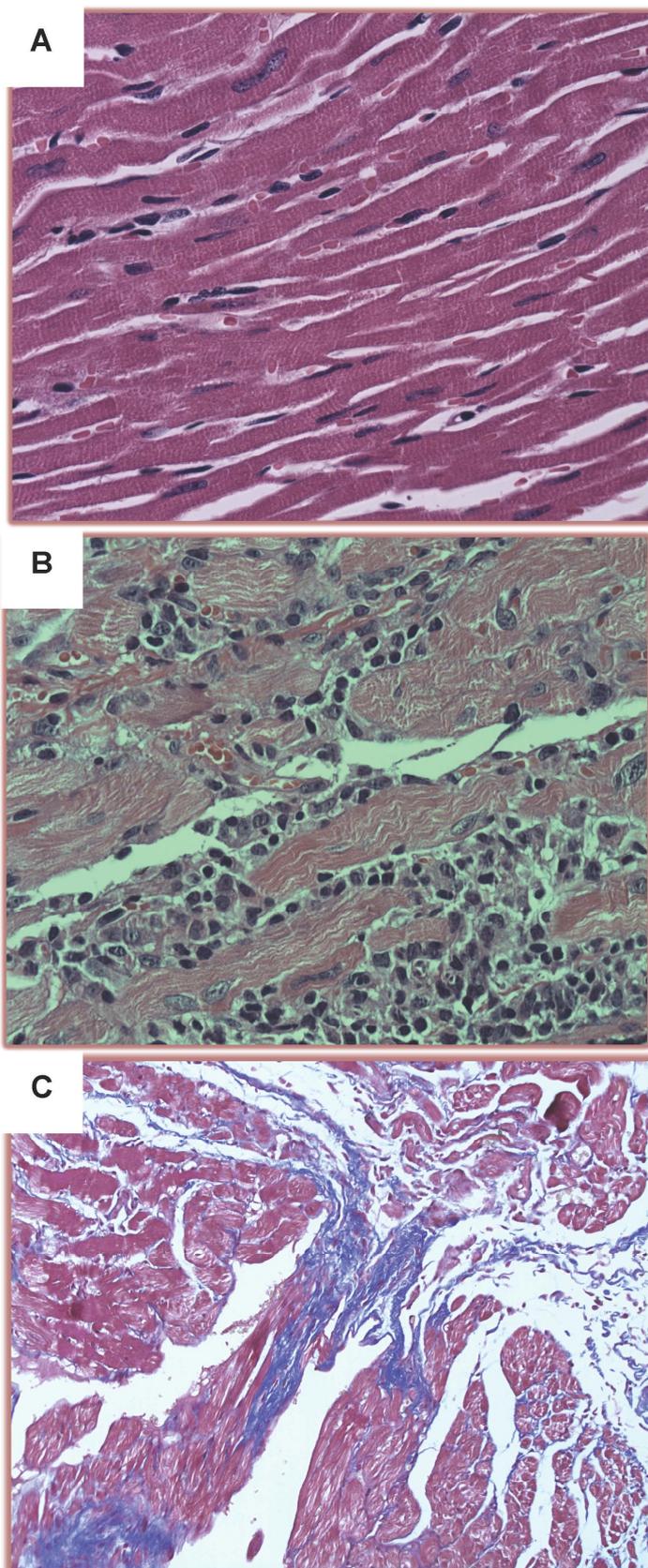
Quando da avaliação dos diâmetros sistólico e diastólico final do ventrículo esquerdo não observamos alterações no grupo imunoglobulina, porém ganho significativo desses volumes no grupo albumina (Figura 20).



**Figura 20: Avaliação dos diâmetros sistólico e diastólico final do VE mensurados pelo ecocardiograma em animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina.** Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

### **6.2.3. Avaliações histológicas e morfológicas.**

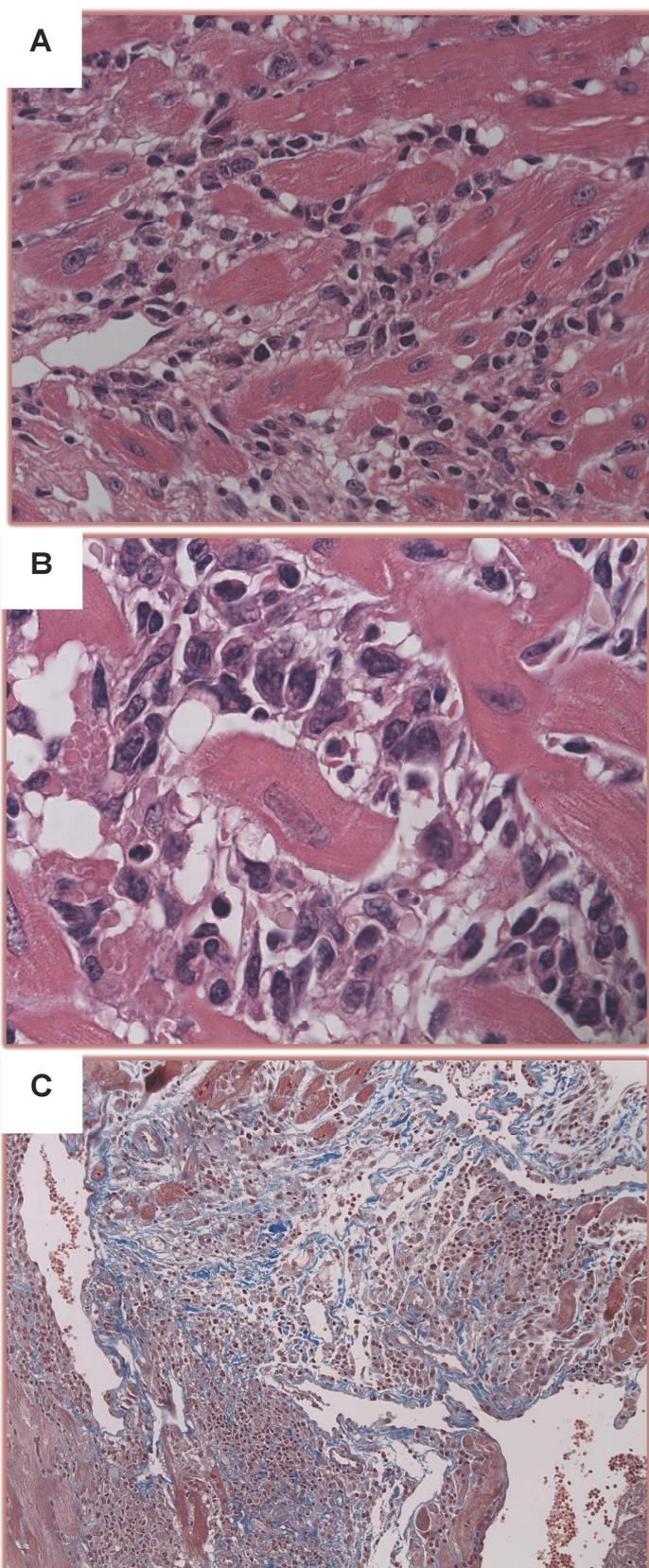
Secções de corações de camundongos chagásicos crônicos apresentaram alterações histológicas características da cardiomiopatia chagásica crônica (Figura 21), com evidência de infiltrados inflamatórios focais e disseminados compostos predominantemente por células mononucleares, miocitólise, mionecrose e fibrose. Na figura 21A, um corte de coração normal, com coloração por hematoxilina e eosina, mostra fibras cardíacas sem alterações morfológicas e/ou inflamatórias. A figura 21B mostra corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, com coloração por hematoxilina e eosina, evidenciando intenso infiltrado inflamatório multifocal produzido por células mononucleares, frequentemente aderidas a fibras cardíacas, produzindo lesões miocitolíticas nas mesmas. Na figura 21C, observa-se corte de coração chagásico crônico tratado com albumina, com coloração por tricrômio de Masson, evidenciando aumento de deposição de colágeno no interstício das fibras cardíacas.



**Figura 21: Histologia de seções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina. (A), Corte de coração normal, coloração pela H&E, mostrando fibras cardíacas sem alterações morfológicas e ou inflamatórias. Aumento de 60x.**

**(B), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração por H&E, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas a fibras cardíacas, produzindo lesões miocitolíticas. Aumento 60x.**

**(C), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração por tricrômio de Masson, mostrando, em azul, a proliferação colágena no interstício de fibras cardíacas. Aumento 20x.**



**Figura 22: Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina.**

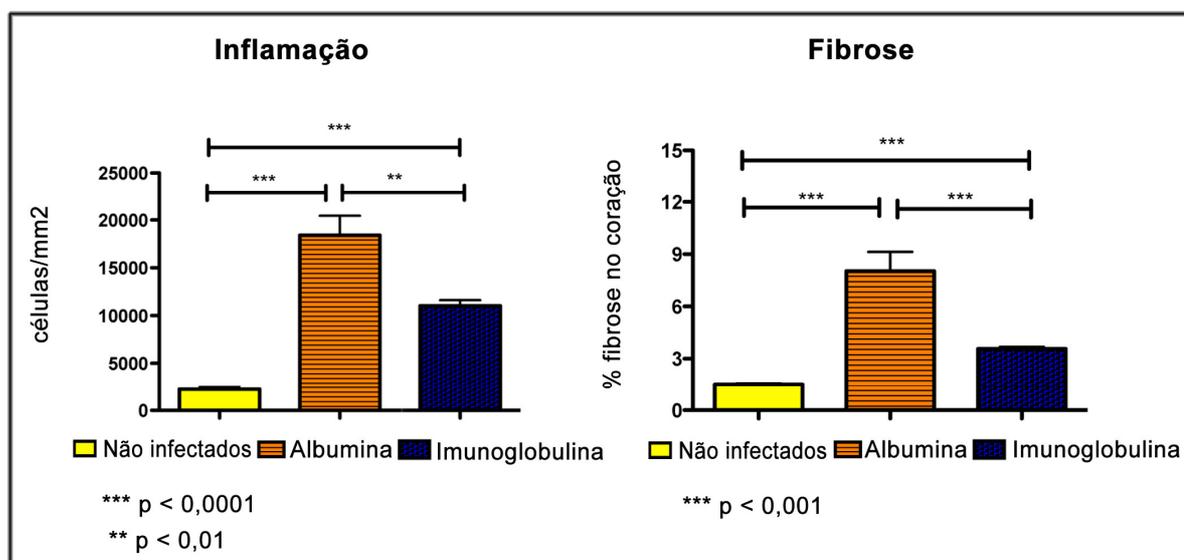
**(A)**, Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por H&E, mostrando infiltrado inflamatório focal intenso e agressivo, por células mononucleares, produzindo lesões miocitolíticas em células cardíacas. Aumento de 60x.

**(B)**, Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por H&E, mostrando infiltrado inflamatório focal intenso e agressivo, por células mononucleares, produzindo destruição e amputação de uma fibra cardíaca. Aumento 100x.

**(C)**, Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por tricrômio de Masson, mostrando, em azul, fibrose difusa em área com cardite multifocal, por células mononucleares. Aumento 20x.

A avaliação histológica do coração dos animais chagásicos crônicos tratados com imunoglobulina (Figura 22) mostra infiltrado inflamatório focal intenso e agressivo, por células mononucleares, produzindo lesões miocitolíticas (Figura 22A). Na figura 22B é evidenciado a agressividade o processo inflamatório traduzido por destruição e amputação de fibra cardíaca. Na figura 22C evidenciamos fibrose difusa em coração de animal chagásico crônico tratado com imunoglobulina.

Ao avaliar por morfometria a inflamação e fibrose de forma comparativa, entre os dois grupos de animais chagásicos, observamos uma redução tanto de fibrose e inflamação nos animais tratados com imunoglobulina. Ocorreu uma redução substancial da área de fibrose nos animais chagásicos tratados com imunoglobulina comparados aos tratados com albumina ( $3,56 \pm 0,11\% \times 8,032 \pm 1,09\%$ ; IC 95%: 2,24-6,69;  $p = <0,001$ ) com significância estatística. Avaliando isoladamente inflamação também observamos uma redução significativa na comparação dos dois grupos ( $11.039 \pm 569,3 \text{ células/mm}^2 \times 18.410 \pm 20303 \text{ células/mm}^2$ ; IC95%:2902-11840;  $p = <0,001$ ) (Figura 23).



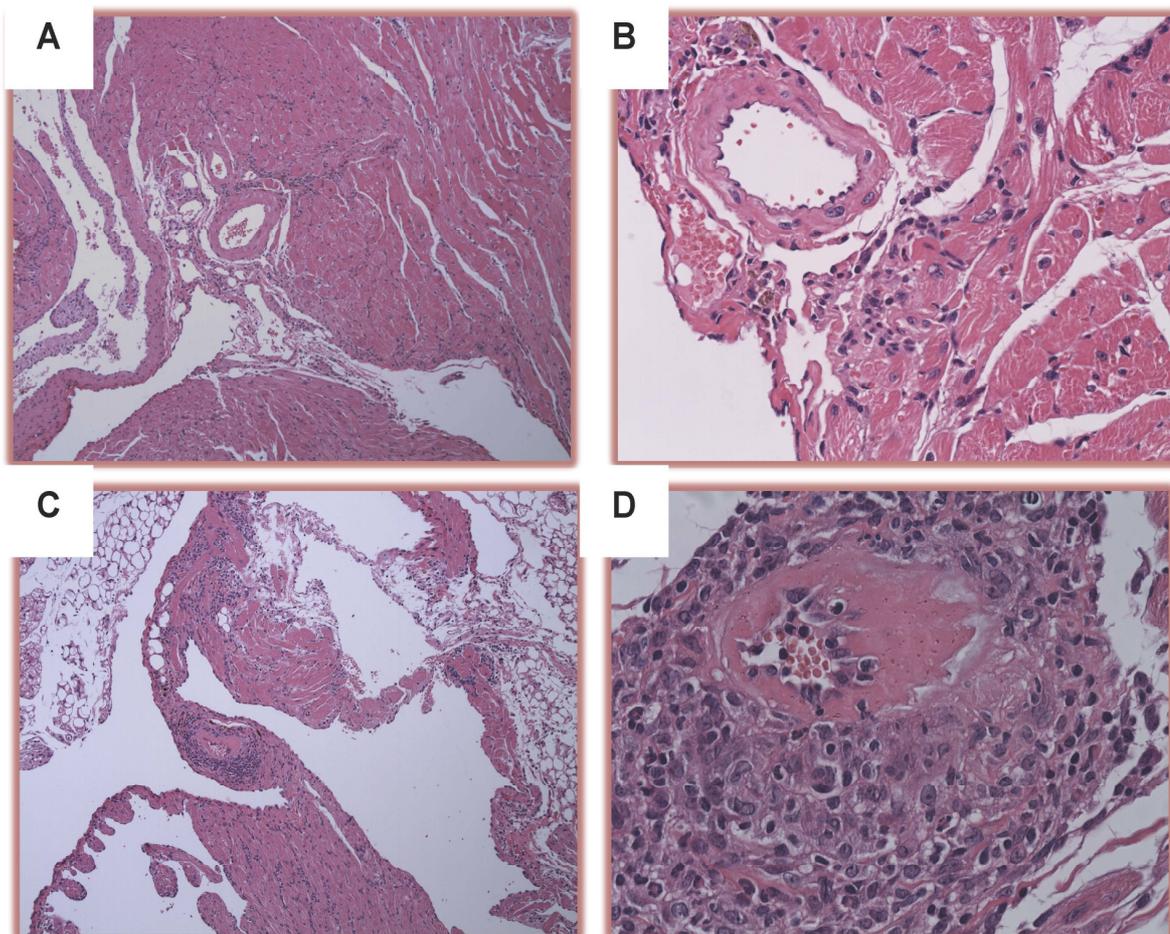
**Figura 23: Avaliação morfométrica de secções de corações de animais não-infectados e chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina.** (A) Número de células inflamatórias por mm<sup>2</sup> quantificado em secções coradas com H&E. (B) Percentual de fibrose quantificado em secções coradas com tricrômio de Masson. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

A avaliação histopatológica no coração dos animais tratados com imunoglobulina caracteriza-se por processo inflamatório, focal e agressivo em fibras cardíacas com achado freqüente de vasos com arterite por células mononucleares, muitos apresentando substância hialina acidófila depositada na íntima, e podendo ser identificado em alguns casos a obliteração completa dos vasos por trombose. Vários vasos com alterações foram encontrados na junção atrioventricular. Em contrapartida, a análise histopatológica do coração dos animais do grupo albumina, evidenciou inflamação multifocal, não sendo observada arterite exuberante, nem depósito de substância acidófila nos vasos (Figura 24).

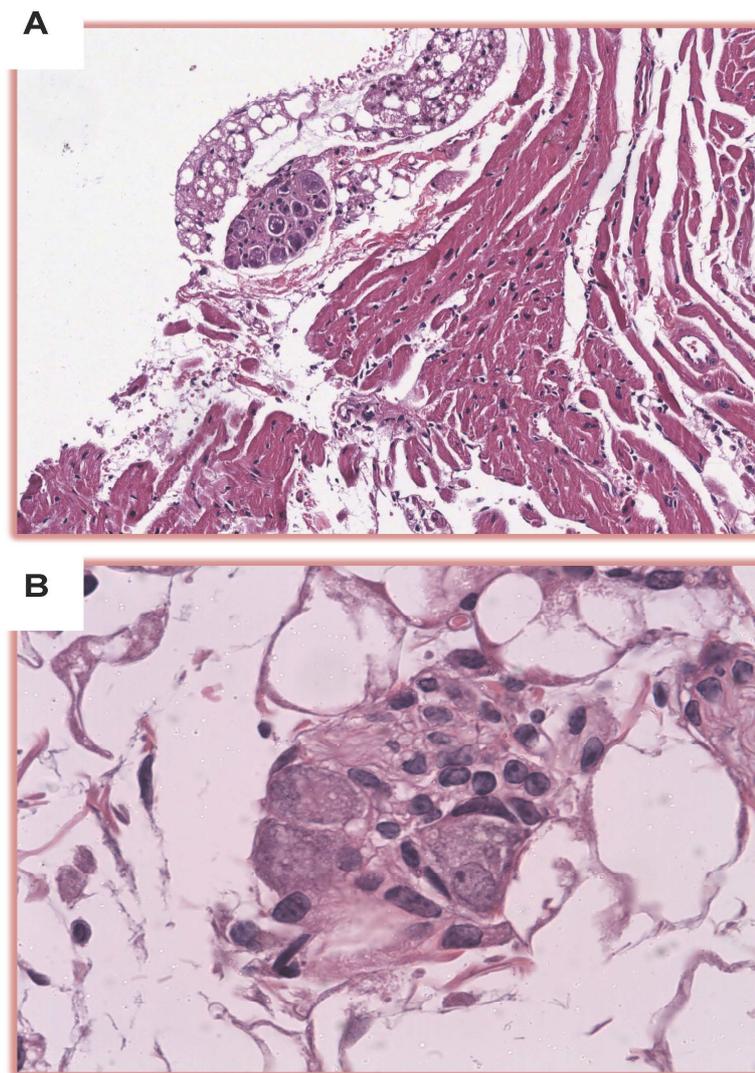
Observou-se intensa inflamação dos plexos nervosos, com grande alterações morfológicas dos plexos neuronais intracardíacos, e grande destruição dos neurônios no grupo imunoglobulina, fato pouco evidente no grupo albumina (Figura 25- 26).

Além do coração, foi realizada a avaliação histopatológica de músculo esquelético. Tanto os animais chagásicos tratados com albumina quanto com imunoglobulina apresentaram inflamação acentuada no músculo esquelético, caracterizando uma miosite intensa observada na fase crônica da doença (Figura 27). Na figura 27A, observa-se corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. A figura 27B mostra corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. Observa-se predomínio de arterite obliterante, com depósito de substância hialina acidófila na camada íntima.

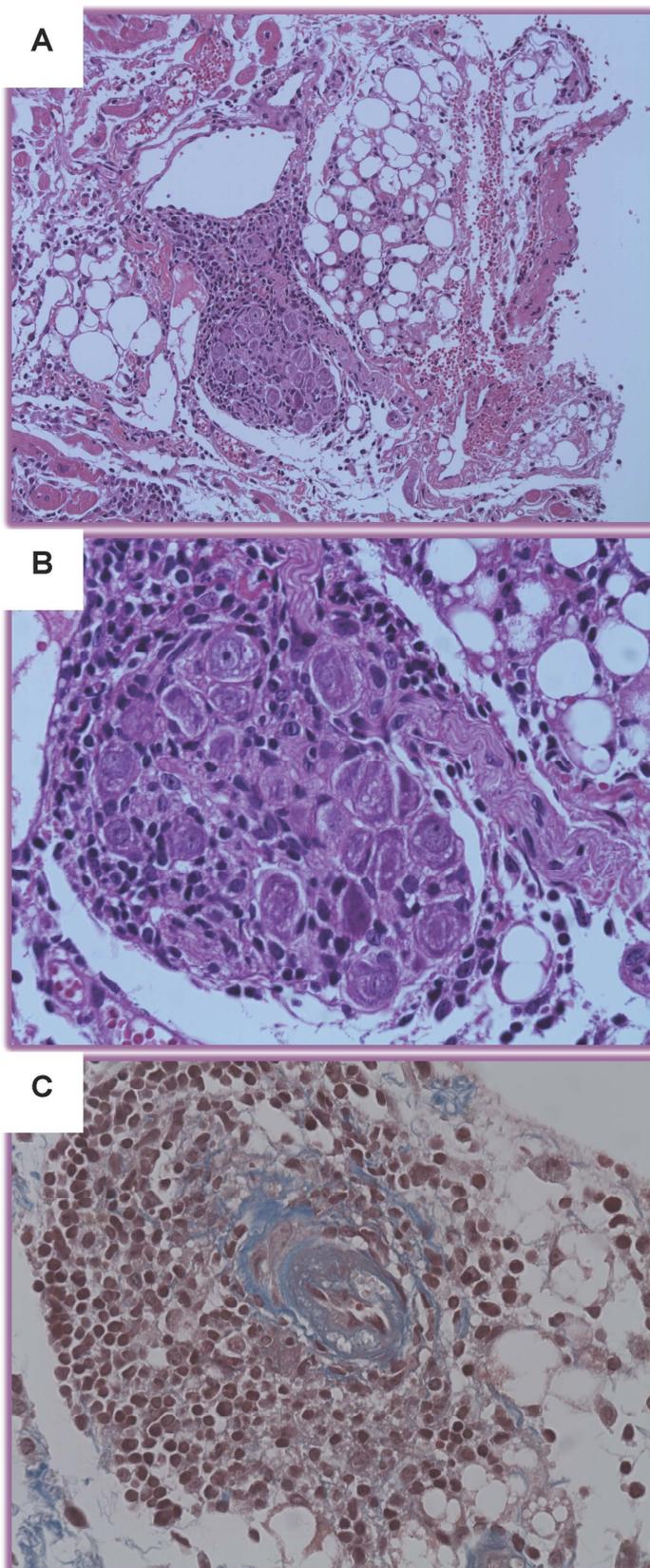
Foi evidenciado na avaliação por imunofluorescência, das secções dos corações dos animais chagásicos crônicos tratados com albumina ou imunoglobulina, com a finalidade de avaliação da substância hialina acidófila depositada na camada íntima das arteríolas, depósito de imunoglobulina no lúmens desses pequenos vasos (Figura 28A), fato não demonstrado nos animais tratados com imunoglobulina (Figura 28B). De modo semelhante, à imunofluorescência em fibra cardíaca de animal chagásico crônico tratado com imunoglobulina observamos depósito de Ig (Figura 29A). Assim como, nas figuras 29 B e C mostramos vaso com arterite obliterante com depósito de Ig marcado através de anticorpo anti-IgG humana.



**Figura 24: Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina ou imunoglobulina. (A),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração por H&E, mostrando infiltrado inflamatório por células mononucleares, multifocal. O corte foi realizado na junção atrioventricular, mostrando uma arteríola sem arterite, pária, e com espessamento da camada média. Aumento 10x. **(B),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, coloração por H&E, mostrando infiltrado inflamatório por células mononucleares, com arteríola pária, com discreto espessamento da camada média. Aumento 40x. **(C),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por H&E, mostrando intensa arterite, com deposição de substância hialina acidófila na camada íntima, produzindo semi-occlusão da arteríola localizada na junção atrioventricular. Aumento 10x. **(D),** Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por HE, mostrando intensa arterite, com deposição de substância hialina acidófila na camada íntima, produzindo semi-occlusão da arteríola. Aumento 60x.



**Figura 25: Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina. (A), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando plexo neuronal intracardíaco, com aspecto morfológico normal, sem alterações neuronais. (B), Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando pequeno plexo neuronal intracardíaco, com discreta inflamação por células mononucleares. Secções coradas com H&E. Aumento 100x.**

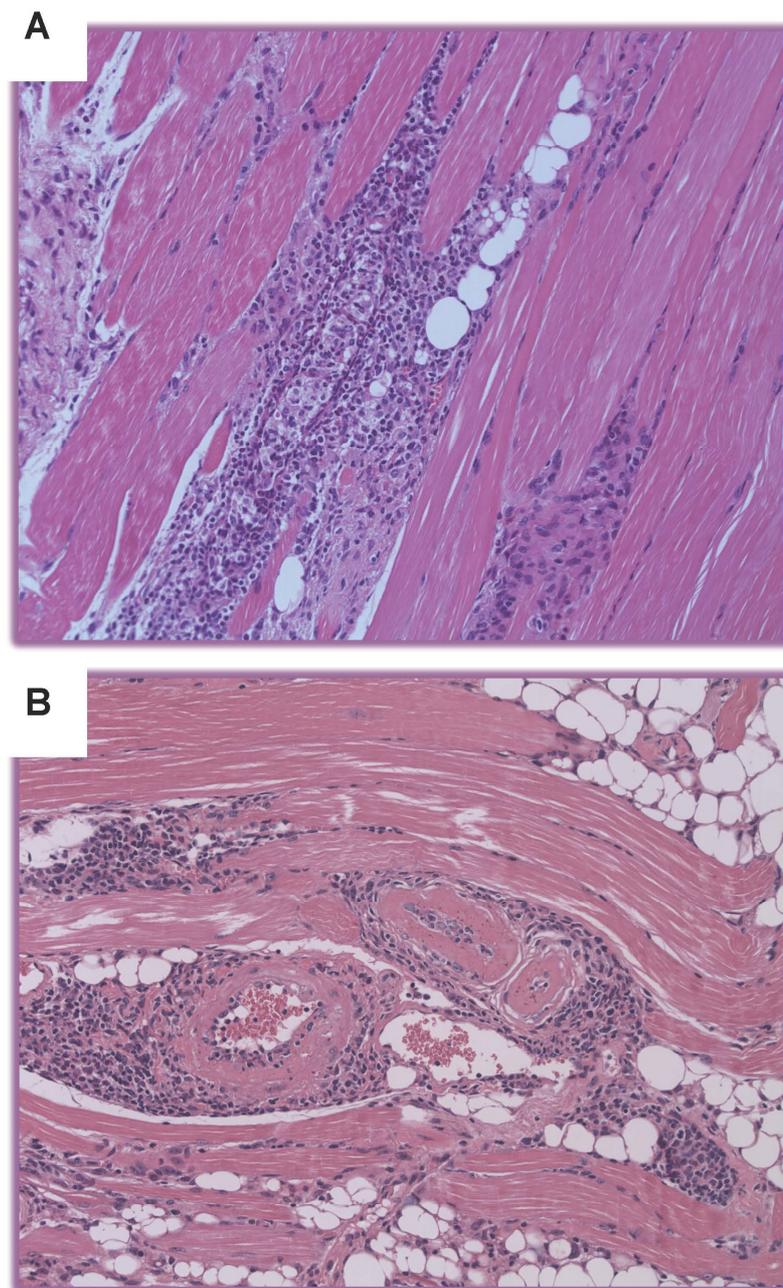


**Figura 26: Histologia de secções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com imunoglobulina.**

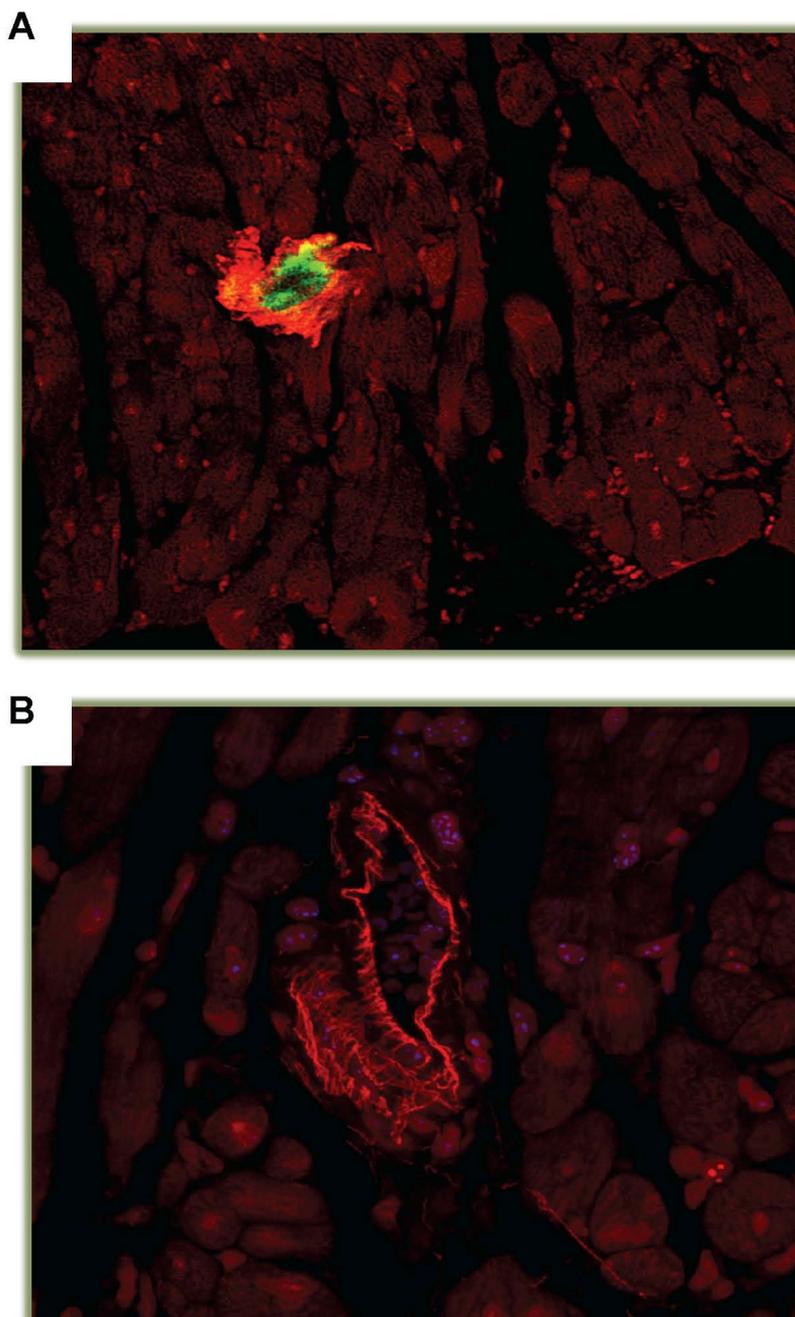
**(A)**, Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por H&E, mostrando gânglio neuronal intracardíaco, com intenso infiltrado inflamatório circunjacente por células mononucleares. Aumento de 20x.

**(B)**, Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por H&E, mostrando gânglio neuronal intracardíaco, com intenso infiltrado inflamatório circunjacente por células mononucleares. Aumento 60x.

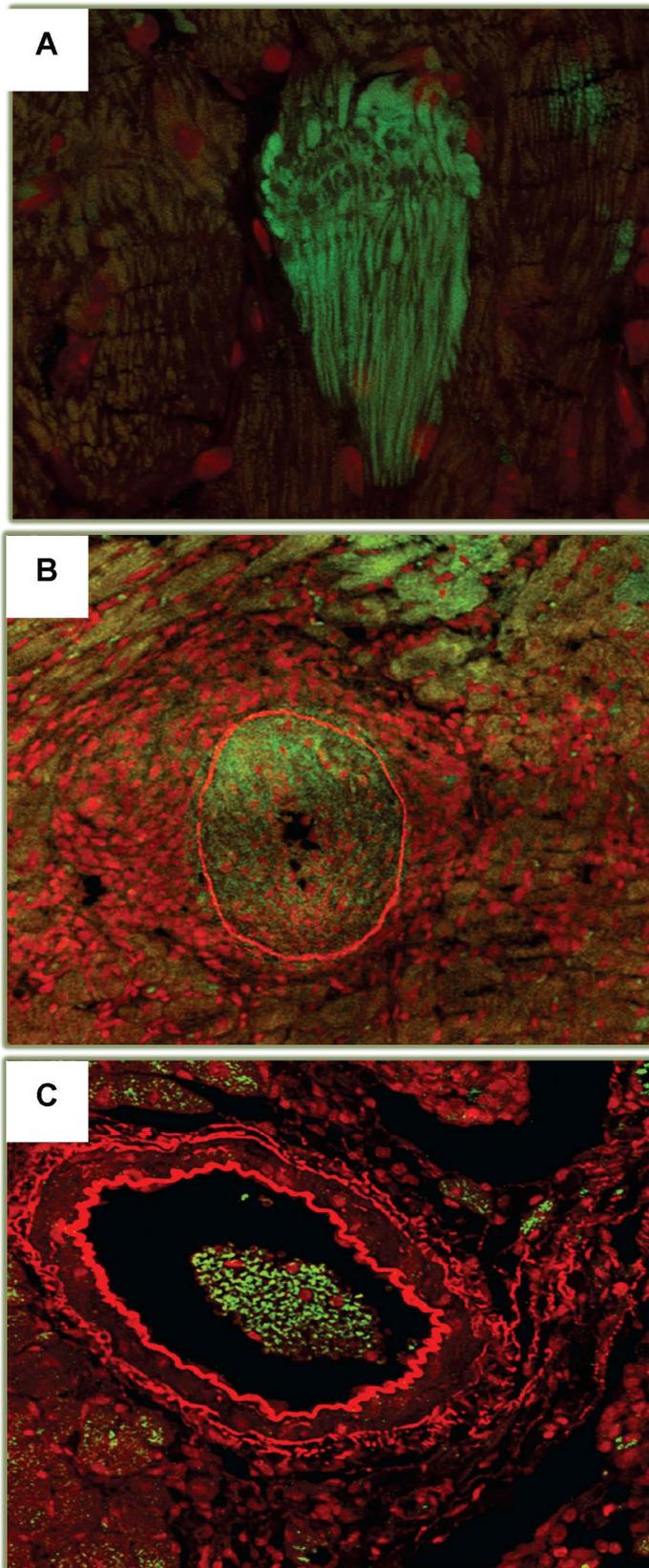
**(C)**, Corte de coração de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, coloração por tricrômio de Masson, mostrando gânglio neuronal intracardíaco, com intensa fibrose e destruição neuronal. Aumento 60x.



**Figura 27: Histologia de seções de músculo esquelético de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina ou imunoglobulina. (A),** Corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com albumina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. **(B),** Corte de músculo esquelético de animal chagásico crônico, tratado com imunoglobulina humana, mostrando intenso infiltrado inflamatório por células mononucleares, frequentemente aderidas, produzindo destruição de fibras musculares. Observa-se predomínio de arterite obliterante, com depósito de substância hialina acidófila na camada íntima. Seções coradas com H&E. Aumento 20x.



**Figura 28: Imunofluorescência de seções de coração de camundongos sacrificados dois meses após terapia com albumina. (A),** Corte de coração em animal chagásico crônico tratado com Ig mostrando pequena arteríola com depósito de Ig no lúmen. O depósito de Ig (em verde) foi marcado através de anticorpo anti-IgG humana com AlexaFlúor 488. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento 60x. **(B),** Corte de coração em animal chagásico crônico tratado com albumina mostrando uma arteríola com vasculite de pequena intensidade, sem depósito de Ig no lúmen. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento 60x.



**Figura 29: Imunofluorescência de secções de corações de camundongos sacrificados dois meses após a terapia com imunoglobulina.**

**(A)**, Fibra cardíaca em animal chagásico crônico tratado com Ig mostrando depósito da mesma através de anticorpo anti-IgG humana marcado com AlexaFlúor 488. Aumento 60x.

**(B)**, Corte de coração em animal chagásico crônico tratado com Ig mostrando um vaso com arterite obliterante, com depósito de Ig (em verde) marcado através de anticorpo anti-IgG humana com AlexaFlúor 488. Em fibras cardíacas podem ser evidenciados alguns depósitos com Ig. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento 60x.

**(C)**, Corte de coração em animal chagásico crônico tratado com Ig mostrando uma arteríola com trombo de Ig e células. O depósito de Ig (em verde) foi marcado através de anticorpo anti-IgG humana com AlexaFlúor 488. O coração foi contra-corado com azul de Evans. Aumento 60x.

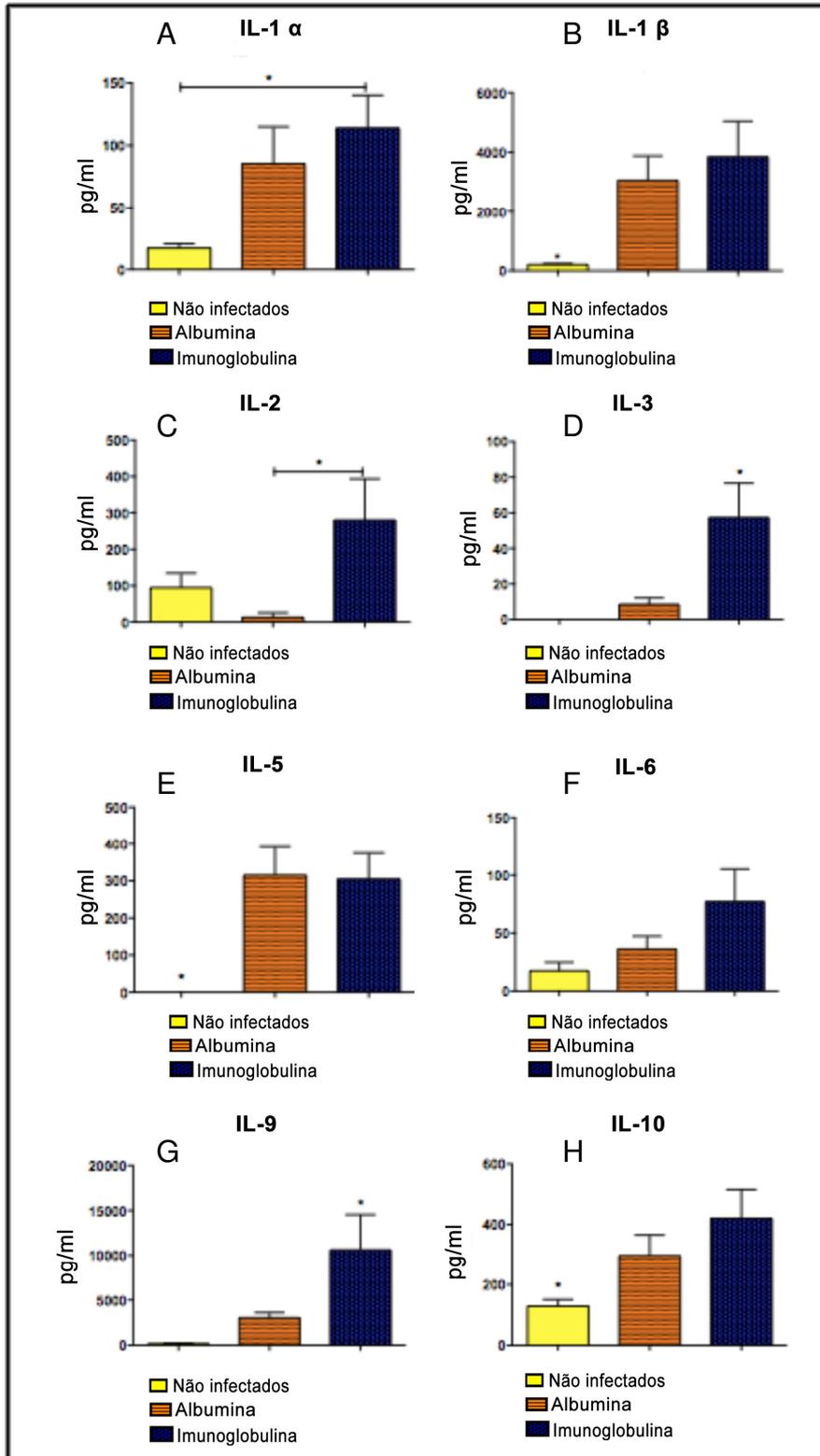
#### **6.2.4. Avaliação da produção de citocinas**

Foi avaliado um painel de citocinas no soro de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina e imunoglobulina, sacrificados dois meses após o início do tratamento. As concentrações de 22 citocinas foram determinadas usando a plataforma Luminex (Figuras 30-32).

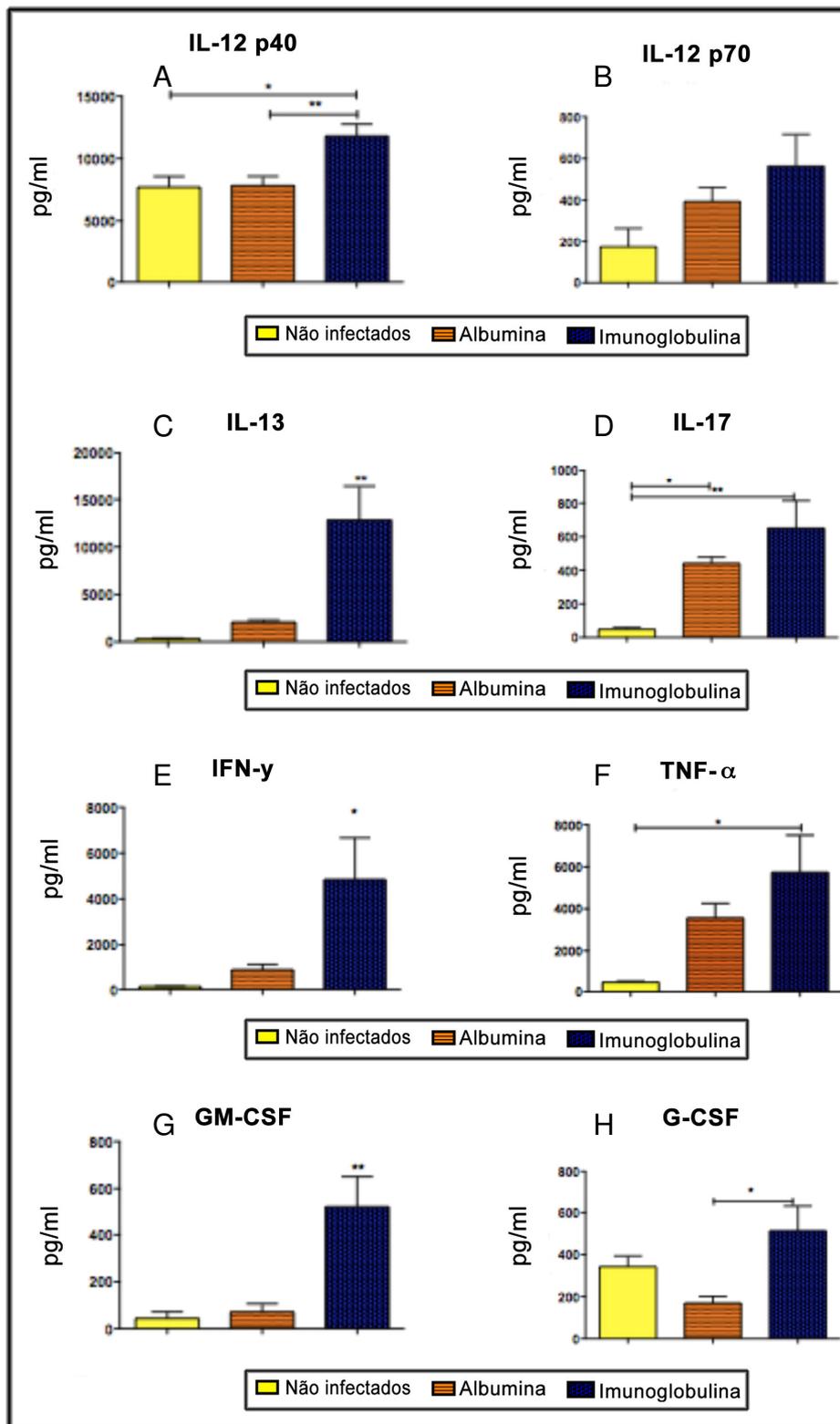
De um modo geral, houve um aumento ou tendência de elevação da maioria das citocinas quando comparadas as concentrações no soro de animais normais e chagásicos controles. As seguintes citocinas apresentaram-se significativamente aumentadas no grupo chagásico controle (tratado com albumina): IL-1 $\beta$ , IL-5, IL-10, IL-17 e RANTES.

Quando os resultados dos grupos chagásicos tratados com albumina ou com imunoglobulina foram comparados, observamos uma elevação estatisticamente significativa em várias citocinas (IL-2, IL-3, IL-9, IL-12p40, IL-13, G-CSF, GM-CSF, IFN- $\gamma$ , MIP1 $\alpha$ , KC, MCP-1, eotaxina) no grupo tratado com imunoglobulina em relação ao grupo chagásico tratado com albumina.

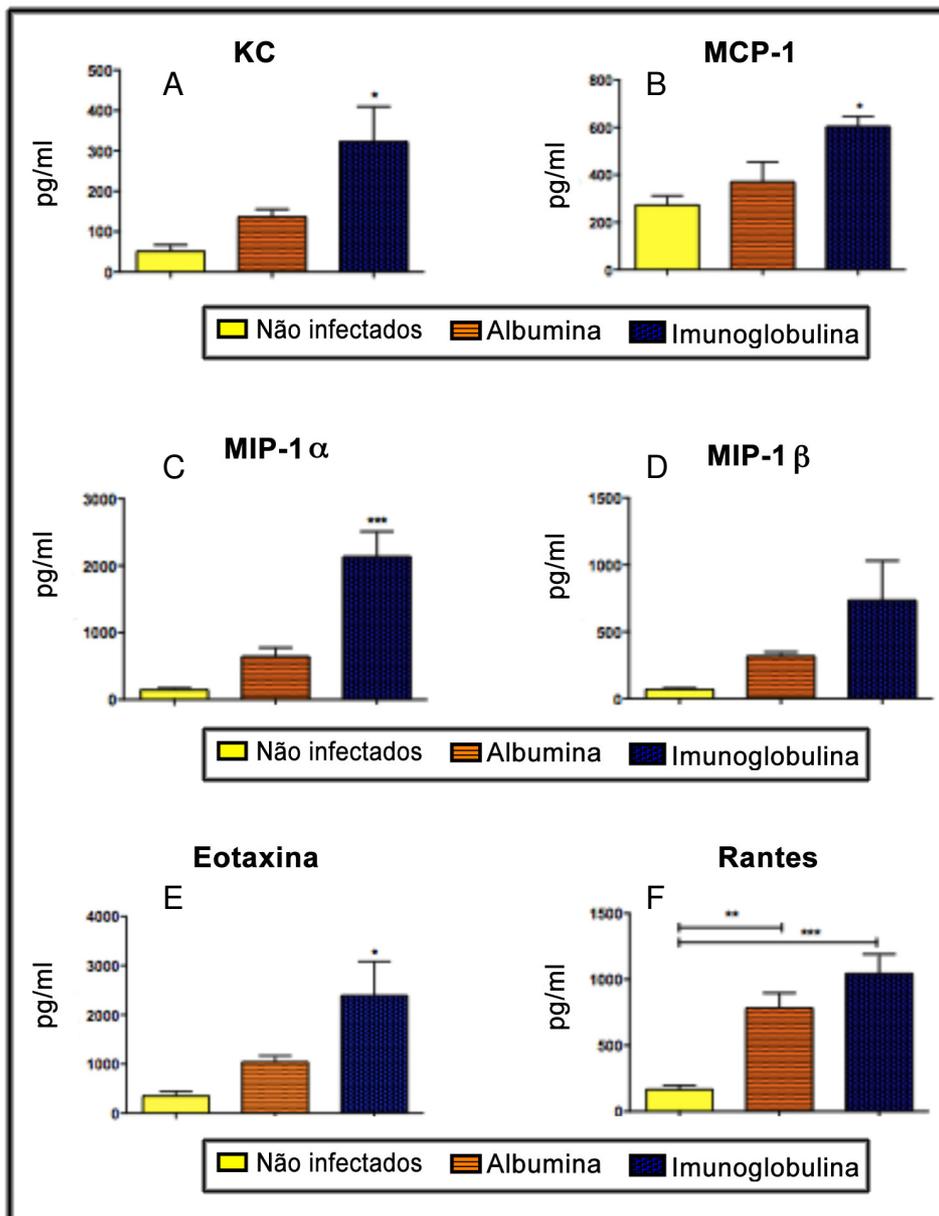
Foi realizada também a avaliação dos níveis de IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10 no tecido cardíaco. Extratos de corações de camundongos chagásicos crônicos tratados com albumina ou com imunoglobulina humana apresentaram níveis similares dessas três citocinas (Figura 33).



**Figura 30: Concentrações séricas de IL-1 $\alpha$  (A), IL-1 $\beta$  (B), IL-2 (C), IL-3 (D), IL-5 (E), IL-6 (F), IL-9 (G) e IL-10 (H).** Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina e analisados na plataforma luminex. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina. \* p < 0,05.

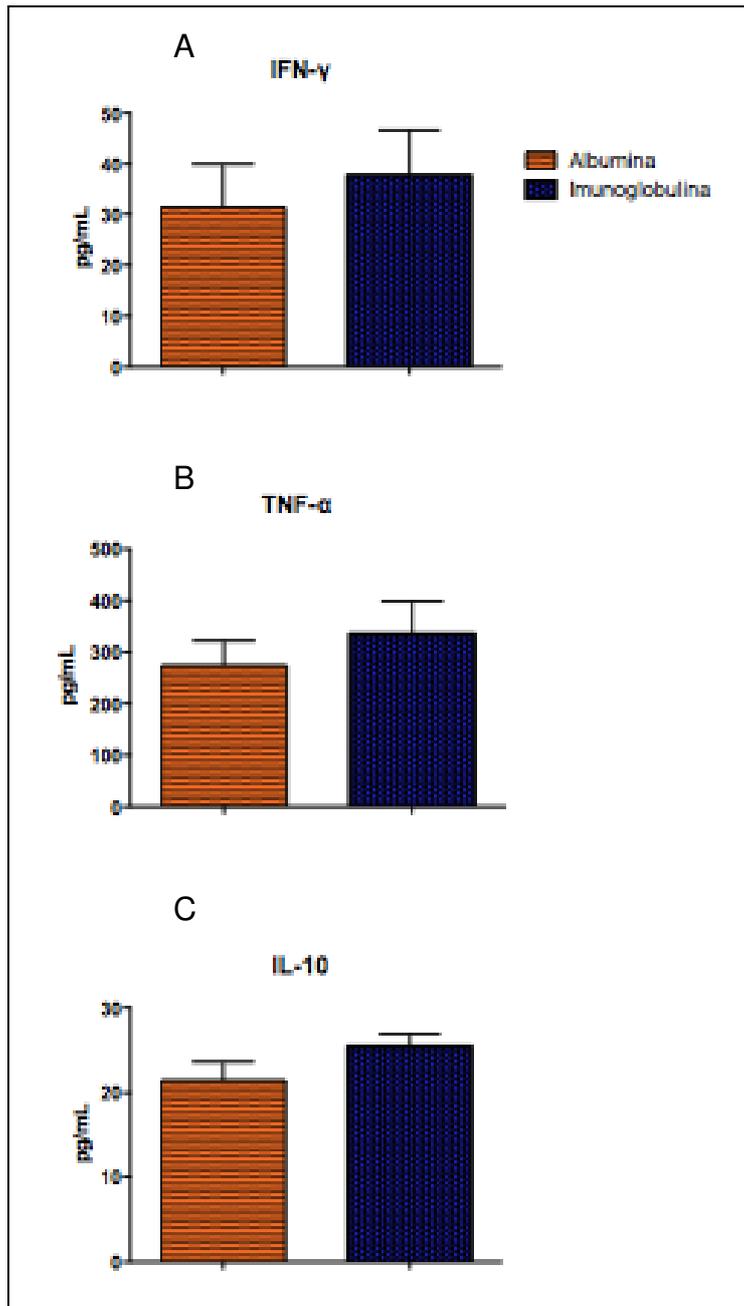


**Figura 31: Concentrações séricas de IL-12p40 (A), IL-12p70 (B), IL-13 (C), IL-17 (D), IFN $\gamma$  (E), TNF $\alpha$  (F), GM-CSF (G) e G-CSF (H). Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina e analisados na plataforma luminex. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina. \*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ .**



**Figura 32: Concentrações séricas de KC (A), MCP1 (B), MIP1α (C), MIP1β (D), Eotaxina (E) e RANTES (F).** Soros de animais não-infectados, chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina e analisados na plataforma luminex. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

\*  $p < 0,05$ . \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 33: Concentrações de IFN $\gamma$  (A), TNF $\alpha$  (B) e IL-10 (C) no coração.** Extratos de corações de animais chagásicos tratados com albumina ou imunoglobulina foram utilizados para a dosagem de citocinas por ELISA. Resultados expressos como a média  $\pm$  SEM de 8 dos animais grupo albumina e 9 animais do grupo imunoglobulina.

## 7. DISCUSSÃO

---

A cardiomiopatia chagásica crônica é forma comum da cardiomiopatia dilatada e causa importante de morbimortalidade na América Latina, sendo o prognóstico desta cardiomiopatia pior do que o das outras etiologias. Nas últimas décadas, várias opções terapêuticas vêm sendo desenvolvidas ou aprimoradas no sentido de retardar o progresso da disfunção ventricular em pacientes com insuficiência cardíaca, porém a reversão do processo nunca foi alcançada na sua plenitude, e o prognóstico desses pacientes continua sendo bastante limitado. O presente estudo experimental, com o uso de modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica, de forma inédita, demonstra que o uso de imunoglobulina humana, administrada por via intraperitoneal, está associado a melhora do padrão histológico, porém esta melhora não se correlaciona com a melhora dos distúrbios da condução atrioventricular e/ou melhora funcional cardíaca.

Do ponto de vista de caracterização da doença, os animais chagásicos, neste trabalho, apresentaram alterações eletrocardiográficas, representadas principalmente por prolongamento do intervalo PR e arritmias, e na maioria dos camundongos, por bloqueio atrioventricular total. Do mesmo modo, os animais chagásicos, quando comparados aos não-infectados, apresentaram pior desempenho nos parâmetros ergométricos de tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final alcançada e estágio máximo atingido. Animas chagásicos e não-infectados apresentaram valores semelhantes de gases ao teste respirométrico, bem como de parâmetros ecocardiográficos, não tendo sido evidenciada dilatação de câmaras cardíacas ou disfunção ventricular nos animais infectados com *T. cruzi*.

A escolha do modelo utilizado no presente trabalho teve como base a publicação de Soares e colaboradores, em 2004. Estes autores inocularam tripomastigotas da cepa Colombiana de *T. cruzi* em camundongos BALB/c e C57BL/6, com a demonstração de significativa redução de infiltrados

inflamatórios por apoptose de células inflamatórias no coração, além de redução da fibrose intersticial, seis meses após o transplante com células-tronco mononucleares de medula óssea. Porém, vale ressaltar que os autores não realizaram avaliação funcional cardíaca nos animais. Em 2006, Rocha e colaboradores publicaram artigo descrevendo a caracterização da função cardiopulmonar em camundongos C57BL/6 cronicamente infectados por *T. cruzi*, utilizando o modelo de infecção com 100 formas de tripomastigotas da cepa Colombiana. Foi evidenciado, ao eletrocardiograma, um aumento do intervalo PR e distúrbios de condução do coração, sendo o BAV 1<sup>o</sup> grau relacionado a uma redução na densidade de receptores adrenérgicos  $\beta_1$  e ao aumento na densidade de receptores muscarínicos  $M_2$  no coração de camundongos chagásicos crônicos quando comparados aos normais. De forma similar, nosso trabalho também demonstrou, com este modelo, o prolongamento do intervalo PR e a presença de arritmias cardíacas em camundongos chagásicos crônicos.

No entanto, não observamos disfunção sistólica e/ou dilatação das câmaras cardíacas ao ecocardiograma, com o modelo utilizado, não podendo, portanto, caracterizá-lo como cardiomiopatia dilatada chagásica crônica. No trabalho de Rocha, em 2006, quando avaliadas as alterações ecocardiográficas, observam-se dados compatíveis com disfunção diastólica, sem evidências também de dilatação de câmaras cardíacas. Gonçalves e colaboradores, em 1986, demonstraram metodologia capaz de induzir experimentalmente cardiomiopatia dilatada, muito semelhante a CCC, inclusive com caracterização de aneurisma apical do ventrículo esquerdo em cerca de 45% dos animais. Recentemente, Goldenberg e colaboradores (2008) utilizaram modelo de infecção com tripomastigotas da cepa Brasil de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C-129, mostrando, à ressonância nuclear magnética, dilatação do ventrículo direito, sem alterações no diâmetro do ventrículo esquerdo. Assim, não conseguimos reproduzir experimentalmente dilatação das câmaras cardíacas no modelo por nós utilizado, porém observamos alterações arrítmicas significativas, caracterizando portanto a forma arrítmica da doença.

Quando analisamos, de forma comparativa, os animais controles e os infectados quanto ao desempenho funcional cardíaco avaliado pela ergometria, observamos a piora funcional nos camundongos chagásicos. Esta piora funcional foi inicialmente relacionada à disfunção ventricular esquerda, o que não se confirmou após análise dos parâmetros ecocardiográficos. Observamos também a piora funcional no grupo imunoglobulina em relação ao grupo albumina, traduzida por redução do tempo de exercício, distância percorrida, velocidade final alcançada e estágio máximo atingido. Os camundongos do grupo imunoglobulina evoluíram para ritmo de BAVT em quase sua totalidade o que pode ter influenciado na piora funcional, visto não apresentarem disfunção sistólica caracterizada por dilatação ventricular e queda da fração de ejeção ao ecocardiograma. Todavia, na avaliação histopatológica do musculo esquelético, tanto dos animais chagásicos tratados com albumina quanto os que utilizaram imunoglobulina, foi evidenciada inflamação acentuada, caracterizando miosite intensa, o que pode ter contribuído para o fraco desempenho funcional à ergometria. Desta forma, a utilização da ergometria com a finalidade de avaliação da capacidade funcional cardiovascular, no modelo de CCC, deverá ser validada em outros trabalhos, já que o processo inflamatório em musculo esquelético possa ser considerado um fator limitante para a avaliação do desempenho cardiovascular.

O mecanismo através do qual a imunoglobulina humana exerce seu papel na imunomodulação ainda como não é inteiramente compreendido. Já foi demonstrado o papel patogênico de anticorpos no soro de pacientes com Chagas que reagem contra receptores muscarínicos e adrenérgicos dos cardiomiócitos (BORDA *et al.*, 1996; RIBEIRO *et al.*, 2007). A imunização de camundongos com proteínas recombinantes P0 e P<sub>2</sub>β do *T. cruzi* induz a produção de altos títulos de anticorpos com reatividade cruzada com o receptor β-adrenérgico, levando a presença de arritmias ventriculares, alterações de repolarização e defeitos de condução nesses animais (BERGAMI *et al.*, 2001). Esses dois mecanismos acima mencionados poderiam ser responsáveis pela maior prevalência de eventos bradiarrítmicos. Além do que, apesar da melhora significativa do percentual de fibrose e da

inflamação do tecido cardíaco dos animais tratados com imunoglobulina, o processo inflamatório no grupo imunoglobulina caracterizou-se por ser focal e mais agressivo, com o acometimento dos vasos arteriais, levando à deposição de matéria hialina acidófila na camada íntima, com consequente obliteração das arteríolas, visto de forma mais acentuada na junção atrioventricular, o que de certa forma poderia justificar a piora dos distúrbios de ritmo observado neste grupo.

George e colaboradores (2001) demonstraram, com uso modelo murino de miocardite autoimune, que o uso de imunoglobulina humana venosa reduz a progressão do processo inflamatório, estando o benefício associado a modulação da resposta celular e humoral à miosina, além de redução significativa de TNF- $\alpha$ . Shioje e colaboradores (2004), também com uso de modelo murino, evidenciaram que uso de imunoglobulina humana leva a redução da progressão do processo inflamatório por supressão da resposta Th1. Assim como, Gong e colaboradores (2007) demonstraram o efeito terapêutico de redução da progressão de dano ao miocárdio, assim como, redução da produção de TNF- $\alpha$  com uso de IVIg e vitamina C. Em nosso trabalho observamos à histopatologia deposição de substância hialina acidófila na camada íntima dos vasos arteriais no grupo imunoglobulina, sendo que, a análise do tecido através do uso de imunofluorescência, foi observado ser este depósito de imunoglobulina. Tal observação nos levou a considerar a imunização do animal com grande dose de antígeno proteico estranho (IVIg) levando a formação de anticorpos contra o antígeno. Já é estabelecido que a medida que são formados cada vez mais complexos antígeno-anticorpo alguns deles irão se depositar nos leitos vasculares, principalmente pequenas artérias, caracterizando a chamada doença do soro. Tal hipótese nos levou a questionar o uso de imunoglobulina humana em modelo murino porém diversos trabalhos experimentais já utilizaram esta forma de terapia em miocardite autoimune com boa resposta e, até o momento, sem registro de tal ocorrência.

Olivieri e colaboradores, em 2010, avaliaram o efeito da terapia com imunoglobulina humana em modelo murino de chagas agudo. Os autores

demonstraram aumento do tempo de sobrevida em camundongos BALB/c, tratados com imunoglobulina humana intravenosa, sete dias após inoculação do parasito. Também relatam que em modelo murino de cardiomiopatia chagásica crônica tratados com imunoglobulina foi observado melhora dos eventos arrítmicos bradicárdicos, caracterizada pela redução do intervalo PR e melhora da bradicardia (OLIVIERI *et al*, dados não publicados). Neste trabalho de fase aguda não há relato de registros eletrocardiográficos. Entretanto, como já mencionado anteriormente, em nosso trabalho, a quase totalidade dos camundongos do grupo imunoglobulina evoluiu para bloqueio atrioventricular total.

A avaliação da produção de citocinas no soro dos animais demonstrou um aumento significativo em 12 das 22 citocinas analisadas no grupo tratado com imunoglobulina, em relação ao grupo tratado com albumina. Dentre essas, estão IFN- $\gamma$ , uma citocina que já vem sendo apontada como importante mediador e marcador de gravidade na cardiopatia chagásica crônica (GOMES *et al*, 2003). Porém quando foi realizada a avaliação de três citocinas no coração (IFN $\gamma$ , TNF $\alpha$  e IL-10), não foi detectada uma diferença significativa entre os dois grupos chagásicos. As dosagens no coração sugerem que, apesar de numericamente haver uma diminuição das células inflamatórias no coração, as células inflamatórias presentes no coração de camundongos chagásicos tratados com imunoglobulina encontram-se ativadas e produzindo estes fatores em grande quantidade, o que pode resultar na agressividade das lesões observadas neste grupo. É possível que o aumento destas citocinas no soro se deva à ativação de células em outros compartimentos, tais como baço, medula óssea ou mesmo de outros tecidos através da estimulação de macrófagos residentes. Conforme foi observado no coração, houve a formação de depósitos de complexos imunes, e talvez a presença de depósitos de complexos imunes cause a ativação de fagócitos com a conseqüente produção de mediadores solúveis, incluindo citocinas pró-inflamatórias.

Este trabalho teve como principais limitações o modelo utilizado que até então não havia sido avaliado do ponto de vista ecocardiográfico, não

reproduzindo, portanto, modelo de cardiomiopatia dilatada. Assim como, a avaliação dos dados da ergometria e respirometria foram prejudicados pela importante miosite evidenciada à análise histopatológica. Por outro lado, tais dados contribuíram para a formatação de novos modelos em nosso laboratório buscando otimizar o modelo experimental de cardiomiopatia chagásica crônica.

Outra limitação foi a evidência de depósito antígeno-anticorpo no lúmen dos vasos arteriais com redução importante do calibre dos mesmos nos animais tratados com imunoglobulina, fato esse não mencionado em nenhum protocolo anterior. Estas alterações podem ter prejudicado o efeito imunomodulador da terapia com o uso da imunoglobulina.

Deste modo, concluímos que a terapia com imunoglobulina humana não demonstrou eficácia anti-inflamatória nem induziu a melhora da função cardíaca no modelo murino de cardiopatia chagásica crônica.

## 8. CONCLUSÕES

---

1. O modelo utilizado neste trabalho reproduz a forma arritmica da doença de Chagas e não a forma dilatada com disfunção ventricular.
2. O tratamento com imunoglobulina humana não reduziu a incidência de arritmias cardíacas em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.
3. O tratamento com imunoglobulina humana não melhorou a tolerância ao exercício mensurada através dos parâmetros de ergometria e respirometria em camundongos cronicamente infectados pela cepa Colombiana de *T. cruzi*.
4. Os animais do grupo imunoglobulina tiveram uma redução da inflamação e fibrose porém com maior agressividade das lesões à análise histológica.
5. A análise de citocinas evidenciou um aumento destas no soro dos animais chagásicos tratados com imunoglobulina em relação aos animais normais, não havendo evidências de um efeito imunossupressor sistêmico ou local (no coração) após a terapia com imunoglobulina humana.

## 9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

---

- ABEL, L. C.; RIZZO, L. V.; IANNI, B. *et al.* *Chronic Chagas' disease cardiomyopathy patients display an increase INF- $\gamma$  response to Trypanosoma cruzi infection.* **J. Autoimmun.**, v. 17; p. 99-107, 2001.
- ALMEIDA, D. R.; CARVALHO, A. C.; DA SILVA, A. M. *et al.* *Chagas disease reactivation after heart transplantation: efficacy of allopurinol treatment.* **J. Heart Lung Transplant.**, v. 15, p. 988-992, 1996.
- ANDRADE, L. O. *et al.* *The Trypanosoma cruzi - host-cell interplay: location, invasion, retention.* **Nat. Rev. Microbiol.**, v. 3, p. 819-823, 2005.
- ANDRADE, S. *et al.* *Influence of Trypanosoma cruzi strain on the pathogenesis of chronic myocardialopathy in mice.* **Memória do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 85; p. 17-27, 1990.
- ASHKENAZI, S.; CLEARY, T. G.; LOPEZ, E.; PICKERING, L. K. *Anticytotoxin-neutralizing antibodies in immune globulin preparations: potential use in hemolytic-uremic syndrome.* **J. Pediatr.**; v. 6; p. 1008-1014; 1988.
- AUFDERHEIDE, A. C. *et al.* *A 9-000 year record of Chagas disease.* **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 101, p. 2034-2039, 2004.
- AUKRUST, P. *et al.* *Cytokine network in congestive heart failure secondary to ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy.* **Am. J. Cardiol.**, v. 83, p. 376-382, 1999.
- AUKRUST, P. *et al.* *Inflammatory and anti-inflammatory cytokines in chronic heart failure: potential therapeutic implications.* **Ann. Med.**, v. 37, p. 74-85, 2005.
- BALLOW, M. *et al.* *Mechanisms of action of intravenous immune serum globulin in autoimmune and inflammatory diseases.* **J. Allergy Clin. Immunol.**, v. 100, p. 151-157, 1997.
- BARBOSA, P. R. B. *et al.* *The oral transmission of Chagas disease: an acute form of infection responsible for regional outbreaks.* **Int. J. Cardiol.**, v. 112, p. 132-133, 2006.
- BARRET, M. P. *et al.* *The trypanosomiases.* **Lancet**, v. 362, p. 1469-1480, 2003.
- BENVENUTI, L. A.; HIGUCHI, M. L.; REIS, M. M. *Upregulation of adhesion molecules and class I HLA in the myocardial of chronic chagasic cardiomyopathy and heart allograft rejection, but not in dilated cardiomyopathy.* **Cardiovasc. Pathol.**, v. 9, p. 111-117, 2000.

- BERGAMI, P. L.; SCAGLIONE, J.; LEVIN, M. J. *Antibodies against the carboxyl-terminal end of the Trypanosoma cruzi ribosomal P proteins are pathogenic.* **FASEB J.**, v. 15, p. 2602-2612, 2001.
- BERGER, M. *A history of immune globulin therapy, from the Harvard crash program to monoclonal antibodies.* **Curr. Allergy Asthma Rep.**; v. 5; p. 368-378; 2002.
- BERN, C. *et al. Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States: a systematic review.* **JAMA**, v. 298, p. 2171-2181, 2007.
- BERN, C.; MONTGOMERY, S.; RASSI JR, A.; MARIN-NETO, J. A.; MOORE, A. C. *Evaluation and treatment of Chagas disease in the United States : A systematic review.* **JAMA** ; v. 18; p. 2171–2181; 2007.
- BERN, C. *et al. Chagas disease and the US blood supply.* **Curr. Opin. Infect. Dis.**, v. 21, p. 476-482, 2008.
- BESTETTI, R. B.; MUCCILLO, G. *Clinical course of Chagas heart disease: a comparison with dilated cardiomyopathy.* **Int. J. Cardiol.**, v. 60, p. 187-193, 1997.
- BILATE, A. M.; SALEMI, V. M.; RAMIRES, F. J. *et al. The Syrian hamster as a model for dilated cardiomyopathy of Chagas disease: a quantitative echocardiographical and histopathological analysis.* **Microbes Infect.**, v. 5, p. 1116-1124, 2003.
- BLEEKER, W. K.; TEELING, J. L., HACK, C. E. *Accelerated autoantibody clearance by intravenous immunoglobulin therapy: studies in experimental models to determine the magnitude and time course of the effect.* **BLOOD**; v. 10; p. 3136-3142; 2001.
- BOCCHI, E.; FIORELLI, A. *The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report.* **J. Heart Lung Transplant.**, v. 20, p. 637-645, 2001.
- BORDA, E. S.; STERINI-BORDA, L. *Antiadrenergic and muscarinic receptor antibodies in Chagas cardiomyopathy.* **Int. J. Cardiol.** v. 54, p. 149-156, 1996.
- BORGES-PEREIRA, J.; XAVIER, S. S.; PIRMEZ, C. *et al. Chagas disease in Virgem da Lapa, Minas Gerais, Brazil. Clinical and epidemiological aspects of left ventricular aneurism.* **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 31, p. 457-463, 1998.
- BOZKURT, B.; KRIBBS, S. B.; CLUBB, J. J. JR, *et al. Pathophysiological relevant concentrations of tumor necrosis factor –a promote progressive dysfunction and remodeling in rats.* **Circulation** ; v. 97; p. 1382–1391; 1998.
- BOZKURT B. *et al. Intravenous immune globulin in the therapy of peripartum cardiomyopathy.* **J. Am. Coll. Cardiol.**, v. 34, p. 177-180, 1999.

BRUTON, O. C. *Agammaglobulinemia*. **Pediatrics**; v. 6; p. 722-728; 1952.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* reinfections in mice determine the severity of cardiac damage. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 889–896, 2002.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* *Trypanosoma cruzi* reinfections provoke synergistic effect and cardiac  $\beta$ -adrenergic receptors dysfunction in the acute phase of experimental Chagas disease. **Experimental Parasitology**, v. 103, p.136–142, 2003a.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* Indeterminate Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* strain and re-infection are factors involved in the progression of cardiopathy. **Clin. Sci** . v. 104, p. 415-420, 2003b.

BUSTAMANTE, J. M. *et al.* Reinfections and *Trypanosoma cruzi* strains can determine the prognosis of the chronic chagasic cardiopathy in mice. **Parasitol. Res.** v. 100, p.1407-1410, 2007.

Chagas Disease. *Interruption of transmission*. **Wkly Epidemiol Rec**, 72-1, 1997.

CHAGAS, C. 1909. *Nova tripanozomíaze humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do Schizotrypanum cruzi n. gen, n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem*. **Mem Inst Oswaldo Cruz** 1: 11-80

CHAGAS, C. *Über eine neue Trypanosomiasis des Menschen*. **Arch Schiffs Tropenhyg**, v. 13, p. 351-353, 1909.

CHANDRA, M. *et al.* *Cardioprotective effects of verapamil on myocardial structure and function in a murine model of chronic Trypanosoma cruzi infection (Brazil Strain): an echocardiographic study*. **International Journal for Parasitology**, v. 32; p. 207-215; 2002.

CHIALE, P. A.; ROSENBAUM, M. B.; ELIZARI, M. V. *et al.* *High prevalence of antibodies against beta 1 and beta 2 adrenoceptors in patients with primary electrical cardiac abnormalities*. **J. Am. Coll. Cardiol.** v. 26, p. 864-869, 1995.

COSTA, P.; FORTES, F. S.; MACHADO, A. B. *et al.* *Sera from chronic chagasic patients depress cardiac eletrogenesis and conduction*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 33, p. 439-446, 2000.

CUNHA-NETO, E.; RIZZO, L. V.; ALBUQUERQUE, F. *et al.* *Cytokine production profile of heart infiltrating T cells in Chagas disease cardiomyopathy*. **Braz. J. Med. Biol. Res.** v. 31, p. 133-137, 1998.

CUNHA-NETO, E.; DZAU, V. J.; ALLEN, P. D. *et al.* *Cardiac gene expression profiling provides evidence for cytokinopathy as a molecular mechanism in Chagas disease cardiomyopathy*. **Am. J. Pathol.** v. 167, p. 305-313, 2005.

DEWALD, O. *et al.* Development of murine ischemic cardiomyopathy is associated with a transient inflammatory reaction and depends on reactive oxygen species. **Proc Natl Acad Sci U S A** ; v. 100; p. 2700–2705; 2003.

DIAS, J. C. P. *et al.* *Epidemiologia. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico.* Rio de Janeiro: FioCruz, cap. 3 p.33-65, 1997.

DIAS, J. C. P. *et al.* *Epidemiologia in Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2 ed. **Rio de Janeiro: Ganabara Koogan**, p. 49-74, 2000.

DIAS, J. C. P. Globalização, iniquidade e doença de Chagas. **Cad. Saúde Pública**, v. 23; supl.1, p. S13-22; 2007.

DO PRADO J.R. *et al.* Influence of male gonadal hormones on the parasitemia and humoral response of male *Calomys callosus* infected with the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitologic Research**, v. 85; p. 826-29, 1999.

DOBARRO, D *et al.* Chagas heart disease in Europe: an emergent disease? **J Cardiovasc Med**, v. 9, p. 1263-1267, 2008.

ENGMAN, D. M.; LEON, J. S. Pathogenesis of Chagas heart disease: role of autoimmunity. **Acta Tropica.**, v. 81, p. 123-132, 2002.

FERRARI, L.; LEVIN, M. J.; WALLUKAT, A. B. *et al.* Molecular mimicry between the immunodominant ribosomal protein P0 of *Trypanosoma cruzi* and a functional epitope on the human b1-receptor. **J. Exp. Med.** v. 182, p. 59-65, 1995.

FERREIRA, R. C.; IANNI, B. M.; ABEL, L. C. J. *et al.* Increase plasma levels of Tumor Necrosis Factor in asymptomatic indeterminate and Chagas disease cardiomyopathy. **Am. J. Pathol.** v. 98, p. 407-411, 2003.

FONSECA, S. G.; MOINS-TEISSERENC, H.; CLAVE, E. *et al.* Identification of multiple HLA-A\*0201 restricted cruzipain and FL-160 CD8+ epitopes recognized by T cells from chronically *Trypanosoma cruzi* infected patients. **Microbes Infect.** v. 7, p. 688-697, 2005.

GARCIA, S. *et al.* Treatment with benznidazole during the chronic phase of experimental Chagas' disease decreases cardiac alterations. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 49, p. 1521–1528, 2005.

GEORGE, J.; BRASCHAK, I. *et al.* The effect of intravenous immunoglobulin on the progression of experimental autoimmune myocarditis in the rat. **Experimental and Molecular Pathology**, v.71; p. 55-62; 2001.

GIRONÈS, N.; FRESNO, M. *et al.* *Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?* **Trends in Parasitology**, v.19 No.1, Janeiro, 2003.

GOBLE, F. *et al.* *Studies on experimental Chagas' disease in mice relation to chemotherapeutic testing.* **The Journal of Parasitology**, v. 37; p. 408-414, 1951.

GOBLE, F. *et al.* *South American Trypanosomes. In:Herman,R; Singer,J. Immunity to parasitic animals.* **New York: The Rockefeller University**, p. 597-689, 1970.

GOIN, J. C.; LEIROS, C. P.; BORDA, E. *et al.* *Interaction of human chagasic IgG with the second extracellular loop of the human heart muscarinic acetylcholine receptor: functional and pathological implications.* **FASEB J.** v. 11, p. 77-83, 1997.

GOLDENBERG, R. C.;JELICKS, L. A.; FORTES, F. S.; WEISS, L. M.; ROCHA, L. L.; ZHAO, D.; CARVALHO, A. C. ; SPRAY, D. C.; TANOWITZ, H. B. *Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model.* **J. Infect. Dis.**, v. 197, p. 544-547, 2008.

GOMES, J. A.; BAHIA-OLIVEIRA, L. M.; ROCHA, M. *et al.* *Evidence that development of severe cardiomyopathy in human Chagas disease is due to a Th-1 specific immune response.* **Infect. Immun.** v. 71, p. 1185-1193, 2003.

GONÇALVES, S.; ROSSI, M. A.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *Pathogenesis of the apical aneurysm in experimental Trypanosoma cruzi cardiomyopathy in BALB/c mice.* **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v. 80, p. 990-991, 1986.

GONG, F.; YANFANG, H.; GEN, L; GU, W. *The therapeutic effect of intravenous immunoglobulins and vitamin C on the progression of experimental autoimmune myocarditis in the mouse.* **Med. Sci. Monit.** v. 11, p. 240-246, 2007.

GULLESTAD, L. *et al.* *Immunomodulating therapy with intravenous immunoglobulin in patients with chronic heart failure.* **Circulation**, v. 103, p. 220-225, 2001.

HAUSCHKA, T. *Sex of host as a factor in Chagas' disease.* **The Journal of Parasitology**, v. 33; p. 399-404, 1947.

HIGUCHI, M. L.; DE MORAIS, C. F., PEREIRA BARRETO, A.C. *et al.* *The role of active myocarditis in the development of heart failure in chronic Chagas disease: a study based on endomyocardial biopsies.* **Clin. Cardiol.**, v. 10, p. 665-670, 1987.

HIGUCHI, M. L.; GUITIERREZ, P. S.; AIELLO, V. D. *et al.* *Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process.* **Virchows Arch. A. Pathol. Anat. Histopathol.**, v. 423, p. 157-160, 1993.

- JELICKS, L. *et al.* Application of cardiac gated magnetic resonance imaging in murine Chagas' disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 61; p. 207–214, 1999.
- KAPLAN, D.; FERRARI, I.; BERGAMI, P. L. *et al.* Antibodies to ribosomal P proteins of *Trypanosoma cruzi* in Chagas disease possess functional autoreactivity with heart tissue and differ from anti-P autoantibodies in lupus. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v. 94, p. 10301-10306, 1997.
- KESSEL, A; AMMURI, H.; PERI, R.; PAVLOTZKY, E. R.; BLANK, M.; SHOENFELD, Y.; TOUBI, E. Intravenous immunoglobulin therapy affects T regulatory cells by increasing their suppressive function. **J Immunol.**; v. 8; p. 5571-5575; 2007.
- KOFFMAN, B. M.; DALAKAS, M. C. Effect of high-dose intravenous immunoglobulin on serum chemistry, hematology, and lymphocyte subpopulations: assessments based on controlled treatment trials in patients with neurological diseases. **Muscle Nerve**; v. 9; p. 1102-1107; 1997.
- LARANJA, F. *et al.* Chagas' disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. **Circulation**, v. 14, p. 1035-1060, 1956.
- LEVINE, B. *et al.* Elevated circulating levels of tumor necrosis factor in severe chronic heart failure. **N Engl J Med**, v. 323, p. 236-241, 1990.
- LIAO, Y. *et al.* Echocardiographic assessment of LV hypertrophy and function in aortic banded mice: Necropsy validation. **Am J Physiol Heart Circ Physiol** v. 282; p. 1703–1708; 2002.
- LO PRESTI, M. S. *et al.* Changes in the cardiac h-adrenergic system provoked by different *T. cruzi* strains. **Int. J. Cardiol.**, v. 111, 104 – 112, 2006.
- MADY, C.; CARDOSO, R. H. A.; BARRETO, A. C. P. *et al.* Survival and predictor of survival in patients with congestive heart failure due to Chagas cardiomyopathy. **Circulation**, v. 90, p. 3098-3102, 1994.
- MANN, D. L. *et al.* Inflammatory mediators and the failing heart: past, present, and the foreseeable future. **Circ Res** , v. 91, p. 988-998, 2002.
- MARIN-NETO, J. A. *et al.* Pathogenesis of chronic Chagas heart disease. **Circulation**, v. 115, p. 1109-1123, 2007.
- McNAMARA, D.M. *et al.* Intravenous immune globulin therapy of myocarditis and acute cardiomyopathy. **Circulation**, v. 95, p. 2476-2478, 1997
- McNAMARA, D.M. *et al.* Controlled trial of intravenous immune globulin in recent-onset dilated cardiomyopathy. **Circulation**, v. 103, p. 2254-2259, 2001.

MENDEZ, G. F.; COWIE, M. R. *The epidemiological features of heart failure in developing countries: a review of the literature.* **Int. J. Cardiol.**, v. 80, p. 213-219, 2001.

MILEI, J.; STORINO, R.; FERNANDEZ, A. G. *et al.* *Endomyocardial biopsies in chronic chagasic cardiomyopathy. Immunohistochemical and ultrastructural findings.* **Cardiology**, v. 80, p. 424-437, 1992.

MOLINA, R. B.; MATSUBARA, B. B.; HUEB, J. C. *et al.* *Dysautonomia and ventricular dysfunction in the indeterminate form of Chagas disease.* **Int. J. Cardiol.**, v. 113, p. 188-193, 2006.

OLIVEIRA, E.; RIBEIRO, A. L. P.; SILVA, F. A. *et al.* *The valsalva maneuver in Chagas disease patients without cardiopathy.* **Int. J. Cardiol.**, v. 82, p. 49-54, 2002.

OLIVIERI, B. P.; VASCONCELLOS, R.; NOBREGA, A.; MINOPRIO, P.; KAVERI, S. V.; ARAUJO-JORGE, T. C. *Intravenous immunoglobulin increases survival time in the acute phase of experimental Chagas disease.* **Parasite Immunology**, v. 32, p. 464-469, 2010.

OOSRTBURG, B. F. *et al.* *Case report: the first pathologically confirmed autochthonous case of acute Chagas disease in Suriname.* **Trans R Soc Trop Med Hyg**, n. 97, p. 166, 2003.

PAIVA, C. *et al.* *Trypanosoma cruzi: requirements for induction and maintenance of protective immunity conferred by immunization.* **Experimental Parasitology**, v. 102; p. 89–98, 2002.

PARADA, H. *et al.* *Cardiac involvement is a constant finding in acute Chagas' disease: a clinical, parasitological and histopathological study.* **Int J Cardiol**, v. 60, p. 49-54, 1997.

PIERCE, L. R.; JAIN, N. *Risks associated with the use of intravenous immunoglobulin.* **Transfus Med Rev**; v. 4; p. 241-251; 2003.

PONTEN, A. *et al.* *Transgenic overexpression of platelet-derived growth factor-C in the mouse heart induces cardiac fibrosis, hypertrophy, and dilated cardiomyopathy.* **Am J Pathol**; v. 163; p. 673–682; 2003.

POSTAN, M. *et al.* *Studies of Trypanosoma Cruzi Clones in Inbred Mice: A Comparison of the Course of Infection of C3H/HEN- Mice with Two Clones Isolated from a Common Source* **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, p. 497-506, 1983.

PRATA, A. *et al.* *Clinical and epidemiological aspects of Chagas Disease.* **Lancet Infect Dis** , v. 1, p. 92-100, 2001.

Primeira reunião de pesquisa aplicada em doença de Chagas. Validade do conceito da forma indeterminada. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 18, p. 46, 1985.

PUNUKOLLU, G. *et al.* *Clinical aspects of the Chagas' heart disease.* **Int J Cardiol**, v. 115, p. 279-283, 2007.

RASSI JR., A.; RASSI, A.; LITTLE, W. C. *et al.* *Development and validation of a risk score for predicting death in Chagas heart disease.* **N. Engl. J. Med.**, v. 355, p. 799-808, 2006.

RASSI, A. *et al.* *Fase aguda in Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* 2 ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 231-245, 2000.

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES JR., S. *et al.* *Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  cells and dominance of Granzyme A+, CD8+ lymphocytes.* **Am. J. Trop Hyg.**, v. 48, p. 637-644, 1993.

REIS, D. D.; JONES, E. M.; TOSTES JR., S. *et al.* *Expression of major histocompatibility complex antigens and adhesion molecules in hearts of patients with chronic Chagas disease.* **Am. J. Trop Hyg.**, v. 49, p. 192-200, 1993.

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

REVELLI, S. *et al.* *Levels of tumor necrosis alpha, gama interferon, and interleukins 4,6, and 10 as determined in mice infected with virulent attenuated strains of trypanosoma cruzi.* **Parasitol. Res.**, v. 85, n. 2, p. 147-150, 1999.

RIBEIRÃO, M. *et al.* *Chagasic patients develop a type 1 immune response to Trypanosoma cruzi trans-sialidase.* **Parasite Immunol.**, v. 22, n. 1, p. 49-53, 2000.

RIBEIRO, A. L. P.; GIMÉNEZ L. E. D.; HERNÁNDEZ, C. C. Q. *et al.* *Early occurrence of anti-muscarinic autoantibodies and abnormal vagal modulation in Chagas disease.* **Int. J. Cardiol.**, v. 117, p. 59-63, 2007.

RIBEIRO, A. L. P.; ROCHA, M. O. C. *Forma indeterminada da doença de Chagas in Trypanosoma cruzi e doença de Chagas.* 2. Ed. **Rio de Janeiro: Guanabara Koogan**, p. 246-265, 2000.

ROCHA, A.; DE MENESES, A. C.; DA SILVA, A. M. *et al.* *Pathology of patients with Chagas disease and acquired immunodeficiency syndrome.* **Am. J. Trop. Med. Hyg.** , v. 50, p. 261-268, 1994.

ROCHA, N. N.; GARCIA, S.; GIMENEZ, L. E. D.; HERNANDEZ, C. C. Q.; SENRA, J. F. V.; LIMA, R. S.; CYRINO, F.; BOUSKELA, E.; SOARES, M. B. P.; RIBEIRO-DOSSANTOS, R.; CAMPOS-DE-CARVALHO, A. C. *Characterization of cardiopulmonary function and cardiac muscarinic and*

*adrenergic receptor density adaptation in C57BL/6 mice with chronic Trypanosoma cruzi infection. Parasitology*, v. 133, p. 729-737, 2006.

ROELL, W. *et al. Cellular cardiomyoplasty in a transgenic mouse model. Transplantation* v. 73; p. 462–465; 2002.

ROSSI, M. A. *et al. Fibrosis and inflammatory cells en human chronic chagasic myocarditis scanning electron microscopy and immunohistochemical observations. Int. J. Cardiol.* v. 66, p. 183-19, 1998.

SAMUDIO, M. *et al. Differential expression of systemic cytokines profiles in Chagas' disease is associated with endemicity of Trypanosoma cruzi infections. Acta Trop.*, v. 69, n. 2, p. 89-97, 1998.

SAMUELSON, A.; TOWERS, T. L.; RAVETCH, J. V. *Anti-inflammatory activity of IVIg mediated through the inhibitory Fc receptor. Science*; v. 5503; p. 484-486; 2001.

SARTORI, A.; LOPES, M. H.; CARAMELLI, B. *et al. Simultaneous occurrence of acute myocarditis and reactivated Chagas disease in patient with AIDS. Clin. Infect. Dis.* , v. 21, p. 1297-1299, 1995.

SCHMUNIS, G. A. *Prevention of transfusional Trypanosoma cruzi infection in Latin America. Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 94, p. 93-101, 1999.

SCHMUNIS, G. A. *et al. Epidemiology of Chagas Disease in nonendemic countries: the role of international migration. Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 102, p. 75-85, 2007.

SCHOFIELD, C. J.; DIAS, J. C. P. *A cost benefit analysis of Chagas disease control. Mem Inst Oswaldo Cruz*; v. 86; p. 285-295, 1991.

SILVA, J. S. *et al. Interleukin 10, and IFN- $\gamma$  regulation of experimental Trypanosoma cruzi infection. J. Exp. Med.*, v. 175, p. 169–174, 1992.

SIRI, F. *et al. Gated magnetic resonance imaging of normal and hypertrophied murine hearts. The American Journal of Physiology*, v. 272; p. 2394–2402, 1997.

SHIOJE, K. *et al. Immunoglobulin treatment suppressed adoptively autoimmune myocarditis in severe combined immunodeficient mice. Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, v. 287, p. 2619–2625, 2004.

SOARES, M. B. P; SILVA-MTA, K. N.; LIMA, R. S.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *Modulation of chagasic cardiomyopathy by interleukin-4: dissociation between inflammation and tissue parasitism. Am. J. Pathol.*, v.159; p. 703–709, 2001.

SOARES, M. B. P; PONTES-DE-CARVALHO, L.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *The pathogenesis of Chagas' disease: when autoimmune and parasite-specific immune responses meet.* **An. Acad. Bras. Cienc.** v.173; p. 547-559, 2001.

SOARES, M. B. P; DE LIMA, R. S.; ROCHA, L. L.; TAKYA, C. M .; PONTES-DE CARVALHO, L.; DE CARVALHO, A. C. C.; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *Transplanted bone marrow cells repair heart tissue and reduce myocarditis in chronic chagasic mice.* **Am. J. Pathol.**, v.164:441-447, 2004.

SOARES, M. B. P; RIBEIRO-DOS-SANTOS, R. *Current status and perspectives of cell therapy in Chagas.* **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.104; p. 325-332; 2009.

SOUZA, E. *et al.* *Modulation induced by estradiol in the acute phase of Trypanosoma cruzi infection in mice.* **Parasitology Research**, v. 87; p. 51-20, 2001.

SPYCHER, M.; MATOZAN, K.; MINNING, K.; ZEHNDER, R.; MIESCHER, S.; HOEFFERER, L.; RIEBEN, R. *In vitro comparison of the complement-scavenging capacity of different intravenous immunoglobulin preparations.* **Vox Sang.**; v. 4; p. 348-354; 2009.

TAKEI, S. *et al.* *Intravenous immunoglobulin contains specific antibodies inhibitory of activation of T cells by staphylococcal toxins super antigens.* **J Clin Invest**, v. 91, p. 602-607, 1993.

TALVANI, A.; ROCHA, M. O.; BARCELOS, L. S. *et al.* *Elevated concentration of CCL2 and tumor necrosis factor-alpha in chagasic cardiomyopathy.* **Clin. Infect. Dis.** v. 38, p. 943-950, 2004.

TOSTES JR., S.; LOPES, E. R.; PEREIRA, F. E. *et al.* *Human chronic chagasic myocarditis: quantitative study of CD4+ and CD8+ lymphocytes in inflammatory exudates.* **Rev Soc. Bras. Med. Trop.**, v. 27, p. 127-134, 1994.

URBINA, J. A.; CAMPO, R. *Specific chemotherapy of Chagas disease: controversies and advances.* **Trends Parasitol**, v. 19, p. 495-501; 2003.

VASSILEV, T. L. *et al.* *Inhibition of cell adhesion by antibodies to Arg-Gly-Asp (RGD) in normal immunoglobulin for therapeutic use (intravenous immunoglobulin IVIg).* **Blood**, v. 93, p. 3624-3631, 1999.

WHO EXPERT COMMITTEE. *Control of Chagas Disease.* **World Health Organ Tech Rep Ser**, v. 905, p. i-109; 2002

WHO. *Appropriate uses of human immunoglobulin in clinical practice: memorandum from an IUIS/WHO meeting.* **Bull World Health Organ.** ; v.1; p. 43-47; 1982.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Control of Chagas disease.* Geneva: World Health Organization (Technical Report Series, 905), 2002.

YANG, X. *et al.* *Echocardiographic assessment of cardiac function in conscious and anesthetized mice.* **The American Journal of Physiology.** v. 277, p. 1967–1974, 1999.

YU, Z.; LENON, V. A. *Mechanism of intravenous immune globulin therapy in antibody-mediated autoimmune diseases.* **N Engl J Med.**; v. 3; p. 227-228; 1999.