



Universidade de Brasília
Faculdade de Medicina
Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas
Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas



**Tratamento da cardiopatia autoimune de aves mutadas
com o kDNA de *Trypanosoma cruzi* pela transferência de
medula óssea.**

**Aluna: Rozeneide Magalhães Alves
Orientador: Prof. Dr. Antônio Teixeira**

Brasília – DF
2012

Rozeneide Magalhães Alves

**Tratamento da cardiopatia autoimune de aves mutadas com o
kDNA de *Trypanosoma cruzi* pela transferência de medula óssea.**

Tese apresentada ao
Programa de Pós-Graduação
em Ciências Médicas da
Universidade de Brasília, como
requisito parcial à obtenção do
Título de Doutor.

Brasília, 2012

Este trabalho foi realizado no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Curso de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina, Universidade de Brasília, Brasília – DF.

Financiamento: CNPq/CAPES

Dedicatória

Acredito que o meu trabalho, o meu esforço só foi possível pelo fato de existir em minha vida pessoas especiais, que através do seu carinho e apoio vibraram e sofreram comigo durante toda essa jornada. A vocês queridos, Ailton, Luana, Ramon e Mariana dedico este trabalho. Vocês são os meus amores de sempre.

Agradecimentos

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós.

Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry.

Nesta página muito especial deste trabalho, gostaria de agradecer a algumas pessoas, dentre as muitas que me ajudaram a realizá-lo.

Em especial ao meu orientador, Prof. Dr. Antonio Teixeira, não só pela oportunidade, mas pelos ensinamentos, apoio, confiança, estímulo e amizade, indispensáveis para a realização deste trabalho.

A amiga e companheira de trabalho Dra. Ana de Cássia, pelo incentivo e apoio nas horas difíceis, quando me batia o desânimo.

A colega Gabriela, veterinária do laboratório de Cirurgia Experimental, pela disponibilização do micrótomo, e alguns materiais usados por mim durante todo o procedimento histológico.

E finalmente a todos os colegas do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas (LMPDC) que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Obrigada a todos pela oportunidade de proporcionar-me crescimento, tanto

ÍNDICE

Capa.....	I
Contracapa.....	II
Apoio Financeiro.....	III
Dedicatória.....	IV
Agradecimentos.....	V
Índice.....	VI
Lista de abreviatura, símbolos e siglas.....	XI
Lista de figuras.....	XIII
Lista de tabelas.....	XVI
Resumo.....	XVIII
Summary.....	XX
INTRODUÇÃO	1
1.1 Tripanossomíase Americana e Doença de Chagas	1
1.2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	2
1.2.1. Biologia molecular do <i>Trypanosoma cruzi</i>	4
1.2.2. Vias de transmissão do <i>Trypanosoma cruzi</i>	6
1.3. Patologia clínica da infecção.....	7
1.4. Diagnóstico e Tratamento	8
1.5. Resposta imune na doença de Chagas	11
1.6. Patogênese e auto-imunidade na doença de Chagas	12
1.7. Transferência horizontal de genes de seqüências de minicírculos de kDNA do T. cruzi para o genoma da célula hospedeira	15

1.8. Sistema experimental trans-filo para eliminação da infecção residual pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
1.9. Estrutura do Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC (B) de galinhas.....	16
1.10. Histórico das aves congênicas de Praga – cinquenta anos de homogeneização.....	20
1.11. Aves congênicas de Praga e imunogenética	22
1.12. Estudo da autoimunidade no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas – LMPDC	23
II. OBJETIVOS	26
2.1. Objetivo Geral	26
2.1.1. Objetivos Específicos.....	26
III. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
3.1. Modelo animal.....	27
3.1.1. Aves congênicas de Praga	27
3.1.2. Reprodução das aves congênicas B12/B12 e B4/B4 mediante inseminação artificial.....	28
3.2. Teste de histocompatibilidade – antígenos MHC-B nas aves congênicas de Praga haplótipos (B12/B12) e (B4/B4).....	30
3.2.1. Enxertos de pele.....	30
3.2.2. Enxertos de coração repórter.....	30
3.3. Cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i>	32
3.3.1 Inoculação de <i>Trypanosoma cruzi</i> em ovos férteis de galinhas.....	32
3.4. Extração do DNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	33
3.4.1. Extração de kDNA do <i>Trypanosoma cruzi</i>	33

3.4.2. Extração de DNA de células nucleadas do sangue periférico das aves congênicas B12/B12e B4/B4	34
3.4.3. Identificação do DNA mitocondrial (kDNA) retido no genoma de pintos eclodidos de ovos inoculados com <i>T. cruzi</i>	35
3.4.4. Amplificação de seqüência de minicírculos de kDNA e <i>Southern blots</i> para identificar integração com sonda específica.	36
3.4.5. <i>Southern Blot</i> Genômico.....	37
3.5. Padronização da quantidade de aves mutadas e não mutadas com o kDNA do <i>T. cruzi</i>	38
3.6. Pesquisa de anticorpos contra antígenos de coração e de <i>T.cruzi</i>	39
3.7. Grupos experimentais formados	41
3.7.1. Grupos experimentais A e B.....	42
3.7.2. Padronização, detecção e localização das células do sistema imune marcadas com fluorocromos PkH 67 (Verde) e PkH 26 (Vermelho) nas aves mutadas e controles.....	42
3.7.3. Transferência passiva da auto-imunidade mediante células do sistema imune de aves adultas kDNA+ marcadas com fluorocromos PkH 67 (Verde) e PkH 26 (Vermelho) injetadas em pintos mutados K1 com um mês de idade.....	44
3.7.4. Enxerto de coração normal de pinto em aves K1 mutadas com kDNA do <i>T. cruzi</i>	45
3.7.5. Transferência da patologia de ave doente mutada para ave controle sadia.....	46
3.7.6. Tratamento da Patologia de aves KDNA+ receptoras de medula óssea de aves sadias kDNA-.....	49
3.8. Grupos experimentais C e D. Aves que não receberam fluorocromos....	51
3.8.1 Transferência da patologia de aves kDNA+ para receptoras sadias kDNA-	51

3.8.2 Tratamento da patologia em aves kDNA+ mediante transplante de medula óssea de aves controles, sadias (kDNA-)	52
3.9. Histologia	53
3.9.1. Procedimento histológico.....	53
3.9.2. Coloração hematoxilina-eosina.....	54
3.10. Imunohistoquímica	54
3.11. Marcadores moleculares usados na análise imunohistoquímica	55
3.12. Semiquantificação do infiltrado inflamatório e rejeição das células cardíacas.	57
3.13. Análises estatísticas.....	57
3.14. Avaliação do peso relativo dos corações de aves controles (kDNA-) e mutadas (kDNA+)	58
 IV. RESULTADOS.....	 59
4.1. Características reprodutivas das aves de Praga e seleção de haplótipo ...	59
4.2. Avaliação da histocompatibilidade nas aves congênicas de Praga.....	59
4.3. Inoculação de <i>T.cruzi</i> em ovos férteis de aves de Praga e produção de pintos com seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma	62
4.3.1. Identificação do kDNA do <i>T. cruzi</i> integrado no genoma das aves de Praga	62
4.4. Sinais clínicos da patologia evidenciada nas aves congênicas de Praga com kDNA do <i>T. cruzi</i> integrado no genoma.....	67
4.5. Modificações genotípicas e auto-imunidade em aves.....	69
4.6. Ausência de anticorpos contra antígenos de coração em aves mutadas com kDNA de <i>T. cruzi</i>	70
4.7. Identificação da origem das células do sistema imune que infiltram o coração das aves mutadas com kDNA de <i>Trypanosoma cruzi</i>	71

4.8. Transferência passiva da autoimunidade mediante células do sistema imune de aves adultas kDNA+ marcadas com fluorocromos PkH 67 (Verde) e PkH 26 (Vermelho) e injetadas em pintos mutados K1 com um mês de idade.	73
4.9. Rejeição do enxerto de coração de pinto sadio de um dia de idade no subcutâneo de ave mutada (kDNA+)	74
4.10. Transferência e/ou inibição da miocardiopatia inflamatória auto-imune mediante transplante de medula óssea	76
4.10.1. Transferência de células da medula óssea de ave mutada para ave normal.....	76
4.10.2. Tratamento da patologia pela transferência de medula óssea de aves sadias para aves mutadas	78
4.11. Fenotipagem das células efectoras citotóxicas que lisa coração da ave kDNA+ assim como o repórter enxertado no subcutâneo.....	80
4.11.1. Transferência da patologia para o coração repórter e sua comparação com as lesões no miocárdio da ave receptora.....	80
4.11.2 Tratamento da patologia das aves kDNA+ mediante transferência de medula óssea de aves sadias.....	82
4.12. Patologia nas aves de Praga kDNA+	85
4.13. Identificação de células imunes apoptóticas no baço e no enxerto de miocárdio repórter	87
V. DISCUSSÃO.....	89
VI. CONCLUSÕES	98
VII. ANEXO.....	100
VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	101

LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

CEUA -	Comitê de Ética no uso Animal
COBEA -	Colégio Brasileiro de Experimentação Animal
CCC -	Cardiopatia Chagásica Crônica
CD –	<i>Cluster of differentiation</i>
CR 1 -	Chicken Repeat 1
Cy3/Cy5 -	cianinas 3/cianina 5
DC -	Doença de Chagas
DNA -	Ácido desoxirribonucléico
DTT -	Dithiothreitol
EDTA -	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA -	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
FITC –	Fluoresceína isotiocianato
HAI -	Hemaglutinação
H/E -	Hematoxilina e Eosina
IFI -	Imunofluorescência indireta
IP -	Índice de Peso
K -	Kolec
LINEs –	Long interspersed nuclear elements
MD –	Doença de Marek
KDNA -	DNA do cinetoplasto
pb –	Pares de bases
PCR – “	Polimerase Chain Reaction” - Reação em Cadeia da Polimerase
PKH -	Paul Karl Horan

PBS -	Solução tamponada de fosfato
RNA -	ácido ribonucléico
RT-PCR –	Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real
SD –	Desvio padrão (<i>standard deviation</i>)
SFB -	Soro Fetal Bovino
SPF -	Aves Livres de Patógenos Específicos (<i>Specific Pathogen Free</i>)
TCR –	Receptor de linfócitos T (<i>T cell receptor</i>)
TLCK –	Na-p-tirosil-lisina-clorometil cetona
TGH -	Transferência Gênica Horizontal
Wb -	Western Blotting
WHO -	Organização Mundial da Saúde

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ciclos de vida silvestre e peridoméstico do <i>Trypanosoma cruzi</i> em seus hospedeiros primitivos e no homem.	3
Figura 2: Ultraestrutura do cinetoplasto de <i>T. cruzi</i>	5
Figura 3: Estrutura genética do MHC (B) de galinha e do MHC de mamíferos. ...	19
Figura 4: Criação de uma estirpe congênica.	20
Figura 5: Aspectos da inseminação artificial e produção de pintos das aves congênicas de Praga com haplótipos B12/B12 e B4/B4.	29
Figura 6: Experimentos realizados para comprovação da histocompatibilidade nas aves congênicas de Praga.	31
Figura 7: Fluxograma dos experimentos conduzidas nas aves congênicas de Praga usadas para análises da patogênese da cardiomiopatia e sua inibição pela transferência de medula óssea.	42
Figura 8: Organograma do experimento transferência da patologia.	47
Figura 9: Tansferência da patologia.	48
Figura 10: Fluxograma do experimento com objetivo de obter tratamento da patologia de aves mutadas (KDNA+) mediante enxerto de medula óssea de aves saudas (KDNA-).	50

Figura 11: Análise da histocompatibilidade das aves congênicas de Praga.	61
Figura 12: Amplificação de seqüências de minicírculos de kDNA de T.cruzino genoma de aves congênicas de Praga.	63
Figura 13: Hibridização pelo Southern blot de fragmentos de DNA gnômico de aves kDNA+ e de controles kDNA- com sondas de minicírculos de kDNA radiomarcadas.....	64
Figura 14: Ilustração de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de aves nascidas de ovos inoculados com T.cruzi.....	66
Figura 15: Sinais clínicos de patologia evidenciada em aves mutadas.	67
Figura 16: Aumento do volume do coração das aves com integração de kDNA de T. cruzi no genoma.....	68
Figura 17: Imunofenotipagem das células do miocárdio adulto.....	69
Figura 18: Ausência de anticorpos contra antígenos de coração de Gallusgalluse presença de anticorpos contra antígenos do T. cruzi em chagásicos.	70
Figura 19: Percurso das células do sistema imune que infiltram o coração da aves mutadas.	72
Figura 20: Transferência passiva da autoimunidade de aves mutadas (kDNA+) para aves controles (kDNA-).	73
Figura 21: Transplante de coração repórter em aves kDNA mutadas.....	75

Figura 22: Transferência da cardiopatia inflamatória autoimune da ave kDNA+ para ave sadia histocompatível.	78
Figura 23: Inibição da rejeição do miocárdio repórter enxertado no subcutâneo de ave mutada mediante destruição da medula óssea com drogas e substituição com medula óssea de ave controle.....	79
Figura 24: Fenotipagem das células efectoras do sistema imune da ave kDNA+ que rejeita o miocárdio repórter em aves receptoras kDNA-.....	81
Figura 25: Histopatologia do coração adulto da ave controle (kDNA-) que recebeu medula óssea de ave kDNA+ e enxerto de miocárdio repórter no subcutâneo....	82
Figura 26: Inibição da lesão inflamatória no coração de ave doente kDNA+ que teve medula óssea destruída com drogas e substituída por medula óssea sadia de ave controle kDNA-.	84
Figura 27: Tempo médio de sobrevivência de aves controle (kDNA-) e das aves mutadas (kDNA+).....	86
Figura 28: Índices de cardiomegalia indicados pela relação entre o peso do coração e o peso corporal das aves controles kDNA- e kDNA+.	87
Figura 29: Identificação de células apoptóticas no baço de aves mutadas (kDNA+) e no enxerto de miocárdio repórter com intensa inflamação e lise de células alvo.....	88

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1:** Aves utilizadas para o experimento do teste de histocompatibilidade. 32
- Tabela 2:** *Primers* empregados para identificação de seqüência de kDNA, nDNA, e β -actina no genoma de aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*..... 37
- Tabela 3:** Integração de kDNA no genoma aves congênicas 38
- Tabela 4:** Grupo de aves que receberam fluorocromos vermelho e verde 43
- Tabela 5:** Transferência passiva de células mononucleares do sangue de aves adultas marcadas com corantes fluorescentes para pintos de um mês de idade histocompatíveis..... 45
- Tabela 6:** Enxerto de coração de pinto sadio, histocompatível, em aves K1 adultas mutadas com kDNA em aves controles. 46
- Tabela 7:** Transferência da patologia de ave doente mutada para ave controle sadia* 49
- Tabela 8:** Tratamento da patologia de aves mutadas (kDNA+) mediante enxerto de medula óssea de aves sadias (kDNA-). 51
- Tabela 9:** Transferência da patologia de aves mutadas para aves sadias 52
- Tabela 10:** Tratamento da patologia em aves mutadas (kDNA+) mediante transplante de medula óssea de aves controles, sadias (kDNA-). 53

Tabela 11: Expressão semiquantitativa da inflamação no miocárdio de aves kDNA mutadas..... 57

Tabela 12: Análise da histocompatibilidade das aves congênicas de Praga. 60

Tabela 13: Aspectos histopatológicos semiquantitativos das lesões inflamatórias produzidas pelas células imunes no coração das aves adultas e no coração repórter na transferência da patologia..... 85

RESUMO

Este estudo foi conduzido em linhagens B12/B12 e B4/B4 de aves congênicas de Praga geneticamente idênticas em todos os *loci* exceto no MHC relacionado às respostas imunes que conferem resistência ou susceptibilidade à oncogênese induzida pelo vírus (RSV). As linhagens de aves de Praga foram doadas ao LMPDC/UnB pelo Instituto de Genética Molecular da Academia de Ciências de Praga. Ovos férteis de galinha foram inoculados com 100 tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* e os pintos nasceram sem a infecção, mas eles retiveram sequências de minicírculos de kDNA mitocondrial do parasito em vários cromossomos. As aves com as mutações (kDNA+) desenvolveram cardiomiopatia com os aspectos similares aqueles vistos na doença de Chagas humana. Tendo estabelecido o modelo transfilo refratário ao *T. cruzi* foi possível investigar a autoimunidade e determinar a patogênese da rejeição do coração. A transferência passiva das lesões mediante injeções de células mononucleares do sangue de aves mutadas (kDNA+) para aves receptoras controles sadias mostrou pequenos focos inflamatórios no miocárdio. A ausência de tais achados em aves controles (kDNA-) mostrou que apenas linfócitos de aves mutadas (kDNA+) aderiam ao miocárdio. Mas não foi obtida cardiomiopatia mediante transferência de células mononucleares do sangue de aves mutadas para aves sadias. Entretanto, a destruição de células da medula óssea de aves mutadas (kDNA+) com drogas, e sua substituição pelo enxerto de medula óssea sadia de aves controle (kDNA-) inibiu a cardiomiopatia na ave kDNA+. Este experimento foi monitorado pelo enxerto de coração repórter no subcutâneo da ave receptora, cujo estudo histopatológico aos onze dias pós-enxerto revelou ausência de lesão inflamatória. Em experimento reverso, foi feita transferência da patologia de aves mutadas (kDNA+) para aves controle (kDNA-), sadia que tiveram a medula óssea destruída com drogas. Nesse experimento, o enxerto de medula óssea de aves kDNA+ em aves receptoras kDNA- revelou infiltrado inflamatório e lesão no coração repórter enxertado no subcutâneo. O estudo imunocitoquímico revelou no coração repórter patologia similar a lesão no coração da ave adulta, onde a destruição do miocárdio era feita pelos infiltrados de linfócitos T citotóxicos CD8- α , CD8- β , CD8- $\gamma\delta$, CD8- $\nu\beta 1$, e CD8- $\nu\beta 2$ que lisa as células alvo. As aves kDNA+

que sucumbiram a cardiomiopatia e aquelas que foram sacrificadas aos 12 meses de idade revelaram lesões inflamatórias autoimunes no coração adulto e no coração repórter. Os resultados que mostraram inibição da patologia autoimune no coração das aves kDNA+ pela substituição da medula óssea doente pela medula óssea de ave sadia sugerem a possibilidade de tratamento da cardiomiopatia chagásica pela transferência de medula óssea.

Palavras-chave: *Trypanosoma cruzi*, kDNA, , auto-imunidade, patologia, doença de Chagas, aves congênicas de Praga, linfócitos T citotóxicos, medula óssea.

SUMMARY

The study was conducted in lineages B12/B12 and B4/B4 of congenic birds of Prague, showing complete genetic identity in all loci but different MHC carrying on the immune responses that afford resistance and/or susceptibility to RSV induced oncogenesis. The congenic birds were donated by the Czech Republic Academy of Sciences Institute of Molecular Genetics our Laboratory at the University of Brasilia. Fertile chicken eggs were inoculated with 100 tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi* and the chicks hatched were parasite-free, but they retained the parasite mitochondrial kDNA minicircle sequences in various chromosomes. The chicken with mutations (kDNA+) developed Chagas-like heart disease with features similar to those seen in the human disease. Having established the transkingdom model system to study the pathogenesis, it was possible to investigate the autoimmune rejection of the kDNA+ chicken heart. The passive transfer of blood mononuclear cells from mutated (kDNA+) birds to naive recipients revealed small inflammatory infiltrates in the myocardium, but the cardiomyopathy was not observed. The absence of lymphocyte infiltrates in the control chicken (kDNA-) heart showed that only kDNA+ lymphocytes adhere to the myocardium. Moreover, the Chagas-like cardiomyopathy was not obtained by injections of blood mononuclear cells from kDNA+ chickens, and, therefore, other experiments of transfer of bone marrow cells were conducted, aiming at production of the heart disease in the recipient chicken. In this regard, kDNA-mutated chicken bone marrow cells, which were destroyed with drugs, were replaced by healthy bone marrow cells from sick (kDNA+) chicken. This experiment was monitored by a reporter heart grafted in the subcutaneous pouch of a recipientbird. Eleven days after grafting, the histopathology study revealed inflammatory cell infiltrates and destruction of the myocardium by cytotoxic T-lymphocytes T CD8- α , CD8- β , CD8- $\gamma\delta$, CD8- $v\beta 1$, e CD8- $v\beta 2$ that lyse the target cells . The kDNA+ birds that succumbed to natural death and those that did not succumb to heart disease were sacrificed at 12 months of age. The kDNA+ (mutated) birds' revealed autoimmune inflammatory lesion similar to that in the reporter heart. The results of these experiments suggested a reverse experiment,

aiming at the inhibition of the pathology. The replacement of the sick (kDNA+) bone marrow by healthy bone marrow from a naive (kDNA-) donor inhibited the inflammatory autoimmune lesions in the heart of the kDNA- mutated, sick chicken. The inhibition of the heart pathology in the kDNA+ chicken experiments deciphered a treatment possible for the human Chagas heart disease.

Key words: *Trypanosoma cruzi*, kDNA, auto-immunity, pathology; Chagas disease, congenic birds of Prague, cytotoxic T-lymphocytes, bone marrow.

INTRODUÇÃO

1.1 Tripanossomíase Americana e Doença de Chagas

Embora conhecida desde 1909, quando foi descrita pelo médico sanitariano Carlos Chagas, a Doença de Chagas (DC) também chamada de tripanossomíase americana, é a enzootia resultante da predação de triatomíneos hematófagos sobre animais vertebrados que servem de reservatórios para o *T. cruzi* (Chagas, 1909, 1911). A DC passou a ser considerada uma antropozoonose, a partir da domiciliação dos vetores, deslocada de seus ecótopos silvestres originais, pela ação do homem sobre o ambiente (Vinhaes & Dias, 2000). O indício mais antigo do envolvimento do homem no ciclo de transmissão do *T. cruzi* foi encontrado no deserto de Atacama, em múmia de ameríndio datada de 9.000 anos (Aufderheide e cols, 2004). A transmissão da DC no início do século ocorria principalmente pelo contato com os vetores infectados. Contudo, O êxodo rural fez com que os chagásicos migrassem para os grandes centros urbanos da América Latina nas décadas de 70 e 80, mudando o padrão epidemiológico estabelecido para a doença enquanto uma condição rural, e a transformaram em uma doença urbana potencialmente transmissível por transfusão sanguínea (Schmunis, 1999). Ainda hoje apresenta grave problema de saúde pública e está intimamente ligada ao quadro de desigualdade sócio-econômica nos países afetados pela endemia (Schmunis & Yadon, 2009; Garcia, 2009; Voelker, 2009)

Segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO), a prevalência global da infecção humana pelo *T. cruzi* é de 16-18 milhões de pessoas infectadas, e 120 milhões que vivem em área de risco (WHO 2002; Moncayo, 2003; Prata, 2001; Tanowitz e cols, 1992). A doença de Chagas humana é encontrada em cerca de 30% dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi*, podendo exibir quadro clínico multiforme e consequências variadas (Prata, 2001). Dos indivíduos infectados cronicamente com o *T. cruzi*, 70% são assintomáticos apresentando a forma indeterminada da doença, caracterizada pela ausência de manifestações clínicas. Em geral, esses casos são diagnosticados em banco de sangue por apresentarem testes sorológicos positivos para o *T. cruzi*. Entretanto, os 30% restantes apresentam alguma das formas crônicas da doença, geralmente 20 a 30

anos depois da aquisição da infecção aguda (Ribeiro e Rocha, 1998). Destes 95,5% terão manifestações da forma cardíaca, enquanto 4,5% apresentarão a forma digestiva (megacólon e ou megaesôfago). Indivíduos com a forma crônica da infecção apresentam a cardiomiopatia chagásica crônica (CCC), principal causa de morte de chagásicos. A forma digestiva consiste na dilatação do esôfago e/ou do cólon em decorrência da destruição de neurônios parassimpáticos no trato gastrointestinal (Koberle cols., 1963). Atualmente, a DC é considerada doença endêmica de origem parasitária com grande morbidade e mortalidade nas Américas do Sul e Central (Schmunis e cols., 2009). Ainda hoje, não se sabe por que um terço dos pacientes desenvolve a doença e o restante, não (Marin-Neto e cols, 2007; Rassi e cols, 2009).

1.2. *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário eucarioto da ordem cinetoplastida e da família Trypanosomatidae. Sua principal característica morfológica é a presença de flagelo e de única mitocôndria, denominada cinetoplasto. Seu ciclo evolutivo inclui a passagem obrigatória por hospedeiros de várias classes de mamíferos, inclusive o homem, e insetos hemípteros, hematófagos, comumente chamados barbeiros, dos gêneros *Panstrongylus*, *Rhodnius* e *Triatoma* pertencentes à família Reduviidae. A transmissão vetorial do *T. cruzi* para o homem faz-se após o repasto de sangue (Figura 1) quando o triatomíneo elimina no dejetos as formas infectantes do protozoário flagelado (Chagas 1909, 1911). A tripanossomíase era considerada originariamente uma endemia rural que acometia a gente pobre que habitava em cafuas infestadas pelos triatomíneos vetores. A ação antrópica de desflorestamento nos dois ou três séculos passados propiciou a adaptação dos triatomíneos ao peridomicílio e domicílio do homem (Dias e cols, 2002).

No hospedeiro vertebrado (homem, animais silvestres e domésticos), o *T. cruzi* circula no sangue e multiplica-se nos tecidos. No hospedeiro invertebrado, (triatomíneos) o *T. cruzi* multiplica-se no tubo digestivo. O triatomíneo adquire o *T. cruzi* ao sugar sangue de hospedeiro infectado. As formas ingeridas multiplicam-se no segmento anterior do intestino, onde se transformam em epimastigotas. No

intestino posterior, particularmente no reto e ampola retal do triatomíneo, as epimastigotas aderem pelo flagelo às células de revestimento do epitélio intestinal, onde se diferenciam em tripomastigotas metacíclicos. Estas formas são liberadas juntamente com as fezes e urina do barbeiro, eliminadas após o repasto. Portanto, sua transmissão ocorre quando a excreta do vetor contamina a pele e as mucosas de um novo hospedeiro. Em contato com a pele e mucosa do hospedeiro humano, as formas metacíclicas invadem células nos tecidos e se transformam em amastigotas replicativas. Após cinco dias, dezenas ou centenas de amastigotas sofrem alongamento, transformam-se em tripomastigotas com grande motilidade, rompem a célula hospedeira que liberam tripomastigotas no meio extracelular e na corrente sanguínea. O *T. cruzi* alcança vários tecidos e a infecção é disseminada pelo corpo (Tyler & Engman, 2001).

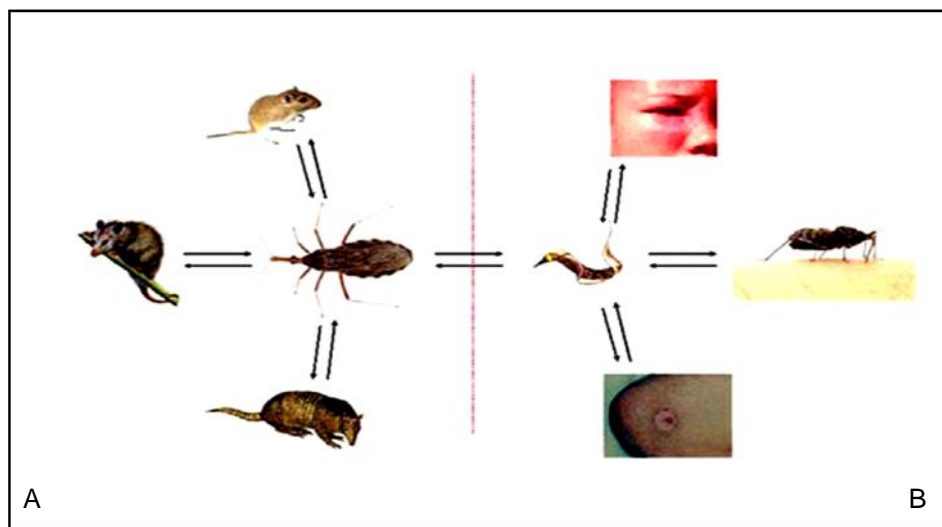


Figura 1: Ciclos de vida silvestre e peridoméstico do *Trypanosoma cruzi* em seus hospedeiros primitivos e no homem.

A: inseto hematófago contaminado com o parasito pode ser ingerido ou pode picar animais silvestres. B: inseto hematófago pode alimentar-se de sangue humano e iniciar o ciclo peridomiciliar da Tripanossomíase Americana (Teixeira e cols, 2006).

1.2.1. Biologia molecular do *Trypanosoma cruzi*

O *T. cruzi* é um protozoário altamente diversificado e especializado. Como todos os membros da família Tripanosomatidae, apresentam o DNA nuclear (nDNA) e o DNA mitocondrial (kDNA). Este é distinto em sua estrutura e em seu modo de replicação.

O kDNA contém milhares de minicírculos com aproximadamente 1.4 Kb, e algumas dezenas de maxicírculos de até 40kb, representando cerca de 15 a 25% do DNA celular do parasito (Simpson e cols, 2006). Os minicírculos estão presentes em 10.000 a 20.000 cópias como anéis catenados formando uma malha sustentada por 12 maxicírculos (Westenberger e cols, 2005). No *T. cruzi* os minicírculos codificam os RNAs ribossômicos ou (rRNAs). Cada minicírculo é composto por quatro regiões conservadas contendo as origens de replicação, separadas por outras quatro regiões variáveis, que codificam RNA guias (gRNA) envolvidos no processo de editoração dos RNA mensageiros (mRNAs) das enzimas mitocondriais. Minicírculos são importantes no processo de editoração dos transcritos de maxicírculos pela adição de uridinas. Além disso, os minicírculos são iniciadores da replicação celular, transcrição, recombinação e integração de DNA exógeno (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010). Em cada região conservada encontram-se três motivos repetidos, ricos em adenina e citosina, conhecidos como blocos (CSB1, CSB2, e CSB3) de seqüência constante (Hines e Ray 2008). A replicação do kDNA coincide com a replicação do DNA nuclear. Envolve a duplicação dos minicírculos e maxicírculos e a segregação das redes de kDNA pelas células filhas. Os minicírculos sofrem a ação da topoisomerase II que promove cortes nos minicírculos, afrouxando dessa forma a rede concatenada. Os minicírculos decatenados são distribuídos uniformemente na periferia da rede, onde são replicados. As moléculas recém-sintetizadas são reintegradas à rede pela ação de topoisomerasas que promovem a ligação com os minicírculos da periferia da rede (Pérez-Morga & Englund, 1993; Chen e cols, 1995) figura 2.

Os maxicírculos têm cerca de 40 Kb e possuem os genes que codificam as proteínas mitocondriais. Quanto à replicação dos maxicírculos, pouco se conhece.

Sabe-se que ela ocorre de maneira unidirecional, a partir de uma origem única, mas os maxicírculos não se desprendem da rede (Klingbeil & Englund, 2004).

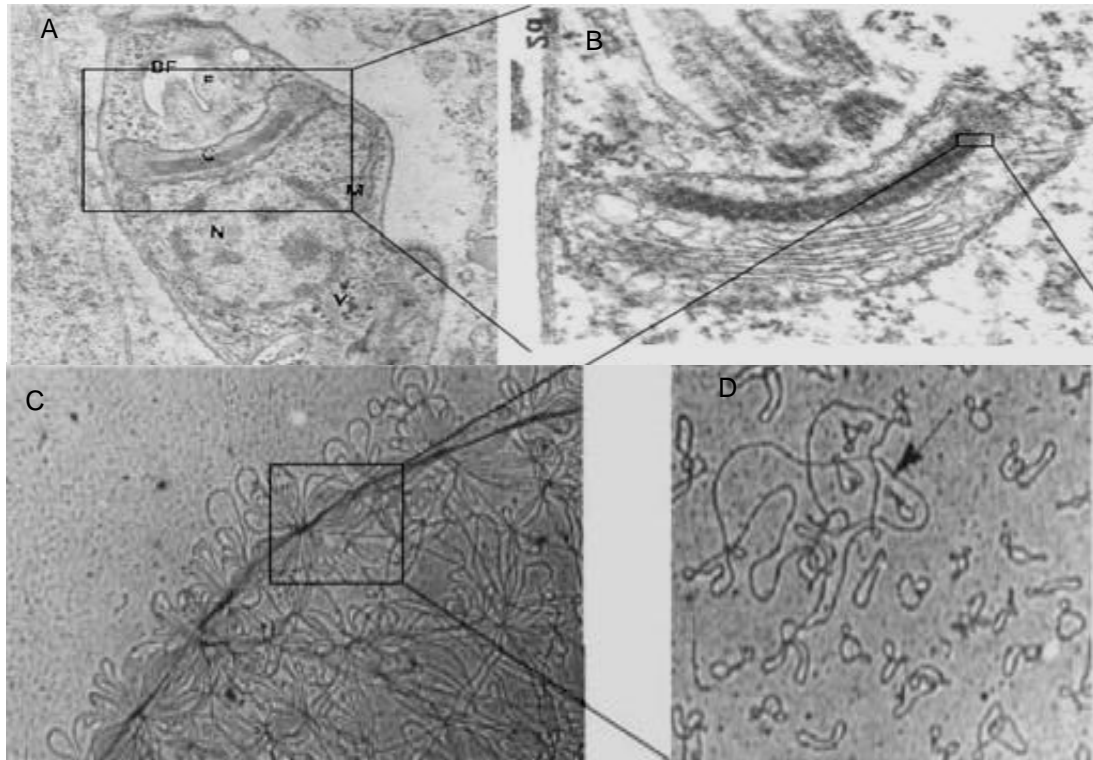


Figura 2: Ultraestrutura do cinetoplasto de *T. cruzi*.

A: estrutura em disco dentro da mitocôndria única (inserto) do protozoário. B: disposição da rede de minicírculos de kDNA sustentada pelos maxicírculos. C: decatenação de minicírculos pela Topoisomerase II. D: rede de minicírculos decatenados e único maxicírculo (seta) (Rubin-de-Celis, 2006)

1.2.2. Vias de transmissão do *Trypanosoma cruzi*

A transmissão vetorial, ou primária, do *T. cruzi* ocorre através do contato direto da pele ou da mucosa do ser humano com a excreta de triatomíneo infectado. Porém a transmissão do *T. cruzi* também ocorre por transfusão de sangue, via congênita da mãe para o feto via placenta, pela via oral, pelo transplante de órgãos e, acidentalmente, em hospital e em laboratório de pesquisa (Bittencourt, 1976; Garcia-Zapata e cols, 1986; Hoffin e cols, 1987; Grant e cols, 1989; Kerndt e cols, 1991; Schmunis A, 1999; Coura, 1997; Dias & Macedo, 2005). As vias de transmissão que não necessitam do inseto-vetor têm grande importância epidemiológica. Por exemplo, transmissão congênita e transfusão de sangue podem disseminar a tripanossomíase para grandes centros populacionais, inclusive para outros continentes onde não há transmissão vetorial (Kirchhoff, 1993). O êxodo rural espalhou as infecções pelo *T. cruzi* para os cinco continentes que receberam imigrantes latino-americanos (Maguire, 2006).

Entre as formas de transmissão que independem de inseto-vetor, a transmissão por transfusão de sangue pode ser controlada (Gonçalves, 1994; Dodd, 2004). Entretanto, a transmissão congênita e os acidentes representam risco persistente de aquisição de *T. cruzi* (Silveira & Vinhaes, 1998; Dias & Schofield 1999; Vinhaes & Dias, 2000).

Micro epidemias da doença tem sido associado com a via oral de transmissão devido ao consumo de alimentos contaminados (Coura, 1997). Essa forma de veiculação da infecção chagásica tem sido descrita em diversos estados brasileiros. Trata-se de episódios súbitos e inesperados, que tem como veículo de transmissão os alimentos caseiros, sucos de cana-de-açúcar e de açaí. Nesses casos se tem documentado a presença de vetores e/ou reservatórios nas mediações do local onde ocorreu o evento (Nery e cols, 1968; Neves e cols, 1968; Shikanai e cols, 1991).

Um século depois da sua descrição, a doença de Chagas persiste como importante problema de saúde pública (Garcia, 2009; Schmunis & Yadon, 2009; Voelker, 2009).

1.3. Patologia clínica da infecção

A análise de aspectos clínicos e laboratoriais de pacientes portadores da doença de Chagas permite classificar a infecção em duas fases: aguda e crônica. Manifestações clínicas de doença febril aguda são encontradas em cerca de 5% dos pacientes infectados, geralmente crianças e jovens abaixo dos 15 anos. Os sintomas de fase aguda são febre, mal-estar, cefaléia, mialgia e hepatoesplenomegalia (Rezende & Rassi, 1994). Alterações inflamatórias locais são encontradas nesta fase com intensa multiplicação local do parasito (Laranja e cols, 1956). Entre os 5% que apresentam sintomas da fase aguda da infecção, cerca de 10% desenvolvem miocardite severa, meningoencefalite e broncopneumonia, podendo falecer em consequência dessas lesões (Laranja e cols, 1956). A porta de entrada do *T. cruzi* pode desencadear reações inflamatórias na pele (chagoma) ou na conjuntiva dos olhos (sinal de Romanã), no hospedeiro imunocompetente. Essa lesão de porta de entrada é uma reação típica de hipersensibilidade tardia à saliva e aos antígenos do *T. cruzi* (Teixeira e cols, 1978; Teixeira, 1995; Teixeira & Teixeira, 1995). A duração da fase aguda varia geralmente entre 4 a 12 semanas, ao fim das quais a parasitemia tende a desaparecer. Em paralelo, ocorre queda nos níveis de imunoglobulinas da classe M e aumento dos níveis de IgG. Esses elementos praticamente definem a transição para fase crônica da doença de Chagas (Dias & Coura, 1997). Os demais 95% dos infectados agudos são assintomáticos e podem passar despercebidos. A confirmação do diagnóstico da infecção aguda nesses casos é feita pelo teste imunológico com demonstração de anticorpos específicos das classes IgM e IgG, em indivíduo jovem com exame prévio negativo. À exceção dos raros casos agudos sintomáticos graves que levam ao óbito, a grande maioria dos casos agudos, sintomáticos e assintomáticos, têm evolução clínica para a fase crônica (Kirchhoff, 1993; Tanowitz e cols, 1992, Ribeiro & Rocha, 1998). Curiosamente, as taxas continuamente mais baixas de parasitemia tendem a alcançar nível críptico na ausência de manifestações da doença (Macedo & Pena, 1998; Macedo e cols, 2002; Campbell e cols, 2004; Teixeira e cols, 2006)

Na fase crônica o indivíduo passa por uma forma intermediária assintomática e sem sinais de comprometimento cardíaco e/ou digestivo, cuja duração pode se

estender por décadas ou então evoluir para a forma cardíaca e ou digestiva. A forma cardíaca apresenta evidências de acometimento cardíaco e morte súbita por arritmia, porém, freqüentemente, desenvolve miocardiopatia dilatada, e insuficiência cardíaca. A principal lesão na cardiopatia chagásica crônica (CCC) é a miocardite com destruição do miocárdio pelo infiltrado inflamatório. A forma digestiva caracteriza-se por dilatações de segmentos do esôfago e do cólon (megaesôfago e mega-cólon), com alteração da sua mobilidade, retenção de alimento sólido e hipertrofia da parede da víscera (Dias & Coura, 1997; Andrade e cols, 1994; Andrade 1999; Prata 2001).

A fisiopatologia da cardiopatia chagásica e a origem do mecanismo que controla e perpetua a inflamação no coração dos pacientes chagásicos precisam ser esclarecidos. De fato, a patologia comparada da doença de Chagas (Teixeira e cols, 2006), no curso da infecção pelo *T. cruzi* em mamíferos pertencentes a seis ordens diferentes, (Passeriformes, Marsupialia, Rodentia, Lagomorpha, Carnívora e Primata), revelou aspectos comuns da patologia descrita na doença de Chagas humana. A similaridade dessa patologia é caracterizada pela associação de células mononucleares do sistema imune com células-alvo do corpo, sem a presença do parasita nas proximidades da lesão. A lesão inflamatória característica da doença, foi definida (Teixeira e cols, 2006) como “unidade mínima de rejeição”(umr), denominador comum da patologia na doença de Chagas. Unidades mínimas de rejeição podem ser confluentes, refletindo a severidade das lesões em vários órgãos de cada paciente chagásico. Entretanto, as lesões do coração servem como unidade padrão por que são encontradas em 95,5% dos óbitos pela doença de Chagas (Teixeira e cols, 2006; 2011).

1.4. Diagnóstico e Tratamento

Diferentes testes são utilizados no diagnóstico da infecção chagásica. Na fase aguda quando há intenso parasitismo, métodos parasitológicos podem ser feitos pela observação do parasito em exames de sangue a fresco como, esfregaço em camada delgada, e gota espessa (Shikanai e cols, 2003). Na ausência de demonstração parasitológica, exames sorológicos que detectam a

presença de anticorpos específicos IgM contra antígenos do *T. cruzi* podem ser utilizados. O xenodiagnóstico, que se baseia na multiplicação dos parasitas no tubo digestivo do inseto vetor após sua alimentação com o sangue de paciente contaminado (Barreto e cols, 1978) e o hemocultivo (Barboza e cols 1983), permitindo detectar poucos parasitas remanescentes na amostra de sangue do paciente, também são utilizados na fase crônica da doença, porém com limitada sensibilidade. O diagnóstico na fase tardia da doença (fase crônica) é geralmente baseado na detecção de anticorpos específicos que se ligam aos antígenos de *T. cruzi*, já que a quantidade de tripanossomas no sangue é muito pequena (Tanowitz e cols, 1992). Nessa fase, utilizam-se os testes sorológicos indiretos de detecção de anticorpos circulantes (IgG) (Kirchhoff, 1993), utilizando as técnicas de imunofluorescência indireta (IFI), hemaglutinação indireta (HI) e o ensaio de imuno absorção enzimática (ELISA, do inglês *enzyme-linked immunosorbent assay*). Entretanto, anticorpos de reação cruzada com antígenos de outros microorganismos podem ser detectados no soro de alguns pacientes chagásicos causando os chamados falsos positivos (Vexenat e cols, 1993; Gadelha e cols, 2003). Para resolver a questão dos resultados duvidosos, procura-se considerar que o teste é positivo quando houver resultado concordante em dois exames sorológicos que identificam anticorpos anti *T. cruzi*. Testes mais sensíveis e específicos de diagnóstico molecular, como a reação em cadeia de polimerase (PCR do inglês *polymerase chain reaction*), hibridização com sondas moleculares e *Western Blotting* (WB) são empregados para o estudo em fases da doença em que os exames sorológicos não permitem um resultado consistente, podendo ser utilizados como testes confirmatórios (WHO, 2002; Lauria-Pires e cols, 2000; Pirard e cols, 2005).

As pesquisas avançam o conhecimento sobre a doença de Chagas, mas o seu tratamento ainda não é efetivo. Não existe até o momento um tratamento quimioterápico ou vacina eficiente (Lauria-Pires e cols, 2000; Mady e cols, 2008; Ribeiro e cols, 2009). Uma vacina para ser efetiva deve proteger contra mais do que um estágio infectivo e gerar uma resposta imune protetora apropriada. O *T. cruzi* por sua vez desenvolve várias estratégias para se evadir da resposta imune do hospedeiro. Além disso, os antígenos envolvidos são em geral complexos

dificultando sua identificação e a resposta imune induzida por vezes não é totalmente compreendida (Tarleton, 2003).

Os efeitos colaterais produzidos pelos fármacos disponíveis para o tratamento da infecção chagásica ocorrem em 10 a 20% dos pacientes, podendo exigir a interrupção do tratamento (Miles, 2003). A indicação de tratamento farmacológico na fase indeterminada da doença é controversa. Já na fase crônica sintomática, não há evidência para recomendar o tratamento com benzonidazol ou nifurtimox (Reys & Valejo, 2008). Em pacientes com CCC estabelecida, a indicação para o tratamento parasiticida permanece controversa (Reys & Valejo, 2008).

Vários mecanismos devem contribuir para a patogenia das lesões cardíacas e a conseqüente instalação dos diversos distúrbios fisiopatológicos, conforme revisões (Marin-Neto e cols, 2007; Tanowitz e cols, 2009). Adicionalmente, a dificuldade de tratamento para a doença de Chagas pode ser creditada, em parte, às variações nas características das manifestações clínicas que se acredita sejam ligadas diretamente à genética do hospedeiro ou do parasito. Esses dois fatores têm papéis relevantes na patogênese da doença (Campbell e cols, 2004).

Investigadores brasileiros foram pioneiros na realização e no desenvolvimento dos transplantes cardíacos ortotópico para tratamento da CCC (Bocchi 1995; Bocchi & Fiorelli A, 2001). O tratamento com células tronco foi desenvolvido a partir da necessidade de novas medidas terapêuticas. Vilas-Boas e colaboradores realizaram a administração intracoronariana de células-tronco em indivíduos com insuficiência cardíaca chagásica, que se mostrou segura e eficaz, com melhora de qualidade de vida e capacidade funcional dos pacientes nos dois meses após o tratamento (Soares e Santos, 2009).

O reparo no coração, utilizando células da medula óssea do próprio paciente tornou-se uma opção atrativa a ser investigada. Resultados experimentais de transplante de células de medula óssea foram obtidos em camundongos normais e injetadas por via endovenosa em camundongos na fase crônica da infecção chagásica, observando-se redução significativa na miocardite, dois meses após o transplante, quando comparados aos controles (Goldenberg e cols, 2008). Soares & Santos (2009), observaram que o transplante com células de medula óssea

melhora a miocardite encontrada durante a fase crônica da infecção chagásica em camundongos cronicamente infectados.

A quimioterapia da doença de Chagas continua sendo um desafio. Portanto, compete exclusivamente ao médico decidir sobre a necessidade e a conveniência de tratamento paliativo, após análise caso a caso.

1.5. Resposta imune na doença de Chagas

Estudos em humanos são escassos comparativamente aos estudos em modelo animal de resposta imune na doença de Chagas (Dutra e cols, 2009). Muito resta ainda a ser esclarecido, sobre a natureza das células presentes nos infiltrados inflamatórios encontrados nos tecidos alvos da infecção, e conseqüentemente, a função biológica destas ainda é uma questão em aberto.

Os macrófagos são células fundamentais para o controle da replicação do parasita, mediante fagocitose, síntese de citocinas pró-inflamatórias e de óxido nítrico (NO) (Brener & Gazzinelli, 1997). Porém, células NK também estão envolvidas na destruição das células infectadas, embora em menor intensidade.

Os anticorpos são importantes elementos de defesa do hospedeiro no curso da infecção. Inicialmente, o parasita induz resposta humoral IgM, IgG e ativação policlonal dos linfócitos B. A resposta imune humoral na fase aguda é dependente de linfócitos T (LT) CD4⁺ (Minoprio e cols, 1986) e contribui para redução da parasitemia e eliminação das formas sanguíneas. Outros autores (Brener & Gazzinelli, 1997) acham que a resposta celular nas fases aguda e crônica é mediada pelos linfócitos T CD4⁺ indutores da imunidade protetora. Vários trabalhos documentam que a resposta celular é importante no combate ao *T. cruzi* na fase inicial da doença, cuja resposta sistêmica protege contra a replicação de amastigotas intracelulares (Minoprio e cols, 1986; Minoprio e cols, 1989).

Os LT CD8⁺ também estão presentes na resposta imune da doença de Chagas. Estas células estão diretamente envolvidas na produção de citocinas e na atividade citolítica, controlando a replicação in vivo do parasita e permitindo a resistência do hospedeiro (Brener & Gazzinelli, 1997). Estudos realizados em murinos mostram que o predomínio de uma resposta imune inicial do tipo

Th1CD4+ direciona e potencializa os mecanismos efetores, incluindo a mudança de isótipos de anticorpo, e ativação de fagócitos e células T CD8+ (Hoft e cols, 2000; Tarleton, R. L.1990; Rottenberg cols, 1993). Entretanto, Fuenmayor e cols, (2005) analisaram biópsias endomiocárdicas de pacientes na fase aguda da doença de Chagas, mostrando não haver diferenças significativas entre as subpopulações de células CD4+ e TCD8+ na miocardite apresentada por esses pacientes chagásicos.

Alguns trabalhos propõem que na fase crônica da doença de Chagas, as células CD4+ respondam de forma deletéria contra antígenos próprios, desencadeando reações inflamatórias de cunho auto-imune, sendo estas responsáveis pela manutenção da intensa miocardite crônica (Cunha-Neto 1995, Cunha-Neto e cols, 2006). No entanto, a avaliação de biópsias endomiocárdicas em humanos na fase crônica da DC, revelou que nos focos inflamatórios, 95% são linfócitos T, principalmente TCD8+, enquanto as células TCD4+ se apresentam em menor quantidade, com uma predominância de 2:1 de células T CD8+ sobre células T CD4+ (Higuchi cols, 1993; Higuchi, 1997; Reis e cols,1993).

O *T. cruzi* mobiliza múltiplos mecanismos humorais e celulares da resposta imune inata e adquirida. Porém, a especificidade da resposta imune é fonte de controvérsia. Em cada fase da infecção, existe uma resposta imune específica com um repertório de células, citocinas e outras substâncias, que reduzem a carga parasitária, auxiliando na defesa do organismo, mas que podem também estar envolvidos no desenvolvimento da patologia.

1.6. Patogênese e auto-imunidade na doença de Chagas

Desde os trabalhos iniciais (Chagas, 1909), pesquisas realizadas em diferentes modelos experimentais procuraram entender o processo evolutivo da infecção pelo *T. cruzi*, e os mecanismos que desencadeiam a patogênese da doença de Chagas.

Por último, trabalhos publicados mostram que muitos fatores interferem direta ou indiretamente na patogênese da doença (Levin 1996; Ribeiro-Santos e cols, 2001; Tarleton 2001; Girones & Fresno 2003; Boonney & Engman, 2008;

Teixeira e cols 2006, 2011). Existem atualmente duas principais hipóteses que tentam explicar estes fatores. A primeira delas defende a persistência do parasita nos locais da inflamação como a principal causa da patologia. O parasitismo tissular persistente seria o responsável pelas reações inflamatórias, acarretando dano miocárdico irreversível. Entretanto, a dissociação entre a intensa destruição do coração pelas células do sistema imune e a ausência do parasita no miocárdio do chagásico, levou à demonstração da capacidade pré-formada em linfócitos de chagásicos de destruir de forma acelerada células cardíacas *in vitro* (Santos-Buch & Teixeira, 1974). Esta publicação deu origem à hipótese de auto-imunidade na doença de Chagas. Na tentativa de esclarecer o mecanismo da auto-imunidade, adeptos dessa hipótese postularam que uma resposta imune contra antígenos próprios seria a responsável pelo dano tecidual observado nos órgãos afetados dos indivíduos chagásicos (Kierszenbaum 2005, Hyland & Engman 2006, Dutra & Gollob 2008; Teixeira e Cols, 2011).

Santos-Buch & Teixeira (1974) mostraram que linfócitos sensibilizados pelo *T. cruzi*, derivados de coelhos cronicamente infectados foram capazes de destruir células cardíacas alogênicas, parasitadas ou não, sugerindo que reconhecem um antígeno comum entre o parasita e o hospedeiro. De acordo com esse conceito, a infecção pelo *T. cruzi* induz respostas imunológicas contra constituintes tissulares próprios, que seriam parcialmente independentes da presença parasitária. Esta hipótese tem sido assunto de muita discussão e debate (Hudson & Hindmarsh 1985; Kierszenbaum, 1986; Minoprio e cols, 1989; Mengel & Rossi. 1992; Higuchi 1997; Tarleton 1999, 2001, 2003). Entretanto, jamais foi possível produzir a miocardiopatia chagásica mediante administração de antígenos não replicáveis do *T. cruzi* ou próprios do hospedeiro (Teixeira e cols, 2011, 2012).

Atualmente vários mecanismos tentam explicar como o *T. cruzi* poderia romper a 'tolerância imunológica' e induzir auto-imunidade em um hospedeiro tolerizado aos seus próprios antígenos. Certamente essa noção passa pelo conhecimento de hospedeiro imunocompetente que têm células B e T auto reativas circulantes que não destroem seu 'próprio corpo' porque são tolerantes aos antígenos próprios (Dighiero & Rose, 1999) Entretanto, vários mecanismos de ruptura da tolerância foram postulados para explicar a auto-imunidade na

doença de Chagas: mimetismo molecular, ativação policlonal, e ativação *bystander* (revisto em Leon & Engman 2001, 2003).

Pelo mimetismo molecular (similaridade de seqüência de aminoácidos entre os antígenos do agente infeccioso e hospedeiro), o *T. cruzi* pode desencadear uma resposta imune envolvendo auto-anticorpos ou linfócitos T auto reativos porque antígenos do parasito e do hospedeiro induzem auto anticorpos, por exemplo, contra miosina cardíaca, proteína P ribossomal, queratina, receptores b-adrenérgicos e de muscarina, proteínas associadas à microtúbulos do citoesqueleto e proteínas neuronais. (Petry & Eisen 1989; Kerner cols, 1991; Cunha-Neto e cols, 1996; 2006; Lopez-Bergamie cols, 2001, Girones, e cols, 2005; Iwai e cols, 2005). Mimetismo molecular entre componentes do parasito e do tecido do hospedeiro induziram reação auto-imune (Cunha-Neto e cols, 2006).

O modelo de ativação policlonal defende que cepas de *T. cruzi* promovem uma ativação indiscriminada de linfócitos T e B durante a fase aguda, o que resulta em uma resposta imune inespecífica com a produção de auto anticorpos (Minóprio e cols, 1989). Tal expansão clonal poderia resultar da ativação de clones celulares por uma grande variedade de antígenos do parasito, ou por moléculas de natureza superantigênica provenientes do parasito. Adicionalmente, ativação policlonal desempenharia papel na perda da tolerância que precederia a resposta autoimune na doença de Chagas (Minoprio e cols, 1989; Kierszenbaum, 1999, 2007).

Na ativação *bystander* (induzida por antígenos resultantes de lesões teciduais) acredita-se que o ambiente da inflamação, rico em citocinas, quimiocinas e óxido nítrico, podem induzir células T auto-reativas. Adicionalmente, a infecção pelo *T. cruzi* também levaria a liberação de proteínas próprias, as quais, por sua vez estimulariam a produção de células auto-reativas (Laucella e cols, 1996; Leon & Engman, 2001).

Por último, Teixeira e cols (2011, 2012) produziram a cardiopatia chagásica em aves refratárias às infecções pelo *T. cruzi*. Os autores mostraram que pintos nascidos de ovos inoculados com tripomastigotas de *T. cruzi* nascem sem o parasita, mas o kDNA fica retido no genoma. As aves mutadas com kDNA desenvolvem cardiopatia semelhante àquela da doença de Chagas, na qual as lesões patológicas são produzidas por linfócitos imunes genotipicamente

modificados pelas mutações de kDNA. Neste modelo, o papel de respostas imunes aos antígenos do parasito foi descartado, pois as aves kDNA-mutadas que desenvolvem cardiopatia são tolerantes aos antígenos do parasito. Apesar de a literatura registrar grande número de revisões sobre autoimunidade, nenhum grupo de pesquisa havia produzido uma cardiopatia autoimune experimental em um modelo animal.

1.7. Transferência horizontal de genes de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* para o genoma da célula hospedeira

O processo de transmissão de genes mais conhecido é o da aquisição de alelos gênicos de uma geração para outra, denominado transmissão gênica vertical ou germinativa. Entretanto, com o advento da era genômica análise das seqüências dos genomas de vários organismos tem demonstrado que a evolução gênica teria ocorrido mediante transferência horizontal de genes (THG) entre espécies distantes no filo e subsequente rearranjo dessas seqüências no genoma (Kidwell, 1993; Hacker, 2000; Kurland, 2000; Kurland e cols, 2003; Gorgaten e cols, 2005).

Transferência horizontal de seqüência de minicírculos para o genoma do hospedeiro foi demonstrada pelos pesquisadores do Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Universidade de Brasília (Nitz e cols, 2004). A progressão das lesões cardíacas em indivíduos chagásicos crônicos a despeito da baixa parasitemia motivou a hipótese elaborada por Teixeira e cols (1994) de que as formas amastigotas intracelulares de *T. cruzi* induziriam alterações no genoma do hospedeiro, que poderiam estar de alguma forma, correlacionadas com a sintomatologia característica dessa fase.

A importância desse fenômeno para a biologia da evolução e, talvez, para a patologia da doença de Chagas, despertou um grande interesse para o estudo da topologia e função do kDNA dos tripanossomatídeos (Hecht, e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011).

1.8. Sistema experimental trans-filo para eliminação da infecção residual pelo *Trypanosoma cruzi*

No estudo realizado por Nitz e cols (2004) foram utilizados coelhos chagásicos como modelo experimental. Entretanto, esse mamífero é permissivo à infecção pelo *T. cruzi*. Para excluir a possibilidade de que essa mutação fosse apenas um ruído da infecção persistente, ficou clara a necessidade de afastar qualquer possibilidade de infecção residual. Em vista disso, surgiu a necessidade de usar um modelo experimental que de fato fosse refratário ao *T. cruzi* (Teixeira e cols 2011). As aves são refratárias à infecção pelo *T. cruzi* a partir da primeira semana de incubação do ovo embrionado (Nery-Guimarães & Laje, 1972). Após este período, a infecção é eliminada pela imunidade inata do embrião. Com os resultados obtidos, ficou documentado que as aves a partir do décimo dia do desenvolvimento do embrião já não continham mais a infecção ativa do *T. cruzi*, pois não era possível obter a amplificação do DNA nuclear do parasito. Entretanto, as aves retinham o kDNA integrado no seu genoma sem a presença de uma infecção ativa pelo *T. cruzi* (Nitz e cols, 2004).

A utilização da ave refratária ao *T. cruzi* como modelo experimental permitiu excluir a persistência do parasito como indutora de autoimunidade na doença de Chagas, à medida que a cardiopatia pode ser desenvolvida em aves que retêm apenas o kDNA-prasita no genoma (Teixeira e cols 2011, 2012).

1.9. Estrutura do Complexo Principal de Histocompatibilidade – MHC (B) de galinhas

O genoma da galinha consiste de nove pares de macrocromossomos incluindo os cromossomos sexuais Z e W, e 30 pares de microcromossomos. A fêmea é o sexo heterogamético ZW e o macho é homogamético ZZ (Burt e cols, 1995; Smith e Burt, 1998; Schmid e cols, 2000; Delany e cols, 2009). A galinha foi a segunda espécie, após os camundongos, na qual o complexo principal de histocompatibilidade (MHC), ou complexo B, foi identificado e reconhecido como

sistema codificador de antígenos do grupo sanguíneo (Brilles, 1950; Gilmour, 1959). Os genes do complexo B de galinha estão arranjados em dois grupos geneticamente independentes, o sistema B e Rfp-Y (*restriction fragment pattern Y*) (Briles e cols, 1993; Okada, 1992; Miller e cols, 1996). Análises genéticas, citogenéticas e bioquímicas têm demonstrado que o sistema B está localizado no cromossomo 16 (Chr16) de galinha, e é composto por regiões polimórficas: regiões B-F, B-L e B-G. Regiões referidas respectivamente ao MHC de classe I, MHC de classe II e MHC de classe IV, (Brilles, 1950; Pink, e cols 1977; Kaufman 1991, 1999). As moléculas BF e BL são glicoproteínas expressas na superfície das células que se ligam a pequenos peptídeos processados para apresentação ao receptor da célula T. A região de classe IV codifica os antígenos do grupo sanguíneo B (identificados pela tipagem sorológica). A função das moléculas B-G não é totalmente compreendida, porém alguns fenômenos imunológicos podem ser atribuídos a elas: efeito adjuvante, resposta preferencial e presença de anticorpos naturais (Hála e cols, 1981b).

O complexo B está associado a vários fenômenos imunológicos, como resistência a doenças neoplásicas, eficácia na vacina, controle das interações celulares, susceptibilidade a doenças autoimunes, (Briles e Briles, 1977, 1982b, 1983; Vainio e cols, 1984, 1988). Tais estudos foram possíveis graças à existência de numerosas linhagens de aves isogênicas (Schierman, e cols 1961; Ziegler e cols, 1976; Guillemot e cols, 1986, 1988). A influência do complexo B sobre a resistência genética para a doença de Marek (DM) foi bem documentada (Briles e cols, 1977, 1983). DM é causada por um herpesvírus, e o estágio final da doença é caracterizado pelo aparecimento de lesões linfoproliferativas (Calnek & Witter, 1997). Não obstante, Scofield e cols (1978) sugerem que em aves a resistência às viroses oncogênicas tem natureza poligênica, controlada por “loci” dentro e fora do complexo B. O papel de um único gene dominante do complexo B, provocando a regressão do sarcoma de Rous, foi estabelecido por Collins e cols (1977) e confirmado por trabalhos posteriores de Nordskog e Gebriel (1983), Bacon e cols (1983).

Diferentes haplótipos determinam fortes diferenças na resistência ou susceptibilidade as doenças infecciosas, devido ao MHC de galinha ser altamente polimórfico. O (s) gene (s) responsáveis pelas diferenças na resposta imune,

ainda não são conhecidos, em parte porque o MHC de galinha é tão compacto que nenhuma recombinação dentro do MHC-B tem sido detectada com acasalamento experimental entre as linhagens endogâmicas. Possíveis candidatos incluem os genes de classe I (O'Neill e cols, 2009). A maioria dos haplótipos MHC contém dois loci clássicos de classe I, BF-1 e BF-2 (Kaufman e cols, 1999b; Shaw e cols, 2007). Tem sido documentado que o gene BF-2 é expresso em nível de mRNA em quantidades bem maiores do que o gene BF-1 (Shaw e cols, 2007), defendendo a hipótese de um "MHC essencial mínimo". Neste, uma única molécula de classe I dominante determina a diferença associada aos haplótipos em relação à resistência às doenças (A seqüência da região BF/BL do haplótipo B12, revelou que o MHC de galinha é organizado diferentemente do MHC típico de mamíferos, como primeiro previsto por Pink e cols (1977). O locus B é uma região simples e compacta, contendo dezenove genes presentes em 92 kb de DNA (Figura 3). É mais ou menos vinte vezes menor do que o MHC humano. A maioria dos genes encontrados na região B-F/B-L, têm homologia com o MHC humano, definindo um conjunto mínimo de genes conservados após milhões de anos de evolução. Porém, o tamanho destes genes é cerca de um terço menor dos que os seus homólogos em mamíferos. A região central não apresenta elementos repetitivos Por serem simples e compactos, os genes dentro do MHC de galinha possuem baixo nível de recombinação, podendo evoluir dando origem a combinações alélicas distintas (haplótipos) em diferentes genes ficando juntos por um período longo de tempo, e permitindo a possibilidade de coevolução (Kaufman e cols, 1999a; O'Neill e cols, 2009).

Alelos foram definidos sorologicamente em linhagens de galinhas, por reações de hemaglutinação e foram numerados consecutivamente, iniciando do haplótipo B1 até o B27 (Briles e Briles, 1982). O haplótipo B12 foi inteiramente seqüenciado por Kaufman e cols (1999b). A região BF/BL é simples e compacta, com 19 genes encontrados em 92 kilobases (Kb) de DNA (figura 3).

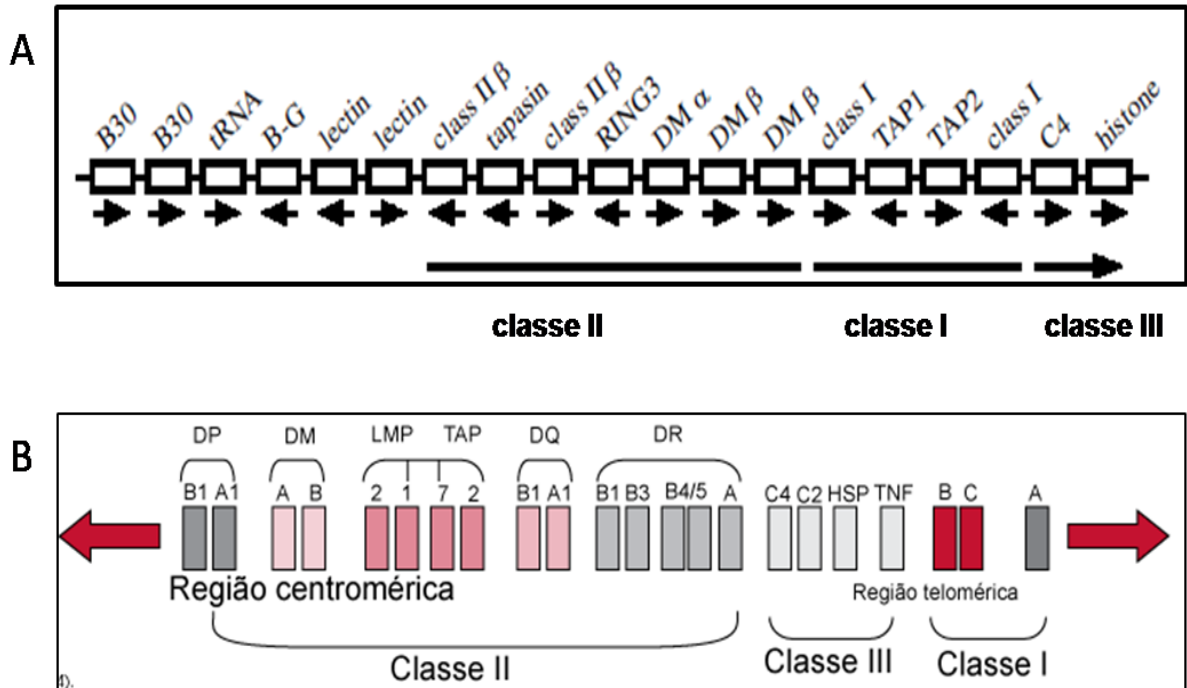


Figura 3: Estrutura genética do MHC (B) de galinha e do MHC de mamíferos.

(A) região sequenciada BF/BL do haplótipo B12. Caixas abertas indicam genes, setas indicam orientação transcricional. Linhas sólidas embaixo indicam as regiões de classe I, classe II e classe III. (B). Regiões de classe I, classe II e classe III do MHC clássico de mamíferos.

As regiões BF/BL não são organizadas do mesmo modo como no MHC de mamíferos. Em galinhas os genes TAP são flanqueados pelos genes de classe I. No entanto, em mamíferos estão localizados na região de classe II. Também o gene tapasina está localizado entre os dois genes de classe II β . As três regiões estão em diferentes ordens. A região de classe III representada pelo gene C4 (complemento) está localizada fora da região de classe II (contendo os genes de classe II β , RING3 e DM). Esta diferença final é de grande importância: os genes de classe I e classe II os quais são responsáveis pela rejeição do enxerto não são separados pela vasta região III. Provavelmente, essa disposição na estrutura das regiões no MHC de galinha é primordial, indicando que MHC de mamíferos originou pelo rearranjo (revisto em Kaufman e cols, 1999b).

1.10. Histórico das aves congênicas de Praga – cinquenta anos de homogeneização

O termo congênico é usado para se referir à linhagem de um organismo que é geneticamente ou genotipicamente diferente apenas em um determinado *locus* ou em uma limitada região genética. Linhagens congênicas são geradas em laboratório por meio de cruzamentos de duas linhagens endogâmicas e retrocruzamentos entre as gerações descendentes com uma das linhagens originais, conhecida como a linhagem receptora. Tipicamente a seleção para qualquer fenótipo ou genótipo é realizada antes de cada retrocruzamento.

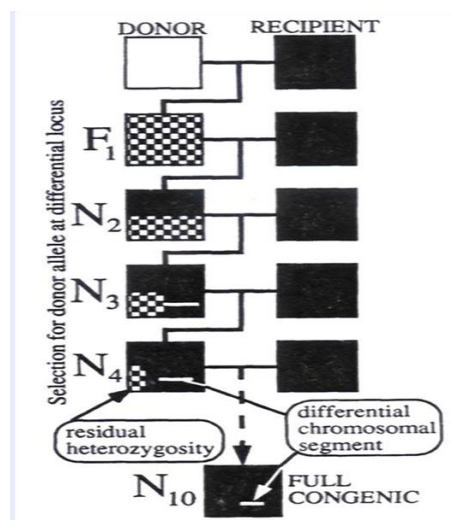


Figura 4: Criação de uma estirpe congênica.

Representação esquemática das contribuições relativas dos alelos de doadores e receptores nas gerações seqüenciais por retrocruzamentos. A contribuição do doador está indicada em branco e a do receptor está indicada em preto, como padrão quadriculado indicativo de *loci* heterozigotos. Pela décima geração de retrocruzamentos, o segmento diferencial em torno do locus seleccionado irá representar a contribuição principal a partir do genoma do doador. (Mouse Genetics, Lee M. Silver, Oxford University Press, 1995)

As aves congênicas de Praga são geneticamente idênticas diferindo apenas no MHC. São derivadas da raça White Leghorn (WL) *Gallus gallus*, de cor branca, porte corporal de baixo peso, utilizadas como poedeiras de interesse comercial. Atingem a maturidade de forma precoce, iniciando a fase de postura antes dos seis meses de idade. Um levantamento da história da criação e as principais pesquisas das aves congênicas de Praga foi publicado por Plachý e Hála (1997).

Uma das primeiras linhagens congênicas (RH-C), foi produzida em Reaseheath, Inglaterra no ano de 1932. Em 1958 foram importadas para o Instituto de Genética Molecular (Academia de Ciências da República Checa, Praga). Métodos imunogenéticos foram introduzidos pelo programa de melhoramento genético, para a produção das primeiras linhagens congênicas (Hála e cols, 1966; Hasek e cols, 1966). As primeiras linhagens congênicas produzidas em Praga foram CB haplótipo MHC B12 derivada da linhagem base RH-C, e CC haplótipo MHC B4, derivada da linhagem CB. Estas linhagens adequaram-se bem ao perfil de isogenicidade exigido, porque eram idênticas para quase todos os genes, os quais eram homozigóticos na linhagem original. Esta homozigotidade foi estabelecida devido ao alto grau de consangüinidade ($F_x > 99.9\%$). A partir destas linhagens, foram desenvolvidas as linhagens congênicas recombinantes, as quais possibilitaram a primeira descrição detalhada da estrutura do complexo principal de histocompatibilidade MHC-B de um vertebrado não mamífero, por meio da genética clássica, bioquímica e finalmente biologia molecular (Plachý e cols 1989 Kaufman e Wallny, 1996; Plachý e Hála, 1997). A designação dos haplótipos B foi feita conforme nomenclatura internacional (Briles e cols, 1982a). Os alelos individuais desses genes são indicados com um número do haplótipo B aos quais eles estão associados (Miller e cols, 2004).

Linhagens congênicas recombinantes (PR-CB. R1, haplótipo – MHC B^{12r1}; PR-CC. R1, haplótipo MHC- B^{4r1} e PR-CC. R2, haplótipo MHC- B^{4r2}) foram obtidas a partir de haplótipos recombinantes dentro do MHC de duas linhagens isogênicas parentais já pré-estabelecidas B¹²/B⁴, B⁴/B¹² e B⁴/B⁷ respectivamente (Hála e cols, 1976, 1979, 1981a). Análise do primeiro haplótipo recombinante revelou que o MHC-B consiste de pelo menos três loci, F, L, e G (Pink e cols,

1997). A distribuição nos tecidos, estruturas e funções das moléculas B-F e B-L parecem muito similares ao MHC classe I e classe II de humano.

Na Academia de Ciências de Praga estas aves foram escolhidas para estudo de controle genético de respostas imunes a infecções virais adquiridas intra-ovo e que deram origem aos conceitos originais de tolerância imunológica.

1.11. Aves congênicas de Praga e imunogenética

Os genes do complexo principal de histocompatibilidade de galinhas *inbred*, representam um decisivo papel no controle da resistência ao crescimento progressivo de tumores induzidos pelo vírus de sarcoma de Rous (RSV) em diferentes modelos experimentais com animais (Collins e cols, 1977; Plachý e cols, 1986). As linhagens congênicas produzidas em Praga CB (B12/B12) e CC (B4/B4) diferem apenas no MHC, na resposta imune baseada na resistência/susceptibilidade à oncogênese induzida pelo vírus (RSV). Estas aves representam um dos melhores modelos de animal geneticamente definido, o qual tem sido descrito em detalhes, em relação à sua natureza genética (Plachý e cols, 1994). Ambas as linhagens são respectivamente regressora (B12) e progressora (B4) tumorais. Na geração F1 a regressão foi herdada como uma característica dominante para o haplótipo B12 (Plachý, 1984). Este resultado demonstrou o papel da região B-F na regressão tumoral. Outro estudo com as aves de Praga, também demonstrou que as linhagens CB e a recombinante CB. R1, a região B-F também controlou a regressão tumoral. Porém, progrediu nas linhagens recombinantes CC (CC. R1), e (CC. R2) (Plachý & Vilhelmova, 1984).

Alguns autores demonstram que a regressão do tumor induzido pelo vírus do sarcoma de Rous (RSV) é devida principalmente a uma resposta imune celular direcionada contra o tumor, associada aos antígenos de superfície celular, enquanto que a imunidade humoral só tem um pequeno efeito no crescimento tumoral do sarcoma de Rous. (Plachý e cols, 1994). Estudos feitos por Gyles e cols (1977), demonstraram que as galinhas que possuem resistência ao tumor primário, induzidos pelo RSV, podem também serem resistentes a indução de um segundo tumor. Posteriormente, Guyre e cols (1982), obtiveram também a mesma

resposta. Estes autores associaram a resistência à influência dos alelos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-B). Concomitantemente esses mesmos autores não observaram nenhum efeito em uma segunda mudança no crescimento dos tumores primários.

Segundo Plachý e Benda (1981), a linhagem regressora (CB) B12/B12 desenvolveu um segundo tumor com baixa frequência, enquanto a linhagem progressora (CC) B4/B4 não resistiu ao crescimento. A retardação do crescimento do tumor primário era típica na linhagem regressora (CB), enquanto a aceleração era característica da linhagem progressora (CC), caracterizando o retardo e a aceleração no crescimento dos tumores primários como timo dependente. Esses resultados indicam que a aceleração do crescimento do tumor primário é também controlada por alelos do complexo B, e pode também ser típico da linhagem progressora CC (B4/B4) geneticamente determinada. Essa imunidade adquirida foi totalmente abolida em timectomia neonatal (Plachý e Vilhelmova, cols, 1984). Em resumo, os estudos relatados acima mostram que o sistema imune das Aves de Praga revela aspectos de notável complexidade nos genes que definem e regulam as respostas imunes, e, é considerada modelo animal congênico, essencial para estudos de auto-imunidade e de transplantes de órgãos e tecidos.

1.12. Estudo da autoimunidade no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas – LMPDC

Estudos sobre autoimunidade na doença de Chagas começaram a mais de quatro décadas na Universidade da Bahia (1967-1971), na Universidade Cornell em Nova York (1971-1974), e no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em doença de Chagas (LMPDC), Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília (1975 a 2012).

Ao longo de 14 anos na Universidade de Brasília, inicialmente, Teixeira e cols (1975-1982) documentaram miocardite chagásica crônica em coelhos isogênicos III/J, caracterizada por infiltração linfocítica e lise das células do coração, na ausência aparente do *T. cruzi*. Posteriormente, Teixeira e cols (1990 a,b,c) observaram que o tratamento de coelhos chagásicos com benzonidazol

diminuiu a parasitemia, porém não interrompeu as lesões destrutivas no coração dos coelhos chagásicos tratados. A lesão ativa nos animais chagásicos tratados era similar àquelas nos coelhos chagásicos sem tratamento. Os achados confirmavam que a persistência do parasito não era necessária na progressão das lesões. A doença cardíaca nos animais tratados sugeriu a hipótese de transferência genética para explicar a patologia da doença de Chagas (Teixeira e cols, 1991). Os achados experimentais em coelhos e camundongos explicavam resultados do grupo em humanos (Braga e cols, 2000; Lauria-Pires e cols, 2000). A hipótese de Teixeira sugeria que mutações em animais infectados pelo *T. cruzi* poderiam explicar a origem da auto-imunidade na doença de Chagas. Em trabalhos desenvolvidos por Teixeira e cols (1991-1994) foram documentados pela técnica de hibridização *in situ* que o kDNA de *T. cruzi* ficava retido no genoma da célula hospedeira, e o DNA exógeno foi identificado em cromossomos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados. Apenas seqüências de minicírculos do kDNA de *T. cruzi* foram encontradas associadas com o DNA genômico de macrófago humano em cultura (Teixeira e cols, 1994). A tese de doutorado de Argañaraz (Universidade de Brasília, 1996) mostrou que seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* inseriam em elementos retrotransponíveis LINE 1 de macrófagos humanos. Em 1991, Outro achado importante (Simões-Barbosa e cols, 1999) foi a demonstração de transferência de seqüência de kDNA de *T. cruzi* e alteração da expressão gênica da célula hospedeira. Simões-Barbosa (Tese de doutorado, Universidade de Brasília, 2000) mostrou a inserção do kDNA de *T. cruzi* em meio à região codificadora do gene P15. Essa inserção, mediada por um elemento retrotransponível (LINE-1), nocauteou o gene, com perda do mRNA p15 (Simões-Barbosa e cols 2006). E, dando continuidade à pesquisa, o grupo de pesquisadores (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols 2011) documentaram que as integrações de kDNA ocorrem durante a infecção natural de mamíferos e de aves. Em uma série de experimentos os autores reproduziram eventos de transferência horizontal e vertical de kDNA em coelhos, humanos e em aves.

Esse conjunto de resultados demonstra que a transferência horizontal e vertical de seqüência de minicírculo de kDNA do parasita produz alterações no genótipo das células do hospedeiro, em mamíferos e em aves refratárias às

infecções pelo *T. cruzi*. De que maneira as células do sistema imune de aves genotipicamente modificadas pelas mutações de kDNA, na ausência de infecção residual, poderiam romper a tolerância imunológica, destruir o coração e dar origem à miocardiopatia semelhante à descrita na doença de Chagas? A reprodução da cardiomiopatia em aves mutadas nascidas de ovo inoculado com *T. cruzi* foi o modelo empregado para avaliar os objetivos desta Tese de Doutorado, conforme segue abaixo:

II. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Estudar a patogênese sem a presença do parasito nas reações autoimunes que rejeitam o coração histocompatível de *Gallus gallus* com kDNA do *T.cruzi* integrado no seu genoma.

2.1.1. Objetivos Específicos

- Conduzir experimentos de transferência de medula óssea de aves kDNA+ para aves kDNA- (sadias) histocompatíveis, visando à produção da cardiopatia inflamatória auto-imune da doença de Chagas.
- Determinar o papel da imunidade celular na patogênese das lesões no coração das aves kDNA+ e ausência de lesões nas aves controles.
- Usar marcadores genéticos e identificar alterações fenotípicas nas células mononucleares do sistema imune:

a) no enxerto de coração singênico;

b) no coração da ave kDNA+

- Analisar os fenótipos das células do sistema imune no coração repórter enxertado no subcutâneo de aves controles e mutadas;

III. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Modelo animal

O Projeto de pesquisa que deu origem a esta Tese de Doutorado foi aprovado pelo Comitê de Ética sobre pesquisa em animais de laboratório. No Anexo1 encontra-se o documento de aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética no uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.

O estudo foi conduzido em aves refratárias às infecções pelo *T. cruzi*. Estudos prévios realizados pela equipe de pesquisadores do LMPDC (Nitz e cols, 2004) mostraram que existe uma pequena janela aberta às infecções pelo *T. cruzi* na primeira semana de desenvolvimento do embrião, quando as formas amastigotas multiplicam em células embrionárias. A partir da segunda semana o *T. cruzi* inoculado no ovo fértil é eliminado pela imunidade inata do embrião.

3.1.1. Aves congênicas de Praga

As linhagens congênicas com haplótipo MHC CB (B12/B12 = K1) e CC (B4/B4 = K2), foram desenvolvidas no Instituto de Genética Molecular da Academia de Ciências da República Checa, a partir da linhagem C produzida em Reasehealth, Inglaterra. As aves de Praga, histocompatíveis para todos os antígenos da classe I e classe II do MHC-B, foram utilizadas como modelo experimental neste estudo. Os ovos férteis foram doados pelo Professor Jiri Hejnar, do Departamento de Ciências Biológicas da Academia de Ciências de Praga, República Checa. A importação de 120 ovos férteis das aves foi feita mediante licença aprovada pelo Departamento de Agricultura e Produção Animal, aqui no Brasil. A República Checa não é região endêmica para a Influenza Aviária, não estando submetida às medidas de restrição de importação da OMS. Dessa forma, os ovos férteis (*Specific Pathogen Free* – SPF), geraram aves que alcançaram o estágio adulto e geraram colônia, mediante inseminação artificial.

Os pintos eclodiram e cresceram no alojamento de animais da Faculdade de Medicina, em salas com sistema de pressurização e filtração de ar, na temperatura de 24-25 °C e níveis exigidos de biossegurança para sanidade animal. Estas aves congênicas para todos os genes do complexo MHC (vide introdução) permitem eliminar a possibilidade de rejeição de homoenxertos. Ademais, a infecção pelo *T. cruzi* estabelecida nos primeiros dias de vida do embrião é prontamente eliminada pelo sistema imune na segunda semana de desenvolvimento do embrião. Ao eclodir, o pinto nasce sem a infecção, mas retém mutações de kDNA no genoma. Por isto a ave é considerada modelo limpo para o estudo sobre origem da patogênese na doença de Chagas (Teixeira e cols 2011, 2012).

3.1.2. Reprodução das aves congênicas B12/B12 e B4/B4 mediante inseminação artificial

A produção de pintos das aves congênicas B12/B12 e B4/B4 foi mantida através de inseminação artificial (Figura 5). Coleta de sêmen de galo era feita duas vezes por semana durante toda a fase experimental. O sêmen coletado era injetado no canal magno evertido da ave. Os ovos férteis eram inoculados com 100 formas tripomastigotas de *T. cruzi*, e colocados em chocadeira a 37.5 °C, com 95% de umidade por 19 dias. Após inspeção em ovoscópio para verificação da fertilidade (embriões), os ovos embrionados eram colocados em berçários a 37.5°C, com 95% de umidade até o dia da eclosão no 21º dia. Após a eclosão os pintos eram transferidos para uma caixa com leito de palha de arroz, onde recebiam água e ração. Após um mês de idade, colhia-se 1 ml de sangue da veia e o DNA extraído era utilizado para avaliação do DNA molde para amplificação de kDNA ou nDNA do *T. cruzi* com *primers* específicos (Nitz e cols, 2004). O controle era feito com DNA de pintos do grupo controle, não inoculados com o *T. cruzi*, da mesma linhagem e idade.



Figura 5: Aspectos da inseminação artificial e produção de pintos das aves congênicas de Praga com haplótipos B12/B12 e B4/B4.

(A, e B) Vista frontal de duas unidades de reprodução. C: massagem da região genital do galo, e colheita do sêmen; D: quantidade padrão de sêmen de um galo; E: Inoculação do sêmen no canal magno evertido da ave; F: Ovos inoculados com o *T. cruzi* em incubadora a 37.5°C. G) Ovos no berçário para eclosão. H: aves nascidas mutadas com o kDNA do parasito no genoma.

3.2. Teste de histocompatibilidade – antígenos MHC-B nas aves congênicas de Praga haplótipos (B12/B12) e (B4/B4)

Com o objetivo de avaliar a histocompatibilidade das aves congênicas de Praga, experimentos de enxertos de pele e enxerto de coração com as aves que atingiam a idade adulta aos seis meses de idade, foram realizados para testar os antígenos do complexo principal de histocompatibilidade.

Antes de cada procedimento experimental as aves eram previamente anestesiadas com injeção intramuscular de Cetamina ® Syntec (12 mg/kg de peso), e Xilazina ® Schering-Plough (1,6 mg/kg), conforme procedimento padrão da Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UnB.

3.2.1. Enxertos de pele

No início da pesquisa foram feitos enxertos de pele entre aves histocompatíveis de haplótipos (B12/B12 e B4/B4). Em seguida foram feitos enxertos de pele entre aves com haplótipos diferentes, ou seja, de K1 para K2 e vice-versa. Os transplantes de pele eram feitos na base do pescoço (região interescapular) de uma ave para outra do mesmo sexo. O enxerto era inspecionado diariamente para avaliação do aspecto da pele enxertada, ao longo de duas semanas.

3.2.2. Enxertos de coração repórter

Foram conduzidos experimentos de transplante de pele e enxerto de coração com a finalidade de analisar a histocompatibilidade das aves congênicas de Praga. Coração de pinto era obtido no dia da eclosão e, após a excisão dos grandes vasos da base, era imediatamente transferido para solução salina em

placa de Petri estéreis. O sangue remanescente era expelido pelas pulsações, e o órgão lavado em salina era seccionado longitudinalmente ao meio. Uma metade era fixada em formol para estudo histológico. A segunda metade era usada para implantação no subcutâneo da base do pescoço (interescapular) da ave adulta, mediante procedimento cirúrgico asséptico (Ribeiro dos Santos e cols., 1992). A ave receptora tinha as penas arrancadas da região interescapular, e a limpeza da pele era feita com álcool iodado. Uma incisão longitudinal na pele e no subcutâneo (1,5 cm) dava acesso ao nicho do enxerto. A metade do coração de pinto obtida no dia da eclosão era introduzida no nicho subcutâneo da ave receptora. A pele era suturada com fio absorvível três zeros. Os enxertos eram retirados do sítio de implantação da ave receptora dos grupos teste e controle, aos 8, 11, e 14 dias.

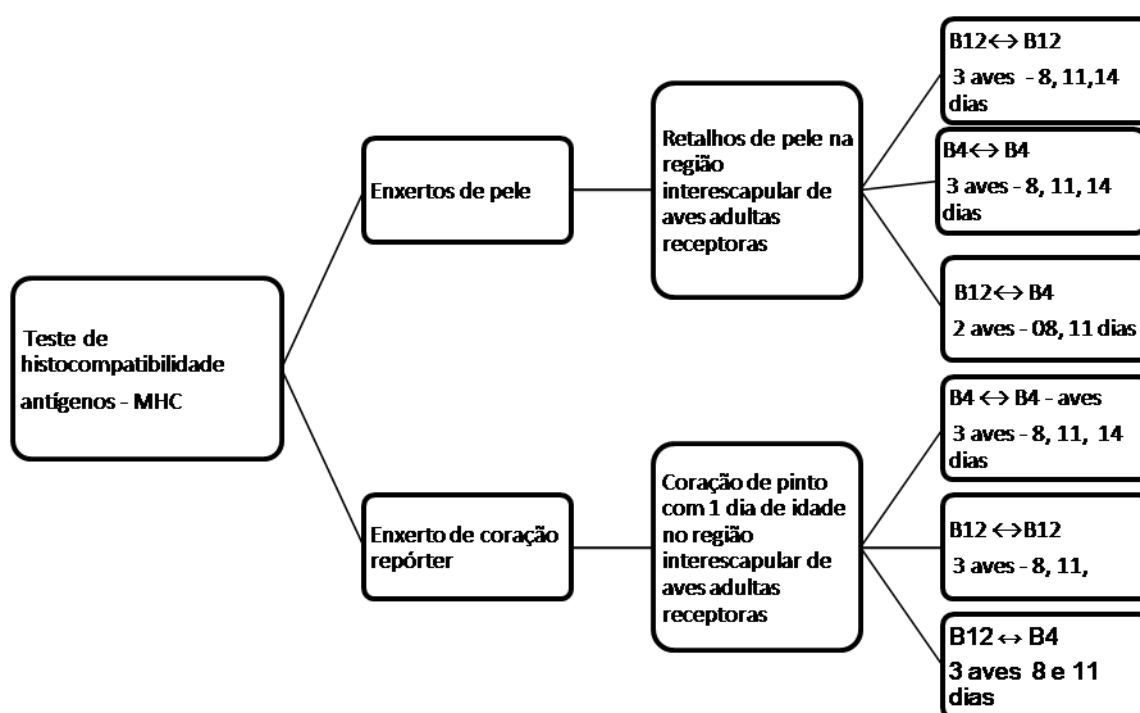


Figura 6: Experimentos realizados para comprovação da histocompatibilidade nas aves congênicas de Praga.

Neste foram utilizadas oito aves doadoras e oito aves receptoras de enxerto de coração de pinto de um dia de idade.

Tabela 1: Aves utilizadas para o experimento do teste de histocompatibilidade.

Origem coração normal	Aves adultas receptoras	Tempo de enxerto (dias)
Enxertos histocompatíveis		
K1-874	K1-146	08
K1-875	K1-140	11
K1-876	K1-153	14
K2-314	K2-019	08
K2-340	K2-033	11
K2 - 334	K2 - 029	14
<u>Enxertos histoincompatíveis</u>		
K2-311	K1-193	08
K2-317	K1-152	11

3.3. Cultivo do *Trypanosoma cruzi*

As formas tripomastigotas foram mantidas em cultura de células cardíacas murinas da linhagem L6, cultivadas com Meio Mínimo Essencial (DMEM), pH 7.2, acrescido de Soro Fetal Bovino (SFB) a 10%, 100 IU/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina sob atmosfera de CO₂ a 5% e à temperatura de 37°C.

3.3.1 Inoculação de *Trypanosoma cruzi* em ovos férteis de galinhas

Formas tripomastigotas, foram previamente quantificadas numa câmara de Neubauer, diluídas numa concentração final (100 formas/10µl salina), e injetadas através de um orifício com 1 mm de diâmetro na casca sobre a bolha de ar, num dos pólos do ovo fértil das galinhas de linhagens K1 haplótipo (B12/B12) e K2 (B4/B4). Cada grupo foi composto por 40 ovos teste e 20 controles. Os ovos

controle (mock) receberam somente 10µl de meio de cultura. Os orifícios na casca foram selados com parafina derretida, e os ovos foram imediatamente transferidos para chocadeira a 37 °C e a 65% de umidade. Os ovos foram inspecionados periodicamente por trans-iluminação num ovoscópio. Células brancas do sangue venoso das aves nascidas dos ovos controles e infectados foram usadas como fonte de DNA para análises da integração do kDNA do parasito (Nitz e cols, 2004). Neste experimento, as aves adultas nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* foram inseminadas para produção de progênes F1, F2 e F3.

3.4. Extração do DNA de *Trypanosoma cruzi*

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram crescidas em meio LIT e colhidas por centrifugação a 1.500 x g por 15 minutos. O sedimento foi lavado duas vezes com TBS, ressuspensão em tampão de lise na concentração de 5×10^7 células por ml de solução, e incubado por 1 hora a 37°C. Após a incubação, foi adicionada proteinase K (100 µg/ml), seguida por incubação por mais 12 horas a 37 °C. A partir desta etapa, foram realizados dois tratamentos com clorofane (Fenol: Clorofórmio: Álcool Isoamílico; na proporção de 25: 24: 1) e com clorofil. (clorofórmio: álcool isoamílico; na proporção de 24: 1). O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% (gelado) e com 1/10 volumes de acetato de sódio 3M, ph 4,7. O sedimento foi lavado duas vezes com etanol 70% (gelado), secado e ressuspensão no tampão TE. O DNA foi analisado e quantificado pela visualização em agarose a 0,8% após eletroforese em tampão TAE 1X. Alíquotas do DNA foram estocadas a 4 °C.

3.4.1. Extração de kDNA do *Trypanosoma cruzi*

A extração de kDNA de *T. cruzi* para a produção de sonda (radioativa ou quimioluminescente) foi realizada segundo a adaptação da metodologia descrita

por Perez-Morga & Englund (1993b). Uma quantidade de 5×10^7 formas de cultivo foi colhida por centrifugação a $1.500 \times g$ por 15 min e o sedimento lavado duas vezes com PBS. Em seguida o sedimento foi ressuspensão em 630 μ l de tampão NET 100 (10mM de Tris-HCl pH 8,0; 100mM de EDTA pH 8,0; 100 mM de NaCl) e as células foram lisadas com 71 μ l de SDS 10%. Foram adicionados 7 μ l de proteinase K (20 μ g/ml) seguido de uma incubação a 37°C por 12h. Após a incubação, o lisado foi gentilmente homogeneizado com ajuda de uma pipeta (P 1000). Então, foram acrescentados 690 μ l de tampão NET-100 com sacarose a 20 %. A mistura foi centrifugada a 14000 rpm por 15 min. Depois, o sobrenadante foi removido cuidadosamente com uma pipeta, deixando aproximadamente 30 μ l. Em seguida, adicionou-se novamente mais 690 μ l de NET 100 com sacarose 20 % e repetiu-se a centrifugação. Depois da segunda centrifugação, o pellet foi ressuspensão em 1 ml de água destilada, seguindo-se duas extrações de clorofane e clorofil. O kDNA foi precipitado adicionando 2,5V (volumes) de Etanol 100% (gelado) e 0,1V de acetato de sódio 3M, pH 8,0. O pellet foi lavado duas vezes com etanol 70% e ressuspensão em 200 μ l de tampão TE. O kDNA foi digerido com *Eco* RI e o produto de digestão corrido em gel de agarose a 0,8% (p/v). Após, cortou-se a banda de kDNA linearizada (1,4 Kb) e eluiu-se em coluna de purificação (GFX PCR and Gel Band Purification Kit – Amersham Biosciences). O kDNA foi mantido a 4°C.

3.4.2. Extração de DNA de células nucleadas do sangue periférico das aves congênicas B12/B12e B4/B4

O DNA genômico foi extraído de 1 ml de sangue venoso de cada um dos 80 pintos que compuseram a amostragem. Após a coleta, o sangue foi centrifugado a $1.300 \times g$ por 10 min, o plasma sobrenadante descartado e o sedimento lavado duas vezes com TBS (20 mM Tris-HCl pH 7,2; 0,5 NaCl) a $3.500 \times g$ por 15 min. O sedimento foi posteriormente ressuspensão em 5 ml de tampão de extração (1 mM Tris-HCl pH 8,0; 0,5 % SDS). Sabendo-se que as hemácias de aves são nucleadas, foi feita ressuspensão das células do sangue

com tampão de extração. As células foram então submetidas ao tratamento, por duas vezes, com igual volume de clorofane, com posterior separação das fases orgânica e aquosa por centrifugação a 5000 x g por 10 mim, para retirar proteínas do DNA. Este procedimento foi seguido pelo tratamento com igual volume de clorofil, e centrifugação a 5000 x g por 10 mim. O clorofil retira o fenol da amostra. Todos os tratamentos foram feitos à temperatura ambiente e sob leve agitação. O DNA foi precipitado com 2,5 volumes de etanol 100% (gelado) e 1/10 volumes de acetato de sódio 3 M, ph 4,7. Este material foi então colocado em incubação a 80 °C por 30 minutos e centrifugado a 12.000 x g a 4 °C, por 15 minutos. O sedimento resultante foi lavado duas vezes com etanol 70 % (gelado), secado ao ar livre e ressuspenso em tampão TE (10 mM Tris-HCl pH 8,0; 1 mM EDTA pH 8,0).

3.4.3. Identificação do DNA mitocondrial (kDNA) retido no genoma de pintos eclodidos de ovos inoculados com *T. cruzi*

O DNA foi analisado e quantificado com eletroforese utilizando tampão TAE (90 mM tris-acetato pH 8,0, 25 mM EDTA) em gel de agarose 0,8 % e estocado a 4 °C. O controle de qualidade do DNA extraído foi demonstrado pelas ampliações com primers de β -Actina. As ampliações por PCR foram conduzidas com DNA molde de cada uma das aves, tal como descrito nos trabalhos prévios de (Nitz e cols, 2004; Simões-Barbosa, e cols 2006; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011).

3.4.4. Amplificação de seqüência de minicírculos de kDNA e *Southern blots* para identificar integração com sonda específica

As PCRs para amplificação de kDNA e de DNA nuclear (nDNA) do *T. cruzi* foram conduzidas com *primers* específicos mostrados na Tabela 2. As amplificações foram feitas com 100ng de DNA mais tampão de reação (50 mM KCl, 10mM Tris-HCl pH 9.0, and 1.5mM MgCl₂, 50ng de cada primer, 0.2 mM dNTPs e 2.5 unidades de Taq polimerase (Promega). Controle positivo (DNA de *T. cruzi*) e controle negativo (DNA de ave de Praga) foram incluídos em cada experimento e as amplificações foram feitas em termociclador modelo PTC-100 (MJ Research Thermocycler) com a seguinte programação: 94 °C x 5 min, 32 ciclos de 94 °C por 30 segundos, anelamento por 1 min a 72 °C, mais 72 °C for 7 min e incubação a 4 °C. As reações foram feitas em triplicatas e os produtos de amplificação foram identificados pela eletroforese em gel de agarose a 1% corado com 1 µl de 0.5 mg/ml de brometo de etídio. Esses produtos de amplificação foram transferidos para membrana de nylon e hibridizados com sonda específica marcada com α³²P-dATP.

As sondas foram marcadas pelo método polinucleotídeo-quinase T4 recomendado pelo fabricante (Invitrogen): 30ng de DNA no volume final de 25 µl foi desnaturado a 100 °C durante 10 min e transferido para o gelo. Na solução gelada foi acrescentado 2µl de dCTP, dGTP and dTTP, mais 15µl de solução tampão. Então, acrescentou-se 3 µl de [δ-³²P] dATP (3000 µCi) e 1 µl de Klenow e a reação continuou por 3 h a 25 °C até adição de 5µl de tampão de parada. Sondas rádio marcadas foram purificadas através de filtração em colunas de Sephadex G50. As membranas Biodine B foram pre-hibridizadas por 4 h a 65 °C em solução contendo PEG 800 10%, SSPE 1.5% e SDS 7%, de acordo com as instruções do fabricante (Invitrogen). As sondas desnaturadas foram adicionadas a solução e a hibridização continuou por 18 h a 65 °C. As membranas foram lavadas com 2X SSC /1% SDS por 15 min seguidas de duas lavagens em 0.1X SSC/1% SDS a 65 °C por 15 min. Membranas umedificadas foram envolvidas em filme plástico para exposição em cassete com intensificador Kodak T-Mat e incubadas a -80 °C. O tempo de exposição variou entre 12 h e uma semana.

Tabela 2: Primers empregados para identificação de seqüência de kDNA, nDNA, e β -actina no genoma de aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*

Primer	Seqüência	Referência
S35	5'- ATA ATG TAC GGG (T/G)GA GAT GC - 3'	Sturm e cols 1989
S36	5'- GGT TCG ATT GGG GTT GGT G- 3'	
TcZ 1	5'- CGA GCT CTT GCC CAC ACG GGT GCT- 3'	Moser e cols 1989
TcZ 2	5'- CCT CCA AGC AGC GGA TAG TTC AGG - 3'	
PON 1	5'- TGG CTT GGA GGA GTT ATT GT- 3'	Requena e cols 1992
PON 2	3'- AGG AGT GAC CGT TGA TCA GT- 5'	

3.4.5. Southern Blot Genômico

Após a separação eletroforética, os 50 μ g de DNA da reação de digestão enzimática foram transferidos do gel para membrana de *nylon* carregada (Hybond XL- Amersham Pharmacia Biotech). O gel de agarose foi inicialmente depurinado com solução de 0,2N de HCl por 10 min, seguido por dois enxágües com água destilada. Logo após, o gel foi tratado com a adição de 10 volumes de solução de desnaturação (0,4M NaOH) por 45 min, sob leve agitação e enxaguado com água por duas vezes. Após os tratamentos no DNA, este foi transferido do gel para uma membrana de *nylon* através da técnica de transferência alcalina por capilaridade, descrita por Sambrook & Russel (2001). A técnica consiste em utilizar uma solução de desnaturação (NaOH 0,4M) que transfere por capilaridadeo DNA do gel de agarose para a membrana.

3.5. Padronização da quantidade de aves mutadas e não mutadas com o kDNA do *T. cruzi*.

Nesse estudo verificou-se, que 72,2% dos pintos que nasceram de ovos inoculados com *T. cruzi* tinham o kDNA integrado no genoma haplótipo B12/B12. 81,5 dos pintos haplótipo B4/B4 tinham a integração de kDNA no genoma. Essa integração foi demonstrada por PCR com primers de kDNA e hibridização com sonda específica. O total de 68 pintos nascidos de ovos inoculados com o *T. cruzi* com kDNA retido no genoma, foram usados nesses experimentos (Tabela 3).

Tabela 3: Integração de kDNA no genoma aves congênicas

Haplótipos	Linhagem	Mutação	Total	Teste- PCR X 3
B12/B12	K1	Positiva	48	Positivo
B12/B12	K1	Negativa	30	Negativo
B4/B4	K2	Positiva	20	Positivo
B4/B4	K2	Negativa	10	Negativa

Total 108 (cento e oito aves), sendo 63% kDNA +.

3.6. Pesquisa de anticorpos contra antígenos de coração e de *T. cruzi*

Dois grupos de aves compuseram a amostra do estudo: *i*) soro de 29 aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* que retiveram o kDNA no genoma, *ii*) soro de 29 aves controles sem contato com o protozoário, *iii*) soro de 12 pacientes chagásicos e 12 de pacientes controles sadios do banco de soros do LMPDC. A pesquisa dos anticorpos foi feita pelo teste ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*). O objetivo do estudo foi identificar anticorpos específicos contra antígenos do parasito e antígenos das células cardíacas.

As formas epimastigotas de *T. cruzi* foram colhidas após centrifugação a 3.000 rpm por 15 min a 4 °C, lavadas três vezes e ressuspensas em 2 mL de PBS pH 7,4. Corações de pinto kDNA+ e kDNA- foram esgarçados e cortados em pequenos pedaços (2 a 3 mm) para preparação de antígenos. Fragmentos de coração de pinto e sedimento de formas epimastigotas de *T. cruzi* foram lavados três vezes em PBS, suspensos em tampão hipotônico de lise: (HEPES 10 mM, pH 7,9 a 4 °C, MgCl₂ 1,5 mM, KCl, 10mM) com inibidores de proteases (Leupeptina e TLCK 0,2 mM, e DTT0, 5 mM). Em seguida, as células foram rompidas mecanicamente com auxílio de piston de teflon em tubo de vidro, em seis ciclos de 30 segundos a 4 °C. Os triturados foram centrifugados a 5.000 rpm por 15 min a 4 °C. O sobrenadante foi novamente centrifugado a 14.000 rpm por 10 min e o sedimento foi descartado. O sobrenadante colhido foi diluído em PBS 0,1 M, pH 7,4, e a concentração de proteínas nos antígenos solúveis foi determinada pela leitura em espectrofotômetro (Nanovue plus, GE) em DO 280 nm. As absorbâncias obtidas foram usadas para construir curva nos moldes do padrão construído com concentração conhecida de BSA. Alíquotas dos extratos foram armazenadas a -80 °C até o momento do uso. Microplacas com 96 cavidades de fundo chato foram sensibilizadas separadamente com 50 µL/poço de cada um dos antígenos solúveis (antígenos de coração de aves kDNA+; idem, kDNA-; e, antígenos de *T. cruzi*). Esses antígenos foram diluídos em PBS pH 7,4 de forma a conter 0,1 µg/poço do antígeno de *T.cruzi* e 1.0µg/poço de antígeno do coração de aves. As placas foram divididas em 3 grupos: grupo A,

com antígenos das células cardíacas de ave mutadas *versus*: a) soro de ave mutada; b) soro de ave normal; c) soro humano chagásico; e, d) soro humano não-chagásico. Grupo B: com antígenos de células cardíacas de ave normais *versus*: e) soro de ave normal; f) soro de ave mutada; g) soro humano chagásico; h) soro não-chagásico. Grupo C, com antígenos de *T. cruzi* *versus*: i) soro de aves normais; j) soro de aves mutadas; k) soro de chagásico; l) soro de não chagásico. Os testes foram feitos em triplicatas.

As placas com os antígenos foram incubadas por 18 horas a 4 °C em câmara úmida (*Overnight*). No dia seguinte o excesso do antígeno foi retirado com três lavagens com salina tamponada fosfatada (PBS) pH 7,4 contendo 0,05% de *Tween-20* (PBS-T). Possíveis sítios inespecíficos de adesão de proteínas nos poços foram bloqueados com PBS/leite desnatado 5% (100µL/poço) durante incubação por 2 h a 37 °C em câmara úmida. Repetiu-se o procedimento de lavagem e colocaram-se os soros das aves e dos pacientes chagásicos e seus respectivos controles. Os soros diluídos 1: 100 em PBS/leite desnatado 2% foram adicionados (50 µL/poço, em triplicata). Após incubação de 2 h a 37 °C, em câmara úmida as placas foram novamente lavadas com (PBS, pH 7,4) contendo 0,05%, de *Tween-20* (PBS-T). Os conjugados anti-imunoglobulina de galinha marcada com fosfatase alcalina, (SIGMA – A1043) lote 98 H4882, e anti-IgG humana marcada com fosfatase alcalina (Zymed – 81 – 7122) lote 60304069 foram usados respectivamente, na diluição de 1: 1000 e 1:2000 após diluição em PBS, pH 7,4 contendo 2% de leite em pó desnatado (Molico, Nestlé). O conjugado diluído era adicionado à placa (50 µL/poço) depois incubada por 2 h a 37 °C em câmara úmida. Ao fim da incubação, o excesso de reagente foi retirado por três lavagens com PBS-T. A revelação dos imunocomplexos foi feita pela adição (50 µL/poço) do substrato pNPP (p-nitrofenil fosfato) em tampão de dietanolamina pH 7,9 (Sigma). Após o desenvolvimento da reação cromógena por 10 min à temperatura ambiente, na ausência de luz, a leitura foi feita em espectrofotômetro (*BioTeK- Synergy HT*) a 490 nm.

Os testes ELISA foram padronizados pela determinação da DO (densidade óptica) a 490 nm em triplicata nos poços sem soro (branco) e nos poços contendo soros controles de aves ou de humanos para cada tipo de

antígeno. Neste estudo o resultado de um teste positivo foi considerado absorvância igual ou superior ao ponto de corte relativo a cada tipo de antígeno. O ponto de corte usado para identificar anticorpos antiproteínas do coração de aves kDNA-, kDNA+ e anti- *T. cruzi*, foram: de 0, 145, 0, 138, e 0, 179 respectivamente. O soro positivo e negativo de humano foi utilizado para verificar a validade da reação.

3.7. Grupos experimentais formados

Aves adultas, machos e fêmeas com 6 a 12 meses de idade foram divididas em dois grupos. A) Grupo controle, aves que receberam injeção de fluorocromo verde, em intervalos de duas semanas. B) Grupo teste, aves kDNA-mutadas, nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*, que receberam três injeções (2 ml) 2×10^{-6} M de fluorocromo vermelho, em intervalos de duas semanas. (C e D) Grupos experimentais formados, respectivamente, por aves controles e kDNA-mutadas que não receberam fluorocromos. Os grupos C e D foram empregados nos experimentos de fenotipagem das células imunes que infiltram no coração da ave receptora e no enxerto do coração repórter de pinto de um dia.

As aves B12/B12 e B4/ B4 foram designadas, respectivamente, como K1 e K2 (produzidas em Kolec, na fazenda do Instituto de Genética Molecular, Academia de Ciências de Praga, República Checa, onde essas linhagens são mantidas).

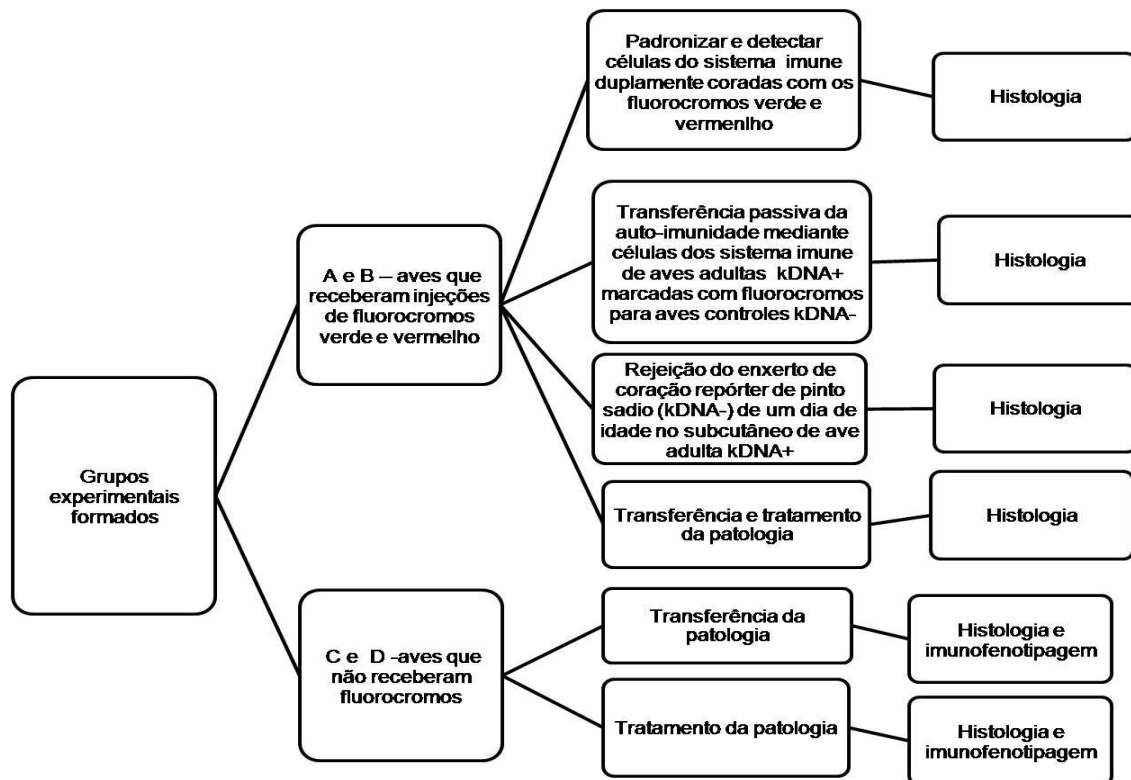


Figura 7: Fluxograma dos experimentos conduzidos nas aves congênicas de Praga usadas para análises da patogênese da cardiomiopatia e sua inibição pela transferência de medula óssea.

3.7.1. Grupos experimentais A e B

3.7.2. Padronização, detecção e localização das células do sistema imune marcadas com fluorocromos PkH 67 (Verde) e PkH 26 (Vermelho) nas aves mutadas e controles

O objetivo desse experimento foi padronizar e detectar a localização das células do sistema imune marcadas com fluorocromos nas aves mutadas e controles. Foram utilizadas aves K1 kDNA-positivas e negativas (Tabela 5). O experimento consistiu na injeção de fluorocromo vermelho (PkH 26) na veia ulnar de duas aves K1-positivas e de duas aves K1-negativas. Aos 14 dias pós-enxerto

foram sacrificadas uma ave positiva e uma negativa. Nas outras duas aves (uma positiva e uma negativa) desse experimento injetou-se corante verde (PKH 67), na expectativa de que seus leucócitos fossem marcados duplamente pelos fluorocromos vermelho e verde. Seis dias após a aplicação do fluorocromo verde as aves foram sacrificadas. Amostras de coração, baço, intestino e medula óssea foram retiradas para confecção de lâminas histológicas. Os tecidos foram examinados em microscopia óptica de campo claro e luz UV utilizando filtros com comprimentos de onda adequados. Este experimento teve como objetivo analisar o transito das células sanguíneas originadas da medula óssea, pelo timo, baco, intestino, músculo esquelético e coração, e pelos vasos linfáticos e linfonodos das aves kDNA-mutadas e nos controles normais. Adicionalmente, o experimento visou a localizar as células do sistema imune marcadas duplamente com fluorocromos nas aves kDNA-mutadas e nos controles, normais. Para isso foram utilizados os corantes PKH26 (vermelho) e PKH67 (verde) na concentração de 5 μ M em 5×10^6 células/mL. Desta forma, a padronização da marcação das células sanguíneas no baço, medula óssea, intestino, tecido muscular esquelético e coração, foram efetuados conforme instruções do fabricante (Sigma-Aldrich).

Tabela 4: Grupo de aves que receberam fluorocromos vermelho e verde

Aves K1 Negativas	Aves K1 Positivas
K1-109 Corante vermelho	K1-110 Corante vermelho
K1-153 Corantes vermelho e verde	K1-154 Corantes vermelho e verde

3.7.3. Transferência passiva da auto-imunidade mediante células do sistema imune de aves adultas kDNA+ marcadas com fluorocromos PkH 67 (Verde) e PkH 26 (Vermelho) injetadas em pintos mutados K1 com um mês de idade.

O objetivo desse experimento foi tentar produzir lesão no miocárdio de ave controle (kDNA-) receptora de células imunes de aves kDNA+. Primeiramente foi determinado o peso da ave para saber qual o volume de sangue que podia ser colhido. $\text{Peso da ave (kg)} \times 55 \text{ mL de sangue/kg} \times 10\% = \text{quantidade de sangue a ser colhido com anticoagulante EDTA}$. O sangue colhido foi colocado em tubo Falcon contendo a mesma quantidade de Ficoll (Histopaque-1077® - Sigma-Aldrich). As amostras foram centrifugadas a 400 g x 30 min (5000 rpm) a temperatura ambiente. O sedimento (*buffycoat*) resultante de células brancas acima dos eritrócitos foi então coletado e transferido para outro tubo de 15 ml. As células foram lavadas com 5 mL de PBS e centrifugadas a 800 g x 10 min, e ressuspensas em 2mL de PBS, pH 7,4. Após ressuspensão do sedimento as células foram contadas em câmara de Neubauer (1×10^7 células/mL), incubadas por 10 min a temperatura ambiente com 1×10^{-6} M de um dos respectivos fluorocromos (PKH 67 ou PKH 26). Depois da incubação as células coradas com os fluorocromos foram lavadas cinco vezes em PBS, mediante centrifugação a 800 g x 10 min. Uma série de cinco injeções com 1×10^6 células do sistema imune coradas com os corantes fluorescentes (vermelho e/ou verde), seguindo o protocolo do fabricante, eram injetadas em cada ave receptora (pintos com um mês de vida). Neste experimento não houve enxerto de coração repórter, somente injeção de células do sistema imune de aves K1 mutada ↔ K1 normal, K1 normal ↔ K1 normal Tabela 5.

Tabela 5: Transferência passiva de células mononucleares do sangue de aves adultas marcadas com corantes fluorescentes para pintos de um mês de idade histocompatíveis.

Aves K1 kDNA+doadoras de linfócitos	Aves (1 mês) Receptoras sadias	Aves K1, controles doadoras de linfócitos	Aves (1 mês) Receptoras sadias
K1 091	K1 184	K1 193	K1 139
K1 171	K1 150	K1 140	K1 117
K1 160	K1 134	K1 067	K1 155
K1 123	K1 180	K1 029	K1 177
K1 191	K1 131	K1 174	K1 172
K1 034	K1 061	K1 033	K1 062
K1 035	K1 053	K1 018	K1 050

Aves utilizadas: sete aves mutadas doadoras de células do sistema imune, duplamente marcadas com os fluorocromos, para aves receptoras normais. Sete aves controles doadoras de células do sistema imune, duplamente marcadas com os corantes, para aves receptoras normais. Total, 24 aves

3.7.4. Enxerto de coração normal de pinto em aves K1 mutadas com kDNA do *T. cruzi*

O objetivo desse experimento foi verificar a rejeição ou aceitação do enxerto do coração histocompatível em aves congênicas. Na primeira etapa do estudo, enxertou-se coração de pinto normal com um dia de vida (sem integração de kDNA) no tecido subcutâneo da região interescapular de seis aves adultas sadias (sem mutação), e de seis aves mutadas mediante procedimento cirúrgico asséptico, (Ribeiro dos Santos e cols, 1992). O procedimento foi realizado no Centro de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Esse grupo de experimentos está descrito na Tabela 6. Os corações enxertados foram retirados aos 8, 11, 14 e 17 dias após o enxerto. Os fragmentos retirados foram fixados em formol tamponado, e inclusos em parafina para

confeção de lâminas histológicas. As aves foram previamente anestesiadas por especialista, conforme procedimento padrão do laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina da UnB.

Tabela 6: Enxerto de coração de pinto sadio, histocompatível, em aves K1 adultas mutadas com kDNA em aves controles.

kDNA-mutadas	Controles	Tempo do enxerto (dias)	PKH [1,0 x 10⁶]
K1 210	K1 067	08	Vermelho
K1 203	K1 116	11	Vermelho e verde
K1 065	K1 143	14	Vermelho e verde
K1 129	K1 218	17	Vermelho e verde
K1 206	K1 186	20	Vermelho e verde
K1 030	K1 032	11	Vermelho e verde

3.7.5. Transferência da patologia de ave doente mutada para ave controle sadia

O experimento de transferência da medula óssea de aves congênicas foi dividido em duas etapas. Na primeira, realizou-se a transferência de medula da ave mutada (kDNA+) para ave receptora sadia, controle. Neste experimento, as aves receptoras (negativas) foram tratadas com citostático (Metotrexato – Fauldmetro® 150mg/kg por via intravenosa), mais inibidor de ácido fólico (Bussulfano - Myleran® 14mg/kg de ave por via oral), para ablação da medula óssea (Brinster & Avarbock, 1994; Brinster & Zimmermann, 1994). Dois dias depois, as aves que tiveram a medula óssea destruída pela combinação de citostático com inibidor de ácido fólico, recebiam 5 mL de medula óssea aspirada dos fêmures (direito e esquerdo) das aves kDNA+. As células de medula óssea foram injetadas nos fêmures das aves controles (kDNA-) sadias. Vinte dias após o

transplante de medula era injetado corante vermelho nas aves doadoras (kDNA +) e corante verde nas aves receptoras (kDNA-). Quinze dias após injeção do corante verde, enxertava-se metade do coração de pinto controle (kDNA-) sadio no subcutâneo das aves doadoras positivas e nas receptoras negativas. Os corações enxertados foram retirados para análise histopatológica aos 11 dias após o enxerto figura 8.

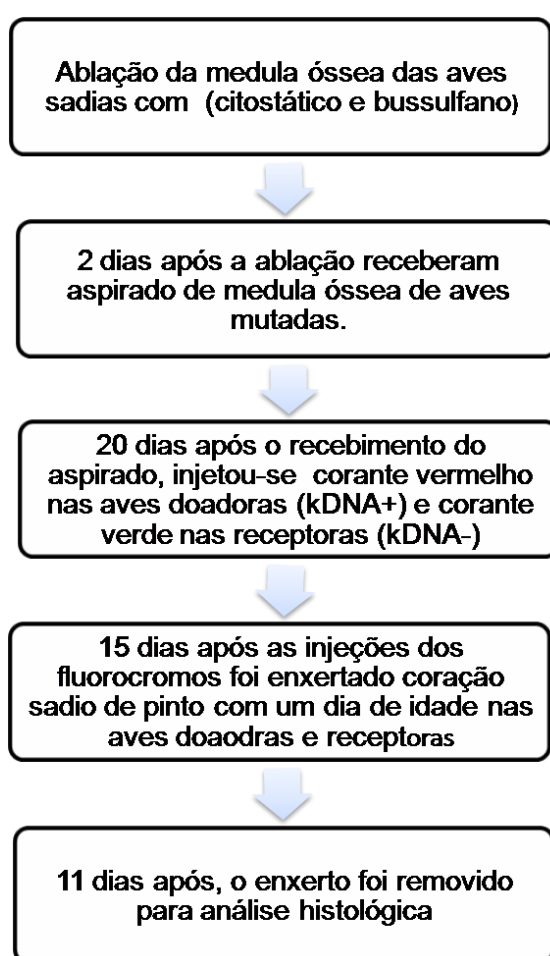


Figura 8: Organograma do experimento transferência da patologia.

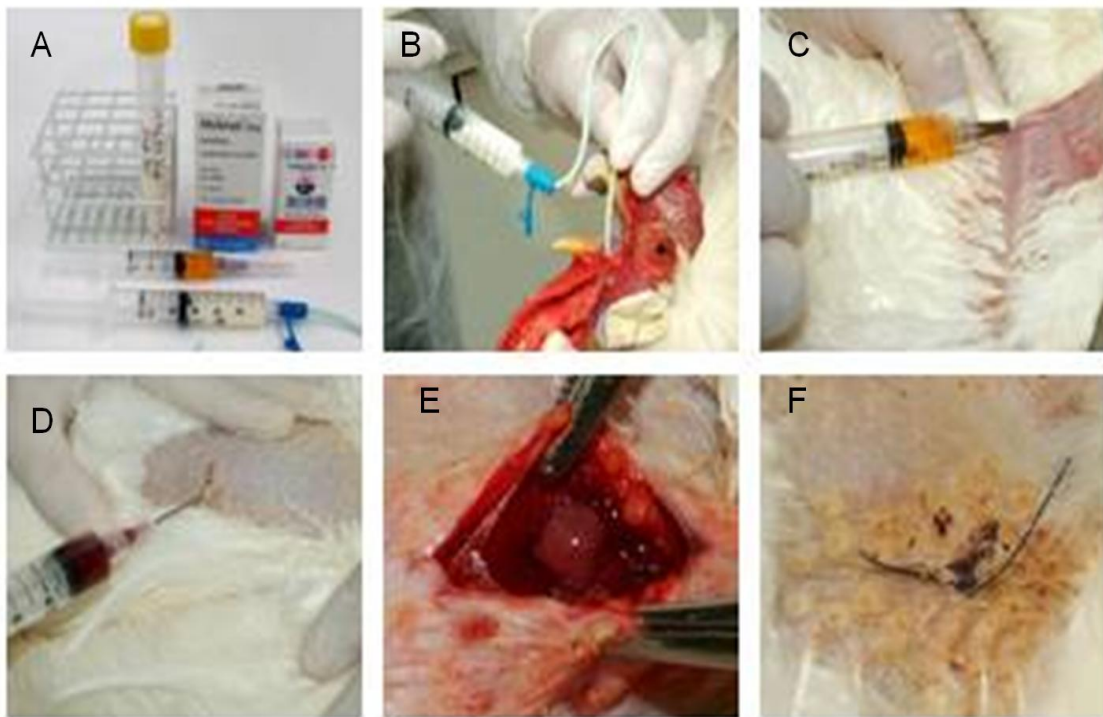


Figura 9: Tansferência da patologia.

A) Metotrexato – Fauldmetro (Bussulfano - Myleran®)14mg/kg. B e C) injeção das drogas para ablação das células da medula óssea da ave mutada doadora. D) aspirado da medula da ave doadora e injeção no fêmur da ave receptora normal. E e F) Transplante do coração repórter.

Tabela 7: Transferência da patologia de ave doente mutada para ave controle sadia*

Ave kDNA+ doadora de medula óssea *	Ave controle (kDNA-) receptora de medula óssea *
K1 210	K1 204
K1 233	K1 217
K1 239	K1 223
K1 136	K1 198
K1 065	K1 271
K1 122	K1 176
K1 219	K1 216
K1 129	K1 148
K1 287	K1 222
K1 206	K1 205
K1 141	K1 218
K1 257	K1 194

* Aves kDNA+ que doaram as células da medula óssea para as suas receptoras sadias.

* Aves que tiveram a medula óssea destruída com citostático e antimetabólico e receberam enxerto de medula óssea de ave kDNA+.

3.7.6. Tratamento da Patologia de aves kDNA+ receptoras de medula óssea de aves sadias kDNA-

Aves mutadas (kDNA+) tiveram a medula óssea destruída pela ação do (Metrotrexato® 150mg/kg/ave e Myleran® (bussulfan) 14mg/kg/ave). Dois dias depois, as aves com a medula óssea destruída pelas drogas, recebiam 5 ml de medula óssea aspirados dos fêmures (direito e esquerdo) das aves doadoras sadias, controles (kDNA-). Vinte dias após transplante de medula, foi injetado corante vermelho (PKH26) nas aves receptoras kDNA+ que tiveram medula óssea destruída pelas drogas, enquanto que as aves controles, sadias (kDNA-),

doadoras de medula óssea receberam corante verde (PKH67). Quinze dias após injeção dos corantes, enxertou-se coração de pinto de um dia idade (controles, sadios) no subcutâneo das aves doadoras e receptoras. Os corações enxertados foram retirados após 11 dias, fixados em formol, embebidos em parafina para obtenção de secções de 4 µm de espessura, para exame ao microscópio com luz ultravioleta com filtros excitador e emissor, respectivamente, 551 nm e 567nm para o corante vermelho PKH-26GL, e com os filtros respectivos 490 e 502 nm para o corante verde PKH67-GL. Secção de cada bloco também foi corada pela Hematoxilina-Eosina para o estudo histopatológico figura 10.

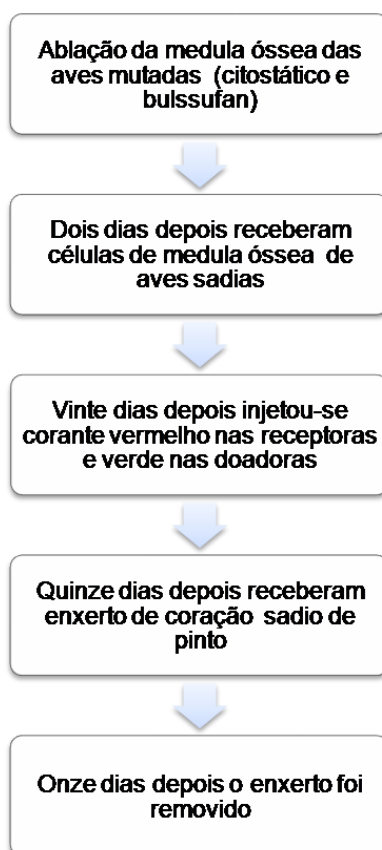


Figura 10: Fluxograma do experimento com objetivo de obter tratamento da patologia de aves mutadas (KDNA+) mediante enxerto de medula óssea de aves saudáveis (KDNA-).

Tabela 8: Tratamento da patologia de aves mutadas (kDNA+) mediante enxerto de medula óssea de aves saudáveis (kDNA-).

Ave kDNA-doadora de medula óssea *	Ave kDNA+ receptora de medula óssea *
K1 067	K1 221
K1 152	K1 203
K1 280	K1 187
K1 143	K1 160
K1 112	K1 259
K1 116	K1 246

* As aves kDNA- saudáveis doaram medula óssea para aves testadas (kDNA+) que tiveram a medula óssea destruída com citostático e antimetabólico *

3.8. Grupos experimentais C e D. Aves que não receberam fluorocromos

3.8.1 Transferência da patologia de aves kDNA+ para receptoras saudáveis kDNA-

O objetivo desse experimento foi identificar os fenótipos das células efectoras do sistema imune no coração repórter e coração adulto das aves controles e mutadas. Nove aves controles (kDNA-) saudáveis tiveram a medula óssea destruída com drogas conforme descrito no item 3.7.5. Dois dias depois as nove aves tratadas receberam medula óssea de aves kDNA+, e 15 dias depois essas aves receptoras receberam enxerto de coração de pinto controle, saudável (kDNA-) de 1 dia de idade. Após 11 dias, os corações enxertados foram retirados do subcutâneo, fixados em formol, e incluídos em parafina para confecção de lâminas histológicas. Foram feitas 20 secções seriadas de 4 µm de espessura, guardadas a 4^o C para estudo imunocitoquímico. A décima secção foi usada para coloração pelo método H-E (tabela 9).

Tabela 9: Transferência da patologia de aves mutadas para aves saudas

Aves kDNA+ doadoras de medula *	Aves kDNA- *receptoras de medula *
K1 480	K1 464
K1 367	K1 255
K1 480	K1 495
K1 446	K1 351
K1 2893	K1 2638
K1 2898	K1 2637
K1 2645	K1 2633
K1 3644	K1 2635
K1 2643	K1 2612

* Aves congênicas controles saudas (kDNA-) tiveram a medula óssea destruída com drogas, e receberam medula óssea de ave mutada kDNA+ *

3.8.2 Tratamento da patologia em aves kDNA+ mediante transplante de medula óssea de aves controles, saudas (kDNA-)

Aves congênicas positivas K1 foram tratadas com Metrotrexato (150mg/kg) e Bussulfano (14mg/kg) e dois dias depois receberam medula de aves negativas. Era aspirado 5 mL de células da medula óssea dos fêmures (direito e esquerdo) das aves controles (kDNA-, doadoras). As células aspiradas eram injetadas nos fêmures das aves receptoras (kDNA+, que tiveram a medula óssea destruída com drogas). Vinte dias após as aves kDNA+ receptoras de medula óssea sadia receberam enxerto de coração de pinto kDNA-, de um dia de idade, no subcutâneo. As aves controles, saudas, doadoras de medula óssea também receberam enxerto de coração no subcutâneo. Os corações enxertados foram então retirados 11 dias pós-enxerto. O tecido foi fixado em formol e processado

para estudo histológico e imunocitoquímico conforme descrito no item 3.9.1 e subsequentes (Tabela 10).

Tabela 10: Tratamento da patologia em aves mutadas (kDNA+) mediante transplante de medula óssea de aves controles, sadias (kDNA-).

Aves kDNA-doadoras de Medula *	Aves kDNA+receptoras de Medula *
K1 275	K1 375
K1 323	K1 329
K1 317	K1 059
K1 300	K1 331
K1 2622	K1 2643
K1 2632	K1 2644
K1 2580	K1 2645
K1 2609	K1 2893
K1 2438	K1 2898

* Aves congênicas mutada (kDNA+) tiveram a medula óssea destruída com drogas e receberam medula óssea de aves controles, sadias *

3.9. Histologia

3.9.1. Procedimento histológico

Os tecidos obtidos foram conservados e fixados em formol tamponado a 10% para preparo do exame histopatológico. Os tecidos seccionados, foram identificados e colocados dentro de cassetes, e desidratados em banhos sucessivos com alcoóis de teor crescente (70%, 80%, 90% e 100%) por 30 min cada. Em seguida foram diafanizados em xilol por três vezes consecutivas, por 30min cada, impregnados em banhos de parafina a 60 °C no interior de uma estufa, e inclusos em parafina fundida. Os blocos eram seccionados com 4 µm de

espessura em micrótomo de rotação (Leica RM2135RT) no Laboratório de Cirurgia Experimental da Faculdade de Medicina, UnB.

3.9.2. Coloração hematoxilina-eosina

As lâminas com os cortes dos tecidos obtidas foram desparafinizadas em três banhos consecutivos de xilol por cinco minutos, hidratadas gradativamente em álcool com teores decrescentes (100%, 90%, 80% e 70%). Coradas com hematoxilina por 5 minutos, lavadas em água corrente, passadas no diferenciador alcoólico, lavadas novamente, e mergulhadas em solução de amoníaco. Após estes procedimentos, as lâminas eram coradas com eosina por 3 minutos. Em seguida eram desidratadas em álcool com teores crescentes (70%, 80%, 90% e 100%), mergulhadas em xilol por três vezes consecutivas, e montadas com Entellan® - Merck. A leitura foi feita em microscópico modelo Olympus BX51. A foto de cada lâmina foi capturada por micro câmera Olympus DP76- U-TV0 - 63XC com programa Cels Sens Dimension Software montado em analisador de imagem.

3.10. Imunohistoquímica

Fizeram parte deste estudo, as aves dos grupos C e D (que não receberam fluorocromos) que participaram do experimento da transferência e inibição da patologia. O objetivo desse experimento foi identificar os fenótipos celulares no coração enxertado e coração das aves adultas mutadas e normais. Para esse intento, lâminas com os tecidos histológicos a serem analisados foram submetidas à processamento imunohistoquímico, por meio de três banhos consecutivos em xilol, hidratados gradativamente em álcool de teor decrescente (100%, 90%, 80% e 70%). A recuperação antigênica foi feita em tampão citrato (0,01 M; pH 6,0), utilizando forno de micro-ondas com potência 100, à temperatura de 95 °C, por 20 minutos. O bloqueio das ligações inespecíficas foi feito com leite em pó desnatado a 10% em PBS, pH 7.4, por 45 minutos a 37 °C em câmara úmida. Os tecidos foram incubados com anticorpos monoclonal

mouse anti-chicken biotinizados (Southernbiotech, Birmingham AL) por 2 h a 37° C em câmara úmida. Após incubação, eram lavados com PBS por três vezes, e incubados por uma hora e meia com o anticorpo secundário monoclonal antibiotina produzido em camundongo e conjugado com CY3, (Sigma, clone BN-34). Após incubação, as lâminas com os tecidos foram lavadas em PBS, e contra coradas com hematoxilina de Harris por 2 minutos, desidratadas em álcool, passadas no xilol e montadas com Entellan® - Merck. O controle de qualidade foi avaliado pela omissão do anticorpo primário para cada caso estudado. A leitura das lâminas era realizada em microscópio com luz UV com filtro próprio para CY3 e FITC. A seleção da área a ser analisada era capturada por micro câmera Olympus DP76- U-TV0 - 63XC e o programa Cells Sens Dimension Software montado em analisador de imagem.

3.11. Marcadores moleculares usados na análise imunohistoquímica

As moléculas CD (*cluster of differentiation*) são usadas para identificar tipo celular, estágio de diferenciação e atividade de uma célula. As populações de linfócitos CD8 são subdivididas pelas diferentes expressões das cadeias α ou β que variam em diferentes órgãos (Tregaskese cols, 1995). Além disso, os linfócitos T de aves podem ser divididos em três subpopulações baseando-se na expressão de diferentes tipos de receptores de linfócitos T (TCR), que são os TCR1 (ou TCR $\gamma\delta$), TCR2 (ou $\alpha\beta$ V β 1) e TCR3 (ou $\alpha\beta$ V β 2) (Lahti e cols, 1991). O TCR é a molécula reconhedora de antígenos dos linfócitos T, que se liga ao complexo MHC com o antígeno apresentado por células apresentadoras de antígeno ou células infectadas. As células com TCR do tipo $\alpha\beta$ são o maior grupo de células efectoras em galinhas. Os co-receptores CD4 ou CD8 auxiliam o TCR no reconhecimento e ligação às moléculas de MHC contendo peptídeos (Sharma, 1990).

Anticorpos monoclonais primários e secundários biotinizados, antiproteínas de superfície de células de galinha, foram adquiridos da Southern Biotechnology Associates, Inc., e usados na diluição 1/20, como seguem: 1) anticorpo monoclonal **anti-CD8- α** de clone CT8 específico para cadeia alfa (34-kDa) das

células T de galinhas. É expresso em 80% dos timócitos, 15% das células mononucleares do sangue e 50% das células do baço. 2) anticorpo monoclonal **anti-CD8-β**, clone EP42, é expresso em aproximadamente 80% dos timócitos, 45% das células mononucleares do sangue e 50% das células do baço, e em menos de 1% nas células da bursa e medula óssea 3) anticorpo monoclonal anti **TCRγδ** clone TCR1 específico para as células **T CD8⁺γδ**. 4) anticorpo monoclonal anti-**TCRvβ1**, clone TCR3 reage com aproximadamente 40% dos timócitos, 40-50% das células mononucleares do sangue e 40% de esplenócitos. 5) anticorpo monoclonal anti-**TCRvβ2**, clone TCR, reage com aproximadamente 9% dos timócitos, 15-20% das células mononucleares do sangue e 13% em esplenócitos de galinhas jovens. 6) anticorpo monoclonal **anti-CD4**, clone TCR1.CD4 é uma glicoproteína expressada em aproximadamente 70% dos timócitos, 10% células do baço e 45% linfócitos do sangue periférico, e em menos de 1% das células da bursa 7) anticorpo monoclonal anti-**CD28** clone AV7; 8) anticorpo monoclonal anti-**CD45** clone LT40; específico para células da linhagem B na Bursa de Fabricius e células da linhagem T. Em galinhas a molécula CD45 é uma glicoproteína transmembrânica expressada em todos os leucócitos 10) anticorpo monoclonal secundário antibiotina, clone BN 34 produzido em camundongo e marcado com CY3, obtido da Sigma-Aldrich e usado na diluição 1/200.

Os testes para identificação de células apoptóticas em secções histológicas de coração e baço, e em esfregaços de medula óssea, foram feitos com o *kit* contendo anticorpo Anexina V conjugado a FITC, e usado de acordo com as informações do fabricante Sigma-Aldrich. As anexinas são um grupo de proteínas homólogas que ligam com fosfolipídios na presença de cálcio. Em células no processo de morte programada (apoptose) uma fosfatidilserina na membrana fica disponível ao anticorpo Anexina V-FITC, permitindo sua identificação. No procedimento as secções histológicas são incubadas com anticorpo Anexina V-FITC na presença de iodeto de propídio. A célula apoptótica cora em verde com o anticorpo fluoresceínado e as demais coram em vermelho com o iodeto de propídio.

3.12. Semiquantificação do infiltrado inflamatório e rejeição das células cardíacas.

Para a avaliação do infiltrado inflamatório determinamos o padrão característico da unidade mínima de rejeição (UMR). Caracterizamos as reações conforme sua negatividade (-) e sua positividade (+). Em relação à positividade, as reações foram valorizadas como infiltrado inflamatório e lise de células alvo (unidade mínima de rejeição) (+), vários sítios contendo infiltrados de células do sistema imune e lises de células alvo (UMRs rejeição em sítios próximos ++), confluência de várias UMRs e lise de múltiplas fibras do coração (+++) e miocardite intensa (UMRs difusas) com destruição maciça de áreas extensas do coração (++++), tabela 11.

Tabela 11: Expressão semiquantitativa da inflamação no miocárdio de aves kDNA mutadas

Símbolo	Interpretação
-	Sem inflamação
+	Uma UMR
++	Duas UMRs
+++	Miocardite com várias UMRs
++++	Miocardite difusa e rejeição intensa do coração

3.13. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos em médias \pm 1 desvio padrão. As variáveis analisadas foram realizadas através do programa Graphpad prism 5.0 usando o teste *t* de Student, Valores com $p < 0,05$ foram considerados significativos. Participaram desse grupo de análise, as aves controles e mutadas que tiveram morte natural. Foi avaliado o tempo de sobrevivência das aves e o tamanho (peso) do coração das aves controles e mutadas.

3.14. Avaliação do peso relativo dos corações de aves controles (kDNA-) e mutadas (kDNA+)

As aves kDNA+ e kDNA- que foram usadas nos experimentos descritostiveram morte natural e foram submetidas ao exame *post-mortem*. O coração de cada ave foi removido para análise macro e microscópica. Para isso, o peso do coração foi relacionado com o peso corporal de cada animal, obtendo-se um índice de peso (IP). [IP= Peso do coração(g)/Peso da ave (g)]. O índice obtido permite corrigir a variação do tamanho do coração de acordo com a variação do peso corporal conforme o sexo e o tamanho/idade de cada ave.

IV. RESULTADOS

4.1. Características reprodutivas das aves de Praga e seleção de haplótipo

As colônias de aves de Praga, mantidas ao longo dos últimos seis anos no alojamento de animais da Faculdade de Medicina/UnB, tiveram características reprodutivas diferentes, pois, as aves K1 (haplótipo B12/B12) mostraram-se melhores matrizes reprodutoras do que as K2 (B4/B4). Por esse motivo os experimentos de inoculação de *T. cruzi* foram conduzidos nas aves K1. As aves que atingiam a idade adulta aos seis meses de idade foram testadas para os antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC-B). Os resultados da avaliação da histocompatibilidade das aves de Praga são apresentados a seguir.

4.2. Avaliação da histocompatibilidade nas aves congênicas de Praga

a) enxerto de pele

Experimentos para avaliação da histocompatibilidade foram conduzidos nas aves de Praga. Retalho de pele de 1,5 x 1,0 cm, sem tecido subcutâneo, era enxertado na região interescapular de aves adultas de haplótipos B12/B12 (K1) e B4/B4 (K2). Os enxertos de pele de ave K1 para K1 não produziam rejeição, pois, a inspeção ao longo de 8, 11, 14, dias mostrou que a pele enxertada estava sadia na ave receptora. Entretanto, quando o retalho de pele K1 era enxertado no subcutâneo de ave K2, havia pronta rejeição indicada pela reação inflamatória e necrose da pele enxertada após 11 dias. A rejeição era induzida pelos antígenos de histocompatibilidade, porque enxerto de pele de ave K2 para K2 não resultou em necrose e rejeição do retalho de pele. Esses resultados estão na tabela 12.

b) enxerto de coração

Avaliação da histocompatibilidade também foi conduzida com enxerto de coração de pinto de um dia de idade. Depois de eliminar os vasos da base e seccionar o miocárdio ao meio, uma parte do miocárdio era implantado no subcutâneo interescapular da ave. Nos experimentos em que miocárdio de doadora K1 era implantado em receptora K1, ou de K2 para K2, não houve rejeição do músculo cardíaco pela análise histopatológica. Aos 8, 11, 14 dias, 17 e 20 dias após o enxerto, as aves histocompatíveis não rejeitaram o coração enxertado. Entretanto, o coração repórter enxertado em ave de haplótipo diferente (K1 para K2 ou K2 para K1) resultou em rejeição do enxerto. A intensidade da rejeição aumentou progressivamente ao longo dos dias, atingindo um pico entre o 11º e 14º dia quando houve intensificação do edema, congestão e infiltração de células mononucleares com isquemia e necrose do músculo cardíaco (++++). A tabela 12 e a figura 11 mostram aspectos histopatológicos associados ao coração repórter enxertado em ave histocompatível e em ave com haplótipos incompatíveis.

Tabela 12: Análise da histocompatibilidade das aves congênicas de Praga.

Enxerto de pele	Resultado	Enxerto de miocárdio	Resultado
K1 para k1	Pega	K1 para k1	Pega
K1 para k2	Rejeição	K1 para k2	Rejeição
K2 para k2	Pega	K2 para k2	Pega
K2 para k1	Rejeição	K2 para k1	Rejeição

* Coração de pinto de um dia de idade, implantado no subcutâneo escapular da ave. Exame da histopatologia aos 11 dias: ausência (pega) ou infiltrado inflamatório no miocardio (rejeição).

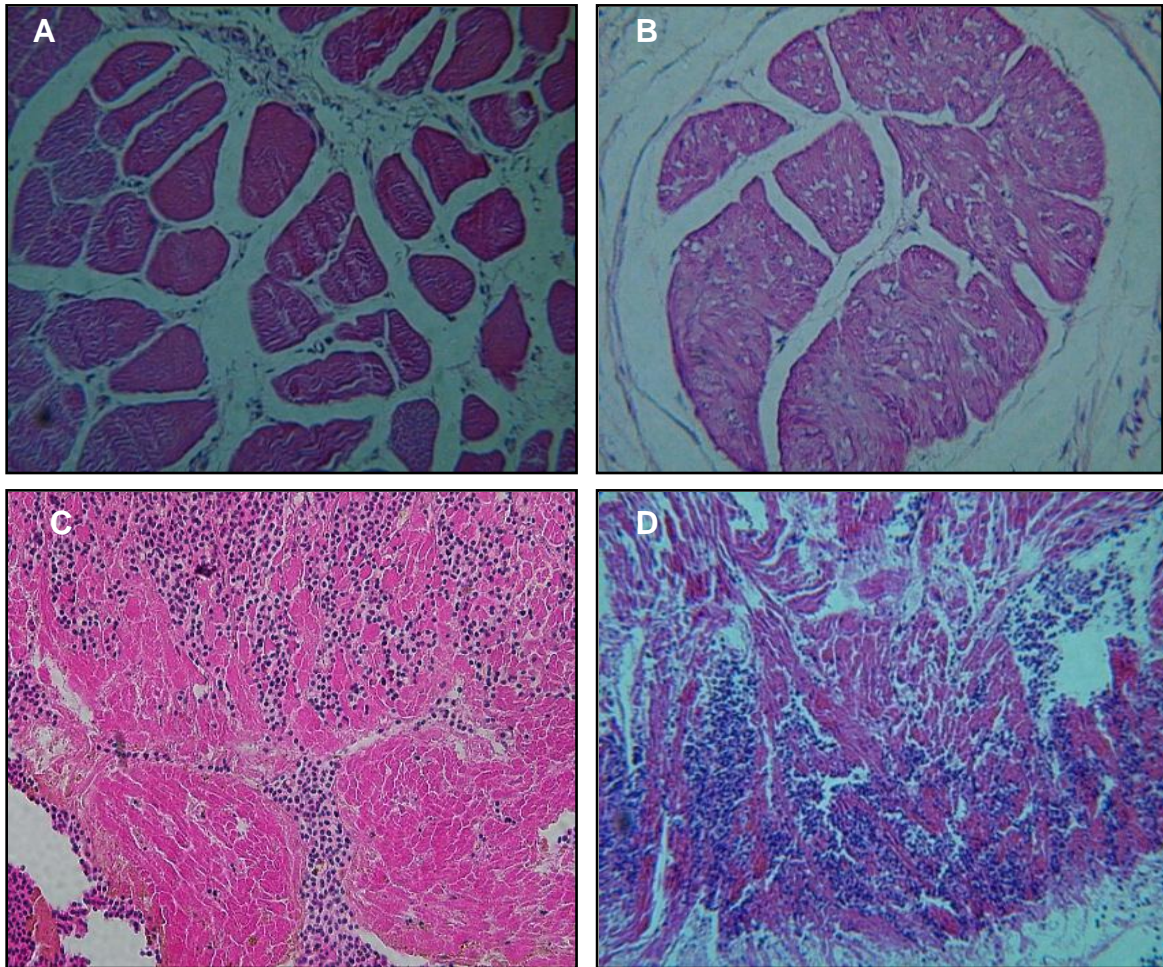


Figura 11: Análise da histocompatibilidade das aves congênicas de Praga.

A e B: ausência de rejeição do coração de pinto B12 em ave adulta do mesmo haplótipo.

C e D: rejeição do miocárdio de pinto B12/B12 enxertado em ave adulta B4/B4, respectivamente, aos 11 e 14 dias pós-enxerto.

4.3. Inoculação de *T.cruzi* em ovos férteis de aves de Praga e produção de pintos com seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma

Esses experimentos foram conduzidos em 40 aves congênicas controles e em mais 40 aves que eclodiram de ovos inoculados com 100 tripomastigotas de *T. cruzi* (vide métodos). Essas 80 aves K1 foram doadoras de células nucleadas do sangue para extração de DNA e identificação do kDNA do *T. cruzi* integrado no genoma (Teixeira e cols. 2011).

4.3.1. Identificação do kDNA do *T. cruzi* integrado no genoma das aves de Praga

Os procedimentos e os resultados dos exames PCR e de *Southern blot* apresentados nas figuras 12 e 13 foram conduzidos por protocolos descritos por Nitz e cols,(2004) e Hecht e cols, 2010. A amplificação das bandas de minicírculos de kDNA de 330 pb e de seus catâmeros, obtidas com os pares de *primers* S35/S36, após clivagem do kDNA do *T. cruzi* com *Nsi*1, é considerada sinal positivo da persistência de seqüências de minicírculos (DNA mitocondrial) no genoma da galinha. Sabendo que as aves são refratárias ao *T. cruzi* e que, portanto, as galinhas não retêm as infecções, é sugestivo admitir que o kDNA possa estar integrado no genoma. A figura 12 mostra bandas de kDNA amplificadas com *primers* S35/S36 a partir do DNA molde do genoma das aves nos grupos de experimentos desse estudo.

Os exames de PCR com *primers* de nDNA de *T. cruzi* (Tcz1/2; Pon1/2) foram sempre negativos (dados não apresentados). A ausência de amplificação do nDNA do protozoário no genoma das aves que retiveram o kDNA mitocondrial integrado no genoma é consistente com a reconhecida refratariedade das aves às infecções pelo *T. cruzi*. Esses resultados confirmaram estudos prévios (Nitz e cols, 2004; Hecht e cols, 2010; Teixeira e cols, 2011) que mostram a proliferação do parasito na primeira semana e a sua eliminação a partir da segunda semana

de crescimento do embrião quando, ocorrendo maturação do sistema imune, a imunidade inata elimina a infecção. Em resumo, na padronização feita previamente foi documentado que aproximadamente 63% dos pintos que eclodem de ovos inoculados com *T. cruzi* retêm seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma na ausência de nDNA porque a infecção é eliminada.

Aves com as bandas de kDNA eclodiram de ovos inoculados com 100 formas tripomastigotas do *T. cruzi* obtidas de culturas de células. As bandas de 330 bp e seus catâmeros que hibridizam com sonda específica de kDNA é um sinal positivo de integração de kDNA nas aves congênicas de Praga que eliminam a infecção. Dados obtidos por Clever Cardoso (2007), figura 12

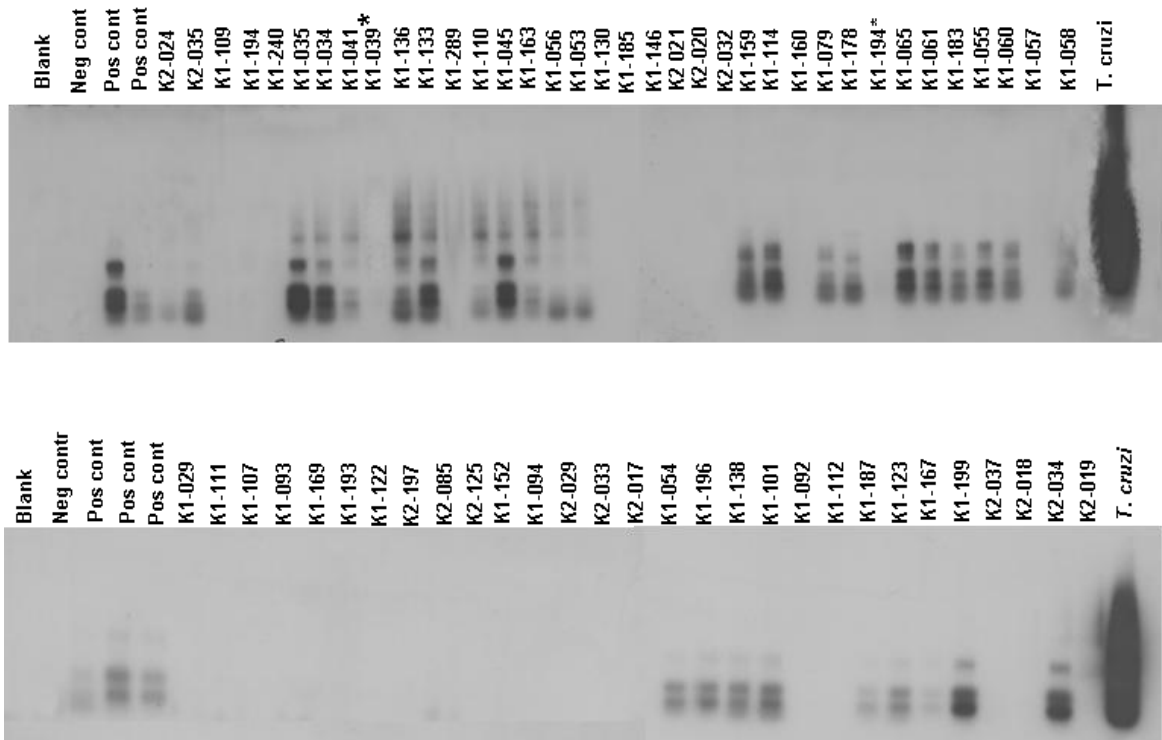


Figura 12: Amplificação de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* no genoma de aves congênicas de Praga.

Controles positivos mostram bandas amplificadas com *primers* S35/S36. Aves sem bandas não tinham o kDNA de *T. cruzi* no genoma.

Uma evidência de integração das seqüências de minicírculos de kDNA no genoma das aves foi sugerida pelo sinal positivo no *Southern blot* dos fragmentos de DNA genômico digerido com *EcoRI*, identificado com sonda de kDNA radiomarcada. Este procedimento mostrou que no genoma das aves kDNA+ havia bandas de ~18 kb, consistentemente diferente do tamanho da banda de um minicírculo (1.4 kb) que se forma quando o kDNA do *T. cruzi* é clivado com *EcoRI*. Nos casos com PCR negativa não houve formação de bandas, confirmando a especificidade dos produtos de amplificação em placa molde de DNA genômico de aves. Os resultados do *Southern blot* estão ilustrados na figura 13. Bandas com cerca de 20 kb sugestivas da integração de kDNA de *T.cruzi* foram encontradas no DNA genômico das aves 101, 110, 114, e 136 que tiveram resultados de PCR positivos, enquanto que as aves 122, 111, 109, e 107 com resultados de PCR negativos não formaram bandas.

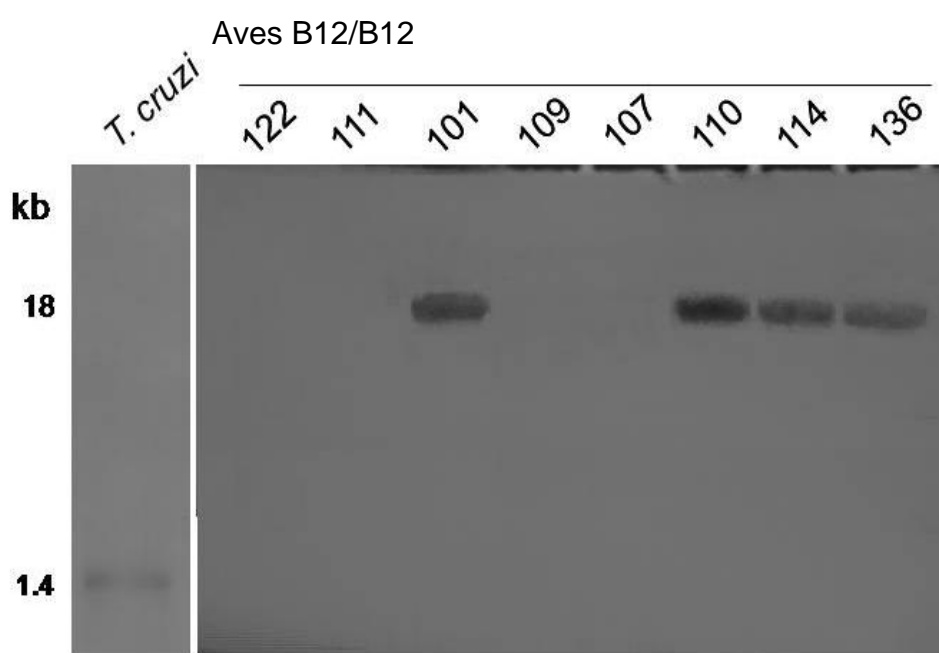


Figura 13: Hibridização pelo Southern blot de fragmentos de DNA gnômico de aves kDNA+ e de controles kDNA- com sondas de minicírculos de kDNA radiomarcadas.

Resultados de PCR e *Southern blot* mostram que o kDNA do *T. cruzi* está integrado no genoma das aves nascidas de ovos inoculados com formas tripomastigotas do parasito. Os achados de PCR e *Southern* foram confirmados em outros experimentos que demonstraram seqüências quimeras de kDNA-DNA hospedeiro em diferentes *loci* do genoma de cada uma das aves de Praga nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* que foram usadas nesses experimentos. A identificação e as características topológicas das mutações em cada um das aves positivas nos testes de PCR são assuntos da Tese de Doutorado de Maria Carolina Guimaro, deste Laboratório, Universidade de Brasília, 2012.

Os estudos preliminares que identificaram mutações de kDNA no genoma de aves tiveram como ponto de partida a construção de pares de *primers* específicos de CR-1 de *Gallus gallus*, conforme descrito em Teixeira e cols. 2011. A figura abaixo (14) mostra seqüências de minicírculos integrados em vários cromossomos de galinhas nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*.

A

XeCRs2anti-sense

```
1TAGAGAGGGT ACAGAGGAGG GCAACTATGA TGGTCAGACG TTAGAGCACT CCTCTTACAG
61      GACAGGCTGA GAGAGCTGGG CTCTTTGGCC TAGTGAAGAG AAGATTCCGG AGGGACCTTA
121TACTGGCCTT CCAGTACCTG AAGGGGTCT AAAGGAATGC TGGGGAGAGA CTTTTTATAA
181GAACATGTAG CCACAGGAAA AGGGGAAATG GCTTTAAACT GGAAGAAGGT AGATTTAGAC
241TAGATATTAG GAAGAAATTC TATACTGTGA GGTGGTGAG ACACCAGAAT CAGTTGCCAC
301TGAGGCTGTG AACGCCCTC CAAAACCAA AATTTTCGGA TTTCCATACC CCTATTTTAA
361CCTCCAAACT ATAACACACA ACACATACCC CACCTCACCA CACACTTAAT ATATTAACAA
421TACAACAGAT AACAAACATT ATTAACATTA TCAACTGTAC GCTCTACTAT CCACTCTCAT
481AACAAATTG GTCTATCTCA CATTCAATAA ATTCAAATCA AAACTAACAT ATATACAAC
541CCATTATATA TACCAACCAC ACCACCACCA GAGCCTATAT ACACCAACCC CATCGAC
```

S36 kDNA

Nucleotídeos 1-225 (verde): [ref|NW_001471710.1|Gga5 WGA136 2](#). Cromossoma 5 de *Gallusgallus* [similar to KIAA0329](#). Identidades 314/329 (95%).

[gb|U07846.1|TCU07846](#). Sequência de minicírculo de *Trypanosoma cruzi*, clone M369r Identidades 115/163 (70%).

B

S67 Reverse

```
1GAACGCCCT CCAAACCA AGATTTTCCT ATTTTCGGAA CCCCTAATTT CAGTAATTCA
61      ACACCATATA ACAACCACAC CATCATCTCA ACACAACCCA TCATATTACA CAACTCAACA
121CACCTGCATA AACATTAATG TATAACCGAT TAACAACATA CTATAATATA CACAATCTAA
181TCTTACACCA CTGAATTACC TACTTGAACT CACATCTATA AACATCATAT ACTTCTAATC
241ATAATTCTAA AATACAATAA CCACTCTTGC TTATATTACA CCAACCCAA TCGAACC GAT
301ACCCAGCCAG GACCCTGGGC AGTGAAAGAG AGTGATATGA ATTCCAACCC CCTTCAAAC
361TCTCCACAT GATGGAATAT CCATTTGGCC AGTTTAAGTC AGCTGTGTTG ATTCTGTTC
421CTCCAGCTC CTTGAGCCTT CTGCCAGCCT TTCATGGAGA AAATGGGAAT GGCCTTGCT
481CTGTAGAACA CTGTTTAGCA ATAACGTAA GTATCAGTTT ATTACCAACA TTGTTTTTCT
541TCTAGAACCA AACATAGCA TCATGGCAGA TACTCTGAAG AAAATAC TTCATCCAAGCT
601GATCCTAAAG GCAGAGC
```

3' SENSE 1

[gb|M18814.1|TRBKPMCAA](#). DNA de minicírculos de *T.cruzi* clone KY-13. Identidades 297/301 (98%).

[ref|NW_001471549.1|Gga1 WGA47 2](#). Cromossoma 1 de *Gallusgallus* similar a proteína de fusão. Identidades 324/329 (98%).

Figura 14: Ilustração de seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma de aves nascidas de ovos inoculados com *T.cruzi*.

A identificação de mutações no genoma das aves de Praga é parte da Tese de Doutorado de Maria Carolina Guimaro, Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, Universidade de Brasília, 2012.

4.4. Sinais clínicos da patologia evidenciada nas aves congênicas de Praga com kDNA do *T. cruzi* integrado no genoma.

Ao longo dos meses de crescimento foi possível observar algumas alterações na saúde das aves mutadas. A primeira delas apareceu na forma de fraqueza muscular que aparecia nos primeiros meses de vida, e era identificada pela dificuldade que as aves tinham de locomoção e, em seguida, manter-se em pé. Outro tipo de manifestação observada surgia tardiamente, geralmente entre 6 e 18 meses de vida, na forma de dificuldade respiratória que evoluía para cianose, evidenciada pela cor roxa que aparecia na crista da ave (Fig 15). O agravamento da dificuldade respiratória era notado pelo aparecimento de estertores e secreções que escorriam pelas narinas e pelo bico. A insuficiência cardíaca com retenção do sangue nos pulmões dificultou a oxigenação apenas das aves kDNA-positiva, as quais faleciam com as características clínicas sugestivas de insuficiência respiratória (Teixeira e cols, 2011).

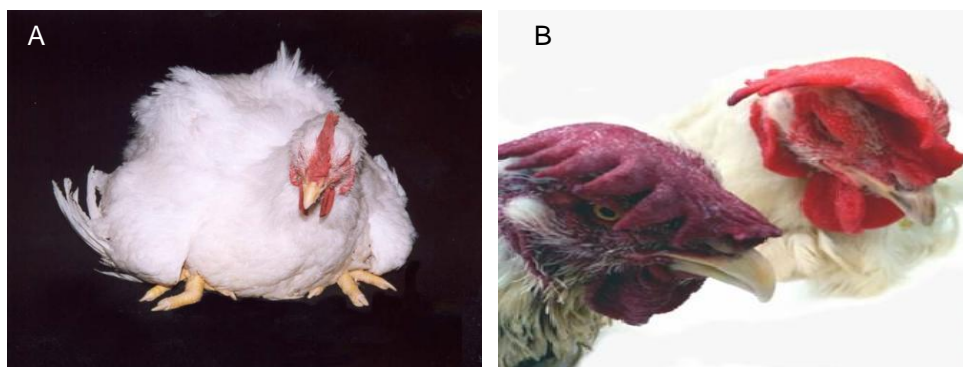


Figura 15: Sinais clínicos de patologia evidenciada em aves mutadas.

A) Posição indicativa de fraqueza muscular numa galinha com 6 meses de idade. B) cianose evidenciada pela coloração roxa, e ave controle, kDNA-negativa com a crista rubra do sangue bem oxigenado (Teixeira e cols, 2011).

Em muitos casos as aves kDNA+ apresentavam nítida cardiomegalia como demonstrado na figura 16.

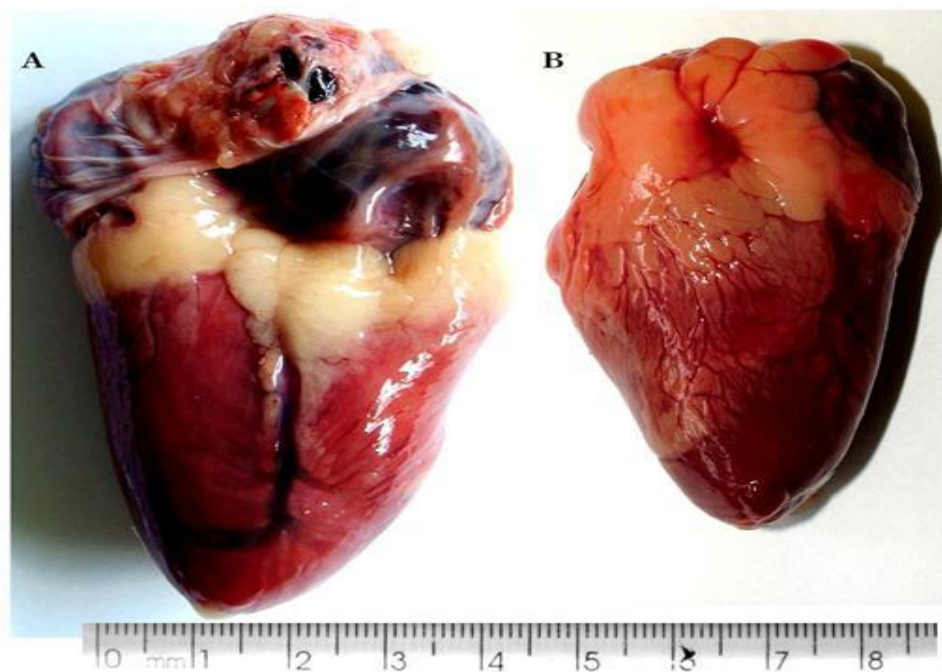


Figura 16: Aumento do volume do coração das aves com integração de kDNA de *T. cruzi* no genoma.

A: cardiomegalia em ave kDNA+. B: coração normal da ave controle.

4.5. Modificações genóticas e auto-imunidade em aves

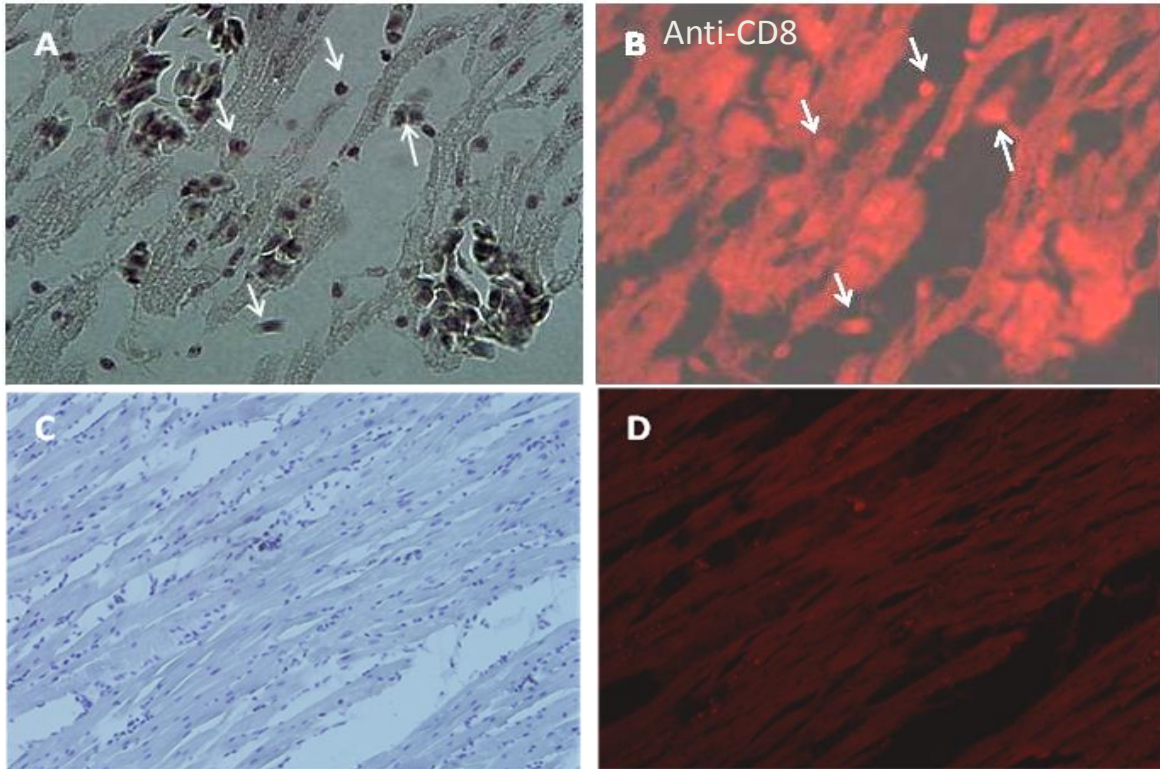


Figura 17: Imunofenotipagem das células do miocárdio adulto

A e B: secção de coração de ave kDNA+ corada com anticorpo monoclonal anti-linfócito T CD8 mostrando destruição de fibra muscular. C e D: histologia normal em ave controle.

Em decorrência dos sinais clínicos apresentados, e marcação de células efetoras no miocárdio da ave adulta (linfócitos TCD8+), surgiu então a necessidade de entender, como e de que maneira as células do sistema imune de aves genotipicamente modificadas pelas mutações de kDNA, na ausência de infecção residual, poderiam romper a tolerância imunológica, destruir o coração e dar origem à miocardiopatia semelhante à descrita na doença de Chagas em humanos?

4.6. Ausência de anticorpos contra antígenos de coração em aves mutadas com kDNA de *T. cruzi*

No sentido de avaliar o papel da imunidade humoral na patogênese da lesão do miocárdio em aves com o genoma modificado pelas mutações de kDNA do *T. cruzi*, foram delineados experimentos para identificar anticorpos específicos contra antígenos solúveis do parasito e, também, contra possíveis neo-antígenos traduzidos de fases de leitura aberta presentes nas quimeras kDNA-DNA hospedeiro, identificadas *in silico* pela busca no algoritmo BLASTx (Guimaro, Maria Carolina, Tese de Doutorado, Universidade de Brasília, 2012; Teixeira e cols, 2011). O teste ELISA revelou ausência de anticorpos da classe IgG contra antígenos solúveis de coração e de *T. cruzi* em aves controle (kDNA-) e em aves mutadas (kDNA+).

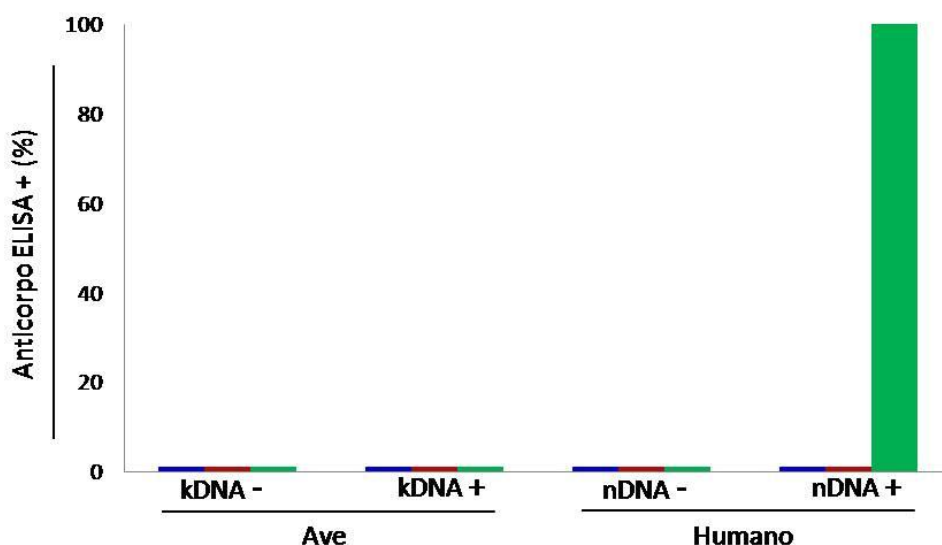


Figura 18: Ausência de anticorpos contra antígenos de coração de Gallusgalluse presença de anticorpos contra antígenos do *T. cruzi* em chagásicos.

- antígeno solúvel de ave controle:
- antígeno solúvel de ave kDNA+
- antígeno solúvel de *T. cruzi*.

Títulos elevados de anticorpos anti *T. cruzi* foram identificados apenas nos soros de chagásicos humanos. Entretanto, aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi*, tendo eliminado a infecção ativa não apresentam anticorpos contra antígenos de coração, mas, desenvolvem a cardiopatia. O resultado do teste ELISA revelou ausência de anticorpos contra antígenos solúveis de coração e de *T. cruzi* em aves controle (kDNA-) e em aves mutadas (kDNA+). Esses resultados mostram que aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* são tolerantes aos neo-antígenos traduzidos de fases de leitura aberta formada pelas quimeras kDNA-DNA hospedeiro e, também, contra antígenos do *T. cruzi*.

4.7. Identificação da origem das células do sistema imune que infiltram o coração das aves mutadas com kDNA de *Trypanosoma cruzi*

Neste estudo foi possível observar que as injeções dos fluorocromos vermelho e/ou verde coram as progenitoras da linhagem de células brancas na medula óssea (Figura 18). Então, os linfoblastos migram da medula óssea, entram na circulação e dirigem-se para as regiões para corticais dos folículos linfóides e, também, acumulam-se em volta da bainha dos vasos esplênicos. No timo são encontradas células da linhagem linfóide entre os timócitos.

Adicionalmente, as células imunes marcadas com fluorocromos são encontradas em infiltrados inflamatórios de músculo esquelético, musculatura lisa do aparelho digestivo e, particularmente, no coração. As células do sistema imune coradas em verde ou vermelho aderem às fibras cardíacas e destroem -nas. Por último as células imunes coradas com fluorocromos são encontradas nos órgãos linfóides periféricos, em linfonodos e ao longo dos vasos linfáticos. Esses achados encaminham o entendimento sobre a migração das células do infiltrado inflamatório no coração repórter enxertado no subcutâneo de aves sadias, controles, e, também, no coração de aves mutadas com kDNA de *T. cruzi*. Os resultados estão apresentados na figura 19.

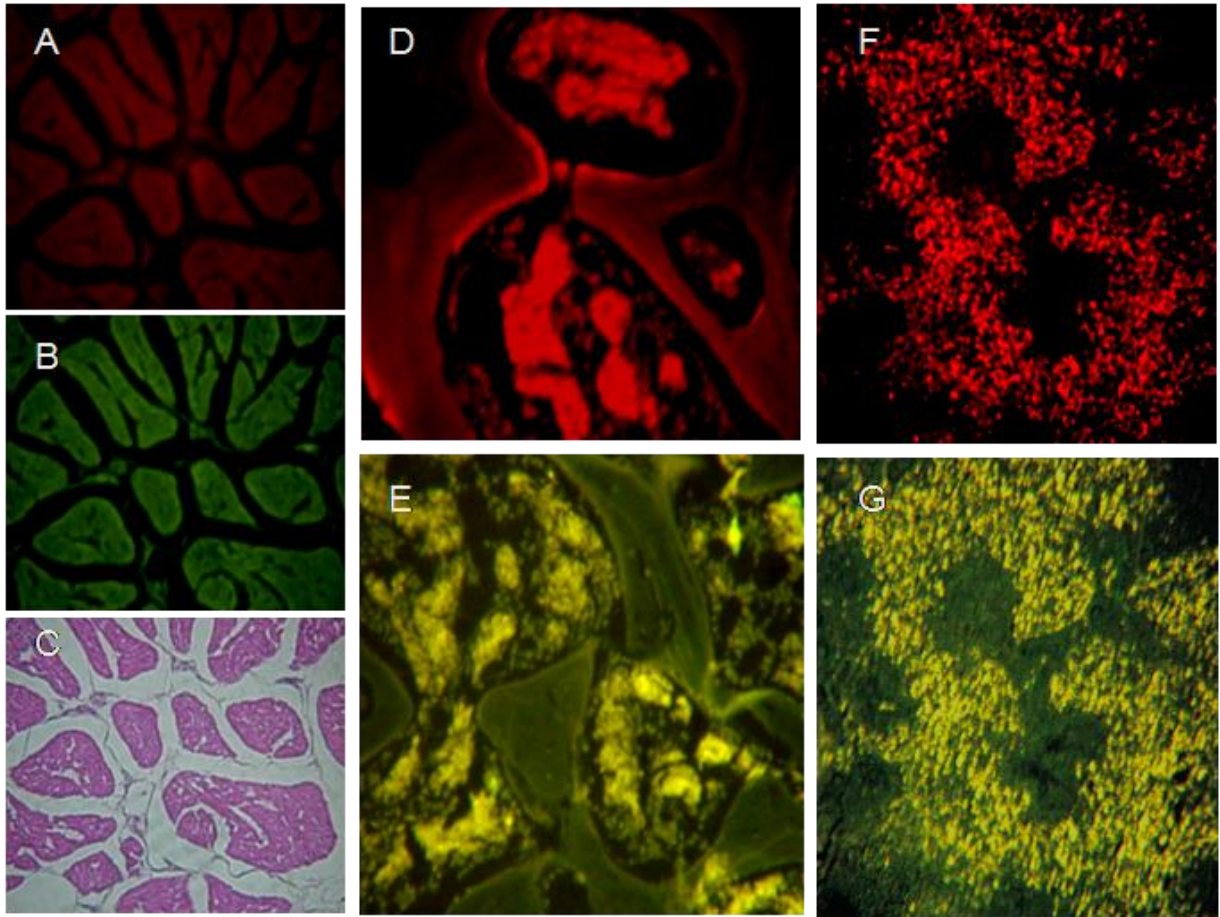


Figura 19: Percurso das células do sistema imune que infiltram o coração da aves mutadas.

Em A, B, C: fluorescência natural dos corantes verde e vermelho, e histologia normal do coração adulto corado com hematoxilina e eosina. Em D, E: fluorescência de blastos precursores de células do sistema imune na medula óssea marcada pelos corantes. Em F, G: células do sistema imune localizadas em áreas da córtex de folículos linfóides no baço.

4.8. Transferência passiva da autoimunidade mediante células do sistema imune de aves adultas kDNA+ marcadas com fluorocromos PkH 67 (Verde) e PkH 26 (Vermelho) e injetadas em pintos mutados K1 com um mês de idade

Células marcadas com fluorocromos foram detectadas em pequenos focos inflamatórios, mas sem destruição do miocárdio das aves. Em contraste, nos experimentos controle, células mononucleares de aves saudáveis (kDNA-) injetadas na veia não foram encontradas nas seções histológicas do coração histocompatível da ave que recebeu passivamente as células marcadas com fluorocromos. Este achado mostra que existe uma capacidade preformada de adesão de linfócitos de aves kDNA+ em tecido muscular, particularmente no coração.

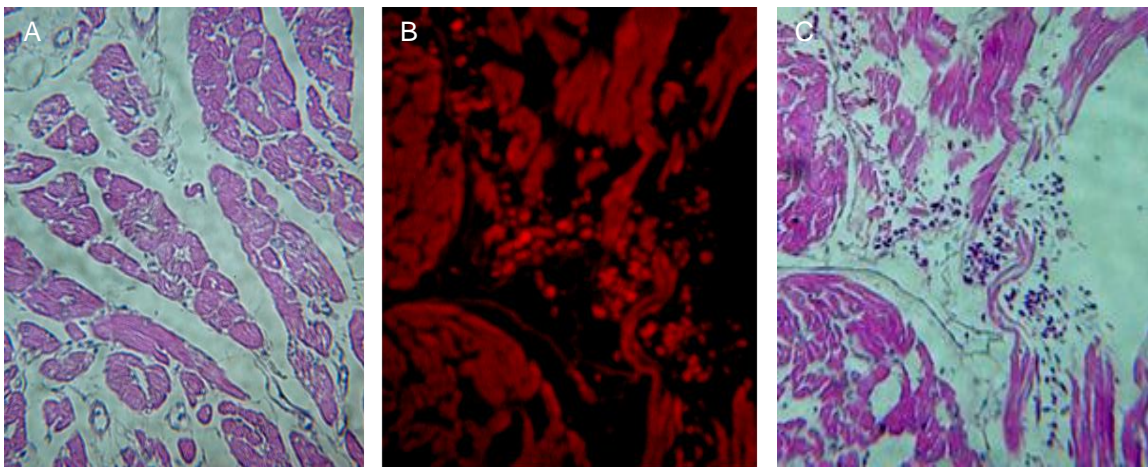


Figura 20: Transferência passiva da autoimunidade de aves mutadas (kDNA+) para aves controles (kDNA-).

Corte histológicos do músculo cardíaco de coração de aves: A) Controle normal; B) Receptora das células imunes coradas. C) Coloração com HE. As mesmas células vermelhas têm o núcleo escuro corado pela hematoxilina.

4.9. Rejeição do enxerto de coração de pinto sadio de um dia de idade no subcutâneo de ave mutada (kDNA+)

Foram feitos enxertos de miocárdio de pinto K1 normal em seis aves adultas K1 mutadas que tinham recebido injeções de fluorocromos. Os enxertos foram removidos 8, 11, 14 e 17 dias pós-implante (figura 21). A histopatologia revelou infiltração de células mononucleares do sistema imune e necrosado coração enxertado, no 8º, 11º, 14º, e 17º dias após o enxerto. No grupo controle as aves histocompatíveis, (seis aves) que receberam o enxerto de miocárdio de pinto não tinham a infiltração de células mononucleares.

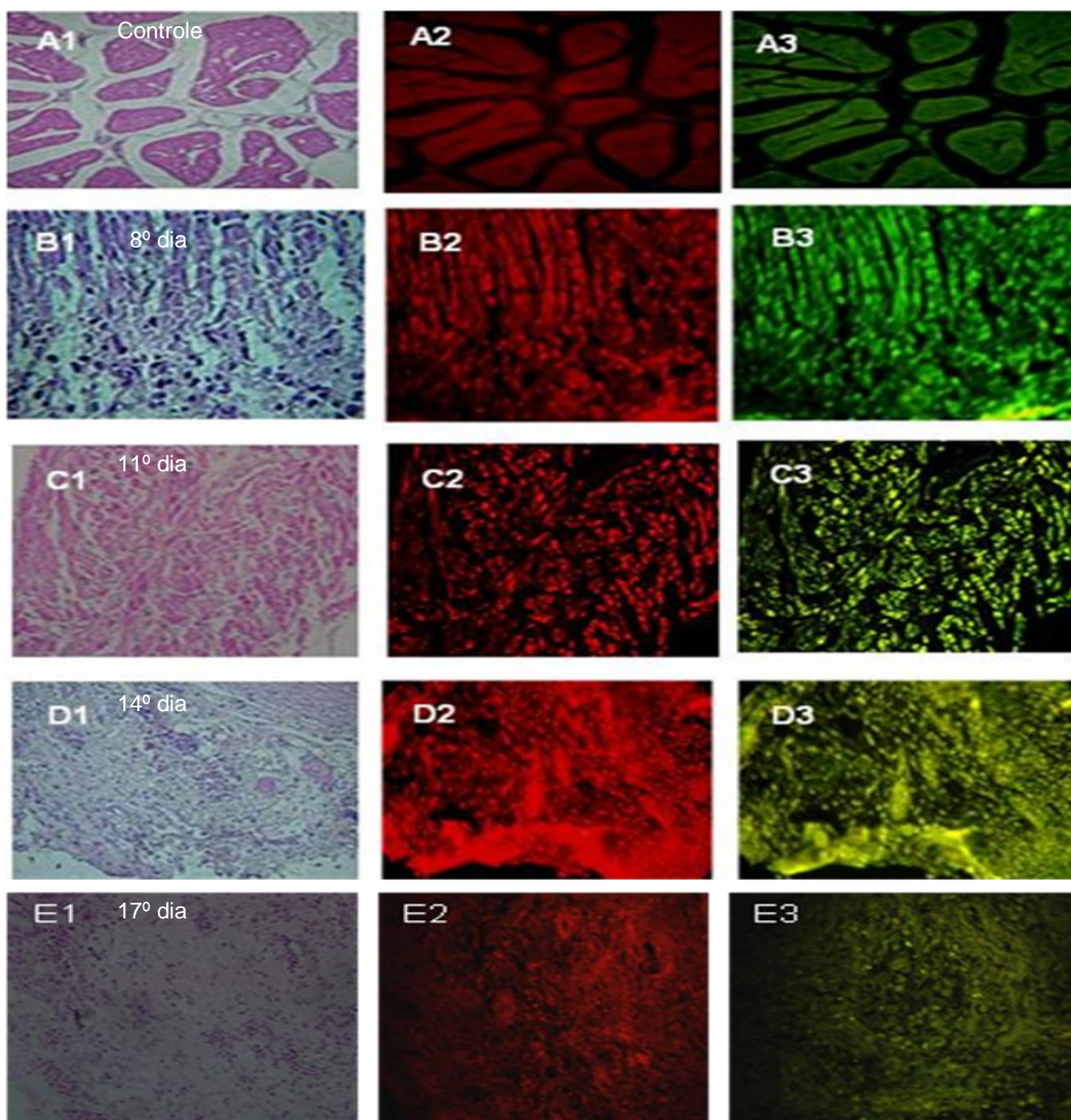


Figura 21: Transplante de coração repórter em aves kDNA mutadas.

Em A1, A2, e A3: corte do músculo cardíaco controle, secção corada com H-E e fluorescência natural. B1, B2, e B3: fluorescência natural vermelha e verde no 8º dia pós-enxerto. C1, C2, e C3: 11º dia pós-enxerto. D1, D2, e D3: 14º dia pós-enxerto. E1, E2, e E3: 17º dia pós-enxerto.

4.10. Transferência e/ou inibição da miocardiopatia inflamatória auto-imune mediante transplante de medula óssea

4.10.1. Transferência de células da medula óssea de ave mutada para ave normal

Diante da impossibilidade de transferência passiva de lesão autoimune mediante injeção endovenosa das células do sistema imune da ave mutada (kDNA+) para ave controle histocompatível (de K1 para K1) foram planejados outros experimentos visando à transferência e ou inibição da patologia mediante enxerto de medula óssea. Nesse sistema foram considerados dois pontos importantes que não foram observados nos experimentos prévios: a) A transferência passiva de células do sangue não produziu patologia, possivelmente, porque as células injetadas não têm capacidade de multiplicação ilimitada e, tendo prazo de validade (vida média) curto, apenas pequenos focos inflamatórios são identificados, sem lise do miocárdio. Ou seja, os achados sugerem que a ação das células imunes citotóxicas deve ser persistente para que produza repercussão fisiopatológica; b) A substituição das células da medula óssea sadia (kDNA-) pelas células da medula óssea doente (kDNA+) sustenta a produção continuada de progênies de linfócitos citotóxicos com características funcionais, espacial e temporal, semelhante àquelas que se observam na ave kDNA+ que desenvolve miocardiopatia inflamatória. Essas foram justificativas encontradas para a condução dos experimentos de transferência da patologia e, também, de inibição da patologia autoimune no modelo aves congênicas de Praga.

Foram realizados experimentos de transferência de medula óssea de 12 aves kDNA+ para 12 aves sadias (kDNA-) que tiveram a medula óssea destruída com drogas. As aves kDNA- que receberam medula óssea kDNA+ mantiveram as células mutadas do sistema imune em proliferação. As células efetoras citotóxicas invadiram o enxerto de coração no subcutâneo da ave receptora, destruindo-o. O fenômeno de rejeição do enxerto em ave controle com medula óssea de ave kDNA+ está documentado na figura 22. Nesses

experimentos, a ave mutada (kDNA+) candidata a receptora de medula óssea tinha sua própria medula óssea destruída pelo metrotexato citostático e pelo bussulfan inibidor da síntese de ácido pirúvico. Dois dias depois de ter a medula óssea destruída pelas drogas cada uma dessas aves recebia 5 ml de medula óssea de ave doadora. Três semanas depois do transplante as aves receptoras de medula óssea eram submetidas ao enxerto de miocárdio de pinto K1 de um dia de idade. Ou seja, células da medula óssea de ave mutada K1 (B12/B12) foram enxertadas na medula óssea de ave controle histocompatível K1(B12/B12). Aos vinte e um dias depois do transplante de medula óssea enxertava-se coração de pinto com um dia de idade no subcutâneo das aves receptoras com o haplótipo histocompaível. O enxerto do coração era removido em prazos determinados e submetido a procedimento histopatológico. Os resultados desses experimentos mostram que o sistema imune de aves mutadas com kDNA rejeitaram aceleradamente enxerto de coração histocompatível. Este tipo de reação não foi encontrado no miocárdio enxertado no subcutâneo de aves controles.

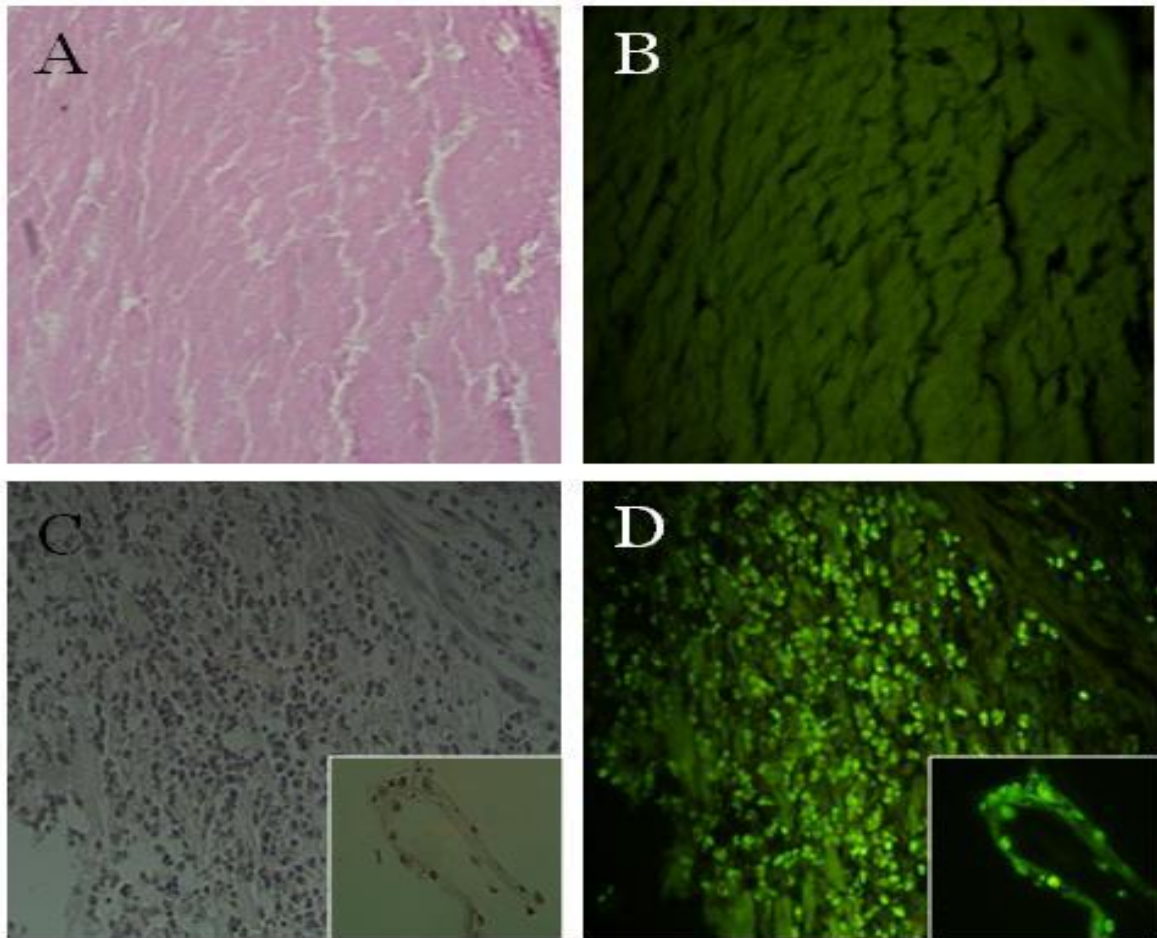


Figura 22: Transferência da cardiopatia inflamatória autoimune da ave kDNA+ para ave sadia histocompatível. A e B: ave controle, normal, que não recebeu medula óssea de ave mutada. C e D: rejeição do coração repórter sadio enxertado no subcutâneo da ave controle kDNA- receptora de medula óssea de ave kDNA+, 11 dias após o transplante.

4.10.2. Tratamento da patologia pela transferência de medula óssea de aves sadias para aves mutadas

Os resultados que mostraram transferência das células de medula óssea de ave kDNA+ para ave controle kDNA-, que produziram a rejeição do coração repórter, sugeriram outros experimentos para avaliação da possibilidade de inibição da cardiopatia em aves com mutações de kDNA no genoma. Esses experimentos consistiram em matar as células da medula óssea da ave kDNA+ com drogas (vide métodos). Dois dias depois, as células da medula óssea de ave

sadia, (controle kDNA-) foram para a ave que teve a medula óssea destruída. Duas semanas após o transplante da medula óssea, era enxertado coração repórter de pinto de um dia de idade no subcutâneo da ave receptora kDNA+. Onze dias pós-enxerto o miocárdio era retirado e submetido às análises histológicas. A Figura 23(D) revela que o miocárdio enxertado nas aves receptoras kDNA+ que tiveram a medula óssea destruída com drogas, e, em seguida, substituída por medula óssea de ave sadia, controle kDNA-, não rejeitou o enxerto. No experimento controle negativo coração de pinto de um dia enxertado em ave controle (kDNA-) também não rejeitou o enxerto. Todavia, no experimento controle positivo, ave kDNA+ rejeitou o enxerto de miocárdio como mostrado na Figura 23 (A). Os resultados desses experimentos estão ilustrados na figura 23.

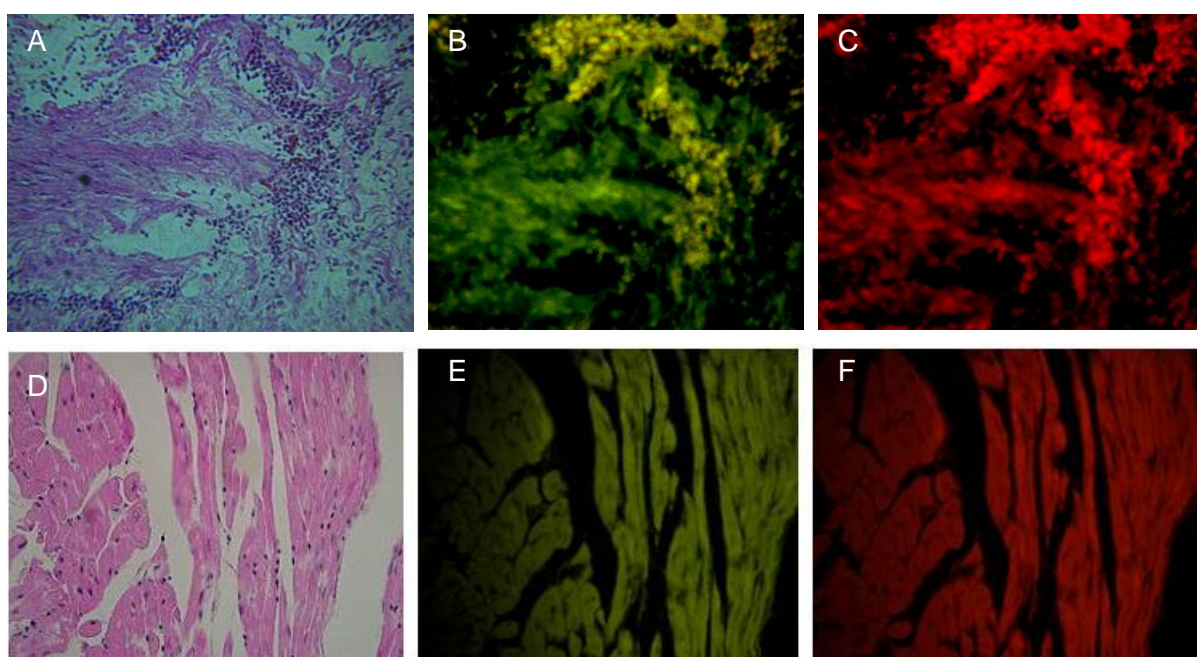


Figura 23: Inibição da rejeição do miocárdio repórter enxertado no subcutâneo de ave mutada mediante destruição da medula óssea com drogas e substituição com medula óssea de ave controle.

Na figura 23, a rejeição (A, B e C) presente na ave kDNA+ desapareceu quando sua medula óssea foi destruída e substituída por medula óssea controlen de ave kDNA-.) Esses aspectos microscópicos (C, D, e E) foram documentados 11 dias pós-enxerto.

4.11. Fenotipagem das células efetoras citotóxicas que lisa coração da ave kDNA+ assim como o repórter enxertado no subcutâneo

Dois grupos de 10 aves mutadas (kDNA+) e igual número de aves controles (kDNA-) foram usados nos experimentos de transferência da patologia e de inibição da patologia, visando aos estudos de fenotipagem das células efetoras do sistema imune que infiltram e destroem o enxerto histocompatível de miocárdio. Esses resultados foram testemunhados pela lesão histopatológica do coração da ave receptora do enxerto. O enxerto de miocárdio foi analisado após 11 dias e o coração das aves receptoras de enxertos foram analisados depois de morte natural ou após conclusão das observações aos 12 meses de vida.

4.11.1. Transferência da patologia para o coração repórter e sua comparação com as lesões no miocárdio da ave receptora

Os achados de miocardiopatia inflamatória nas aves mutadas (kDNA+) que não foram encontrados nas aves controles (kDNA-) estabeleceram a base para os experimentos de transferência da patologia. Secções histológicas do miocárdio repórter e da ave adulta receptora foram contra coradas com hematoxilina e as secções seriadas foram usadas para fenotipagem com o painel de anticorpos monoclonais descrito em materiais e métodos. Esses experimentos documentaram a lesão no homoenxerto de coração de pinto de um dia de idade no subcutâneo da ave controle e no coração da ave receptora. A Figura 24 ilustra aspectos da patologia no miocárdio repórter e no coração da ave receptora mediante fenotipagem das lesões com anticorpos específicos para cada subpopulação de células efetoras das respostas imunes.

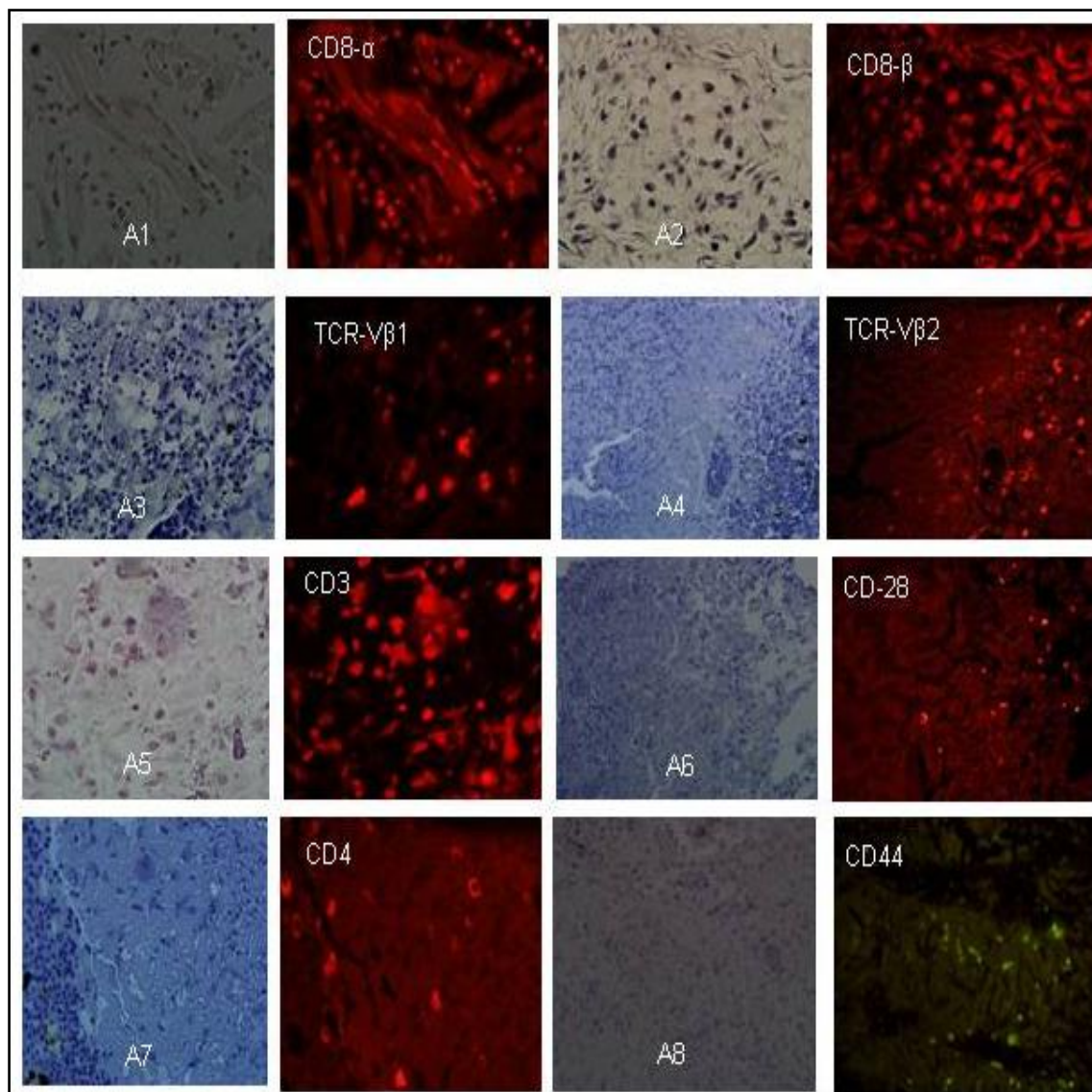


Figura 24: Fenotipagem das células efetoras do sistema imune da ave kDNA+ que rejeita o miocárdio repórter em aves receptoras kDNA-.

A1 a A8, aspectos do infiltrado inflamatório no enxerto do miocárdio em secções coradas pela hematoxilina: A4, A6, A7, e A8; 40X, A1, A2, A3 e A5. As mesmas secções foram coradas com o anticorpo monoclonal específico conforme indicado para cada um dos fenótipos de células efetoras da resposta imune.

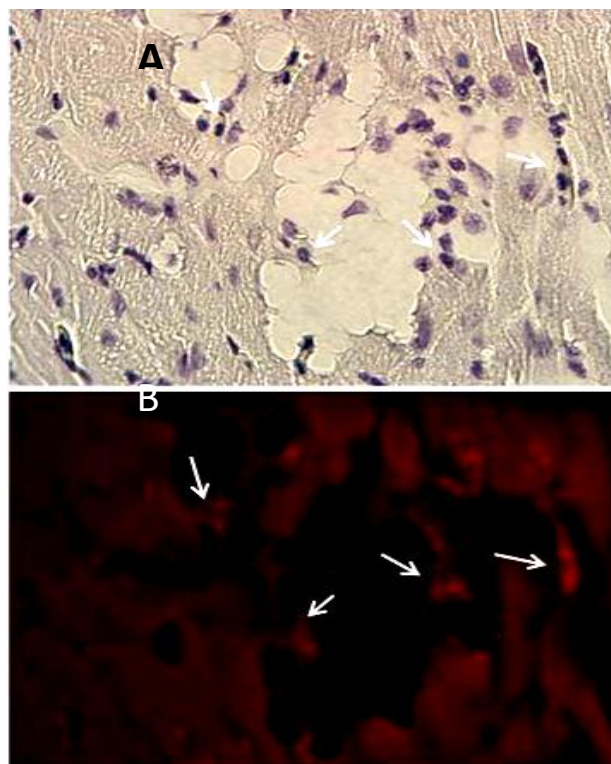


Figura 25: Histopatologia do coração adulto da ave controle (kDNA-) que recebeu medula óssea de ave kDNA+ e enxerto de miocárdio repórter no subcutâneo.

A) Discreto infiltrado de células mononucleares (setas) no miocárdio. B) Fenotipagem de células do foco inflamatório (setas) com anticorpo monoclonal anti CD8 V β 2.

4.11.2 Tratamento da patologia das aves kDNA+ mediante transferência de medula óssea de aves saudáveis

Os experimentos de transferência da patologia de ave kDNA+ mediante transferência da medula óssea doente para ave controle (kDNA-) que tinha a medula óssea previamente destruída com drogas sugeriu experimentos no sentido reverso visando à inibição da patologia. Este experimento consistiu em matar a medula óssea doente da ave kDNA+ com drogas e substituí-la pela medula óssea sadia da ave controle. A monitoração da atividade do processo patológico foi feita mediante enxerto de miocárdio repórter no subcutâneo da ave

kDNA+ receptora da medula óssea sadia. A ausência ou diminuição das lesões no enxerto foi comparada com a histopatologia do coração da ave adulta receptora.

Os resultados obtidos mostraram que a ave kDNA+ que tinha a medula óssea substituída pela medula óssea de ave controle não apresentou infiltrado inflamatório de células do sistema imune, característico de rejeição do miocárdio enxertado no seu subcutâneo, após 11 dias. Ocasionalmente, em um dos nove enxertos de miocárdio, observou-se lesão inflamatória com características semelhantes àquela do enxerto rejeitado, mas com intensidade menor. A Figura 26 mostra os aspectos histológicos normais do tecido muscular cardíaco da ave kDNA+ que foi tratada com drogas e teve sua medula óssea doente substituída pela medula óssea sadia de ave controle kDNA-, e ausência de células imunes identificadas por anticorpos monoclonais específicos.

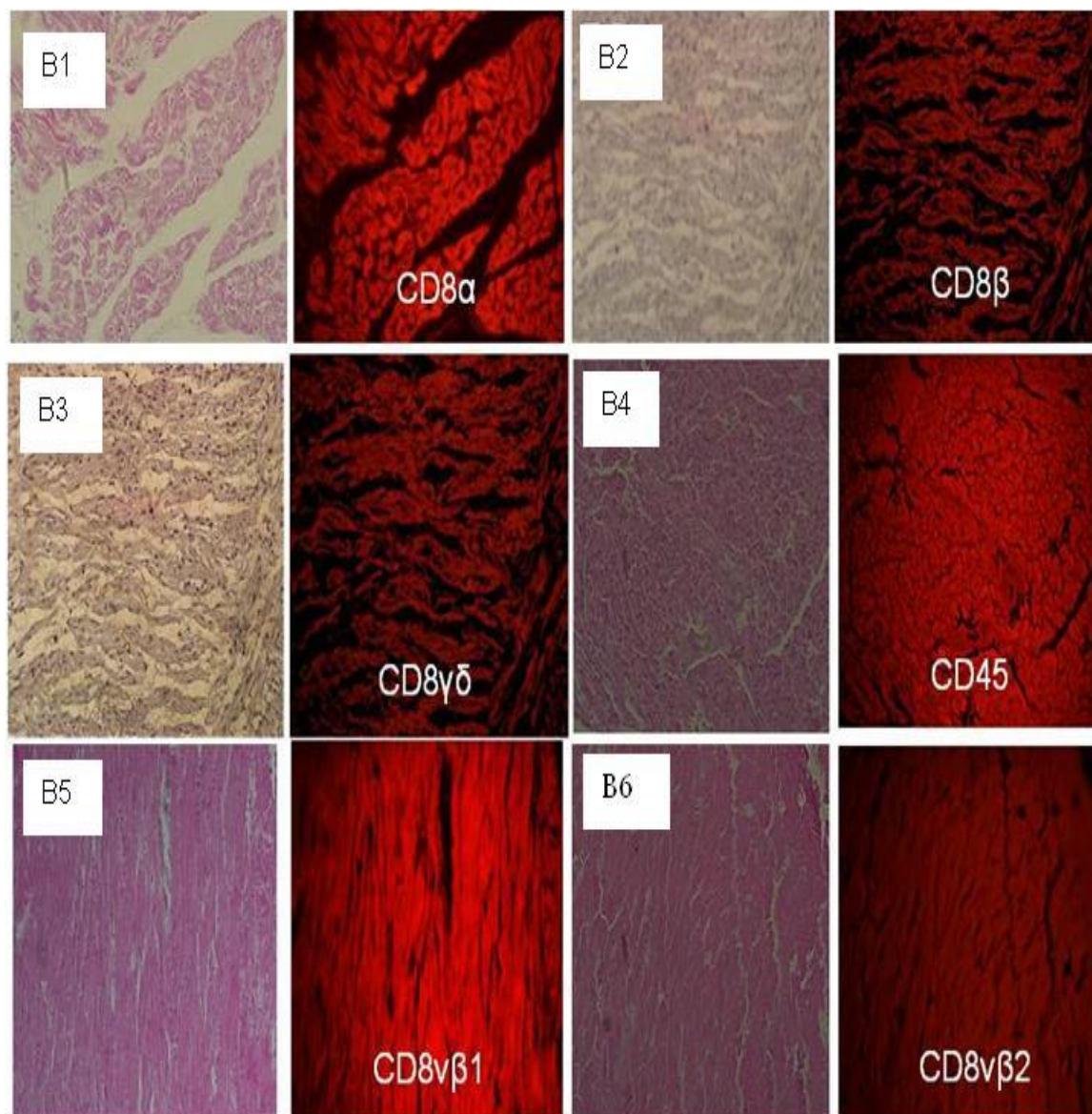


Figura 26: Inibição da lesão inflamatória no coração de ave doente kDNA+ que teve medula óssea destruída com drogas e substituída por medula óssea sadia de ave controle kDNA-.

Note os aspectos histológicos dentro de limites da normalidade em B1 a B6. As secções acima foram analisadas com anticorpo monoclonal anti CD8α, CD8β, CD8γδ, CD8vβ1, CD8vβ2, e CD45. Note que esses fenótipos de células imunes efectoras lisa célula cardíaca alvo na ave kDNA+ e no enxerto de miocárdio repórter no subcutâneo.

Tabela 13: Aspectos histopatológicos semiquantitativos das lesões inflamatórias produzidas pelas células imunes no coração das aves adultas e no coração repórter na transferência da patologia.

Ave doadora de medula óssea		Ave receptora de medula óssea		Histopatologia	
Nº da ave	Genótipo	Nº da ave	Genótipo	Enxerto	Coração adulto
K1 480	kDNA +	K1 464*	kDNA -	++++	++++
K1 367	kDNA +	K1 255*	kDNA -	+++	+++
K1 446	kDNA +	K1 351*	kDNA -	++++	*
K1 210	kDNA +	K1 204	kDNA -	+++	+++
K1 136	kDNA +	K1 198	kDNA -	++++	*
K1 065	kDNA +	K1 271	kDNA -	++++	-
K1 122	kDNA +	K1 176	kDNA -	++++	*
K1 219	kDNA +	K1 216	kDNA -	++++	++
K1 129*	kDNA +	K1 148	kDNA -	+++	*
K1 287	kDNA +	K1 222	kDNA -	++++	-
K1 206	kDNA +	K1 205	kDNA -	++	+
K1 141	kDNA +	K1 218	kDNA -	+++	+
K1 2893	kDNA +	K1 2638*	kDNA -	++++	*
K1 2898	kDNA +	K1 2637*	kDNA -	++++	*
K1 2645	kDNA +	K1 2633*	kDNA -	++++	*
K1 3644	kDNA +	K1 2635*	kDNA -	+++	*
K1 2643	kDNA +	K1 2612*	kDNA -	+++	*

* Aves que não tiveram o coração adulto analisado. Para interpretação dos símbolos, vide item 3.12, materiais e métodos.

4.12. Patologia nas aves de Praga kDNA+

O cálculo do tempo de sobrevivência das aves controles (kDNA-) e mutadas (kDNA+) revelaram que, em geral, as aves kDNA+ faleceram quando mais jovens que as aves controles. Os resultados desta análise estão apresentados na figura 27. O estudo revelou que o tempo médio de sobrevivência das aves mutadas (kDNA+) foi 12,5 meses de idade, enquanto que as aves controles (kDNA-) foi de 16,5 meses. As diferenças entre os grupos controle e testes não tiveram significância estatística ($p=0,0842$).

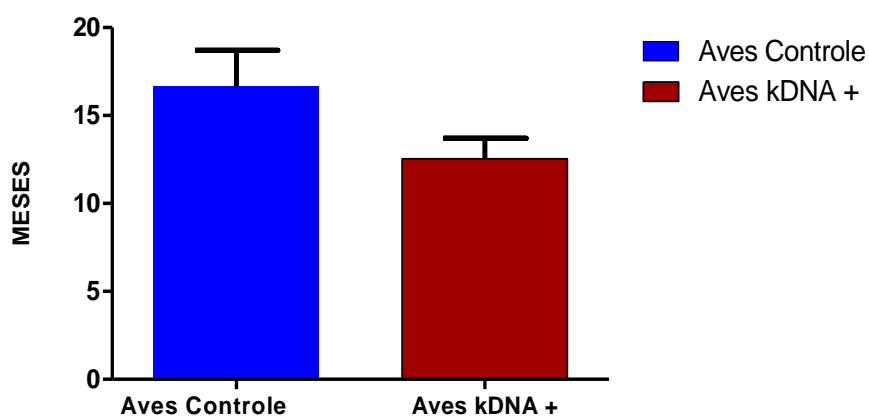


Figura 27: Tempo médio de sobrevivência de aves controle (kDNA-) e das aves mutadas (kDNA+).

As aves nascidas de ovos inoculados com *Trypanosoma cruzi* tinham seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma. Nota-se que as aves controles (azul, n =9) sobreviveram por tempo mais longo (16,5 meses) que as aves mutadas (kDNA+) (vermelho, n = 21) que sobreviveram menos tempo (12,5 meses). As diferenças no tempo de sobrevivência não foram estatisticamente significantes ($p=0,0842$).

Com o óbito das aves controles (kDNA-) e mutadas (kDNA+), obtiveram-se os pesos do corpo e o peso do coração. Esses valores foram usados para obtenção do índice de cardiomegalia em aves do mesmo grupo etário. Em geral, foi observado que as aves kDNA+ tinham o coração maior (Figura 28) que as aves controles kDNA-. Este aspecto foi documentado pela relação entre o peso corporal e o peso do coração: $[IP= \text{Peso do órgão (g)} / \text{Peso da ave (g)}]$. As aves com mutação (kDNA+) tinham os corações significativamente maiores que aqueles das aves do grupo controle, sem mutação de kDNA.

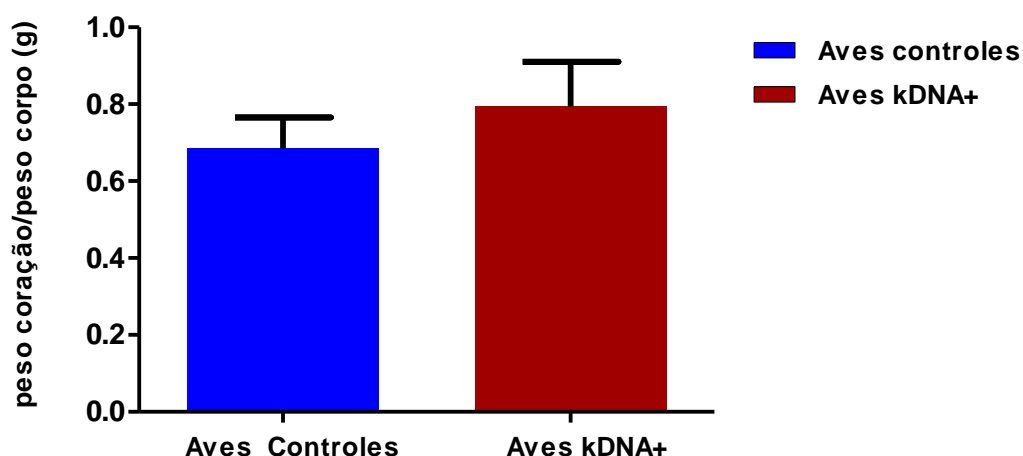


Figura 28: Índices de cardiomegalia indicados pela relação entre o peso do coração e o peso corporal das aves controles kDNA- e kDNA+.

O teste *t* de Student revelou que as diferenças entre os grupos teste (kDNA+) e controle (kDNA-) foram estatisticamente significantes ($p = 0,0007$, $n = 11$).

4.13. Identificação de células imunes apoptóticas no baço e no enxerto de miocárdio repórter

O quadro histopatológico observado nos casos de rejeição dos enxertos de miocárdio repórter sugeriu morte de célula efetora e de célula alvo por necrobiose. Esse aspecto de apoptose foi avaliado em secções histológicas de medula óssea, coração, baço e enxerto de miocárdio. A análise consistiu no tratamento das secções citadas com o *kit* do anticorpo Anexina V-FITC para detecção de células apoptóticas. Foi observado que as secções de medula óssea e de coração da ave adulta kDNA+ não exibiam aspectos de necrobiose. Entretanto, células necrobióticas corados em verde foram documentadas no baço e no enxerto de miocárdio repórter. Os resultados desses experimentos estão ilustrados na figura 29.

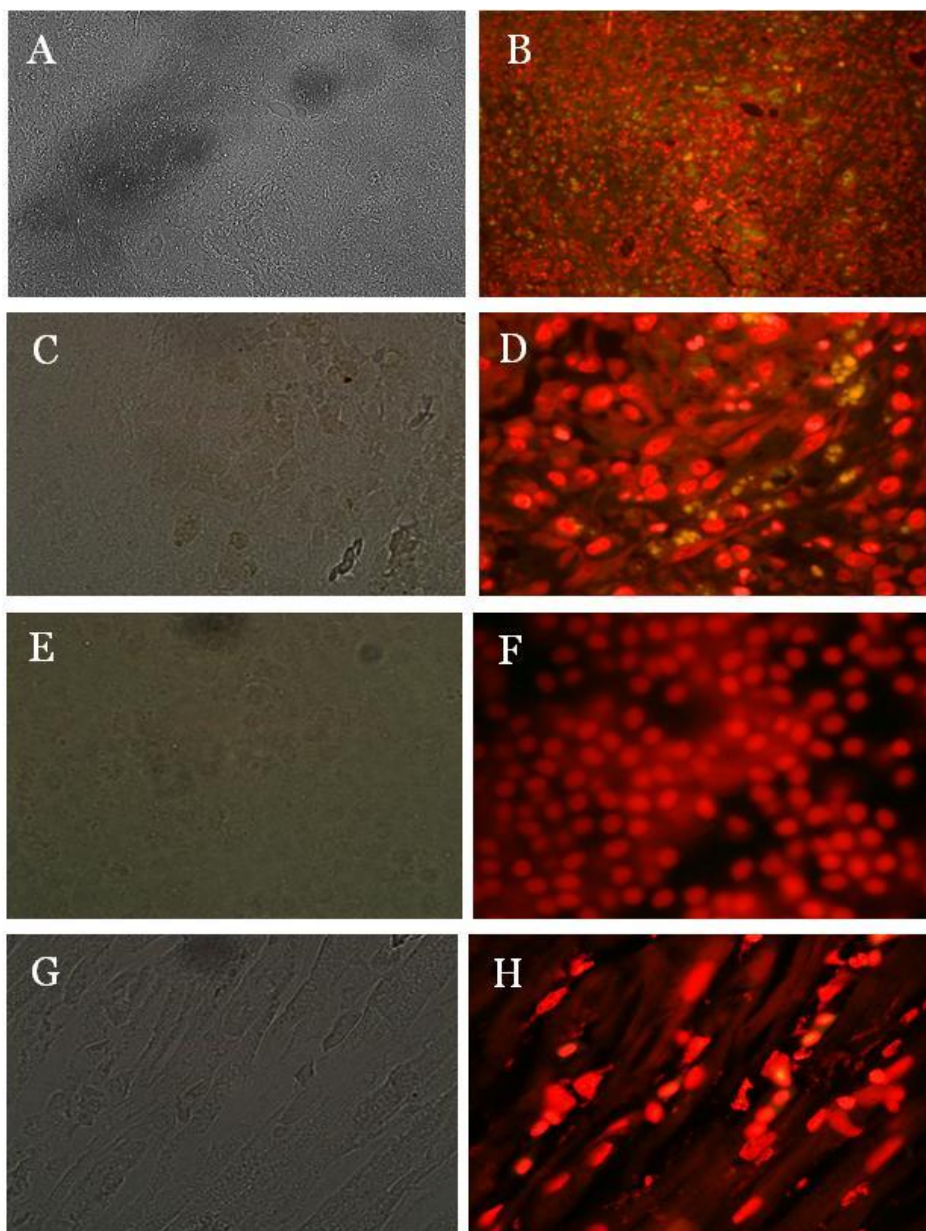


Figura 29: Identificação de células apoptóticas no baço de aves mutadas (kDNA+) e no enxerto de miocárdio repórter com intensa inflamação e lise de células alvo.

A e C, aspecto histológico do baço e do coração corados com hematoxilina, mostrando as células esverdeadas apoptóticas de permeio as células vermelhas sadias (B, D) contra coradas com iodeto de propídio. O aspecto normal do esfregaço de medula óssea e da secção histológica do miocárdio corada com hematoxilina (E e G), e ausência de célula esverdeada (F e H) apoptótica (B e D).

V. DISCUSSÃO

A cardiopatia chagásica continua como a endemia de causa infecciosa de maior prevalência no mundo ocidental. As lesões no coração chagásico são encontradas em menos de um terço dos indivíduos infectados pelo *T. cruzi* e sua patogênese permanece questão em aberto na doença descoberta em 1909 (Chagas, 1909). Chagas (1909, 1916) Gaspar Vianna (1911) acreditavam que as lesões destrutivas fossem produzidas pelo protozoário, após completar o ciclo de multiplicação intracelular e romper a célula hospedeira. A inflamação local seria necessária para a remoção dos resíduos da célula destruída pelo parasito.

Várias indagações surgiram ao longo dos anos, colocando em dúvida a teoria que estabeleceu a patogênese da doença de Chagas relacionada diretamente com a ação mecânica destrutiva do *T. cruzi*. Milhões de pessoas portadoras da infecção crônica jamais tiveram uma infecção aguda reconhecida. Esta constatação leva à percepção de que milhões de chagásicos existem simplesmente porque eles não morreram de doença aguda. Porque os indivíduos não têm conhecimento da infecção quando o *T. cruzi* circula no sangue e o parasitismo dos tecidos é intenso? Se o parasito fosse diretamente responsável pelas lesões graves no coração a maioria das pessoas deveria morrer na fase aguda da infecção? Essa dissociação da lesão inflamatória no miocárdio e a ausência do parasitismo na lesão de casos crônicos da doença de Chagas foi registrada por Carlos Chagas (1916). Posteriormente, Margarino Torres (1941) considerou esse dado como “estado alérgico” do chagásico.

Em 1973 e 1974 (Teixeira & Santos-Buch, 1973a; Teixeira & Santos Buch, 1973b; Santos-Buch & Teixeira, 1974; Teixeira, Teixeira ML & Santos-Buch, 1975) publicaram trabalhos estabelecendo a base para uma teoria auto-imune da doença de Chagas, ao mostrar que linfócitos de coelhos chagásicos tinham a capacidade de destruir células cardíacas de fetos de coelhos *in vitro*. A adesão dos linfócitos imunes aos mioblastos ocorria imediatamente após a incubação, a cultura das células do coração era completamente destruída após 10 horas. Os linfócitos de coelhos controles aderiam lentamente aos mioblastos e não os destruíam 72 horas após a incubação. Com a demonstração de citotoxicidade de

linfócitos imunes de chagásicos para células de coração, não-parasitadas, surgiu a teoria da auto-imunidade para explicar a patogênese da doença de Chagas.

A teoria auto-imune da patogênese da doença de Chagas também não explicava várias perguntas. A teoria da persistência do parasito para explicar a cardiopatia chagásica, persistiu (Tarleton, 1999, 2001). Ao longo de 40 anos não houve progresso substancial para excluir ou afirmar uma teoria em detrimento da outra (Girones & Fresno, 2003). Faltavam explicações sobre como o sistema imune do chagásico reagia contra sítios de seu próprio corpo, destruindo-o. O conceito vigente determina que normalmente o sistema imune seja tolerante aos seus próprios constituintes. Isto quer dizer que todo o conjunto de antígenos existentes por ocasião da maturação do sistema imune é reconhecido como próprio e, portanto, isento à auto-reatividade imunológica. Porém, doenças auto-imunes existem nas quais componentes da resposta imune produzem lesões sistêmicas ou localizadas. Diz-se que nesse caso houve ruptura da tolerância imunológica e, em consequência, o sistema imune agrava o seu próprio corpo. Então, os questionamentos que se fazem sobre as doenças auto-imunes, geralmente de causa desconhecida, se aplicam também a doença de Chagas. (Benoits e Mathis, 2001; Davidson Anne, & Diamond Betty, 2001).

O impasse gerador da indefinição sobre as teorias que tentavam explicar o fenômeno sistêmico associado com lesões da doença de Chagas foi posto no patamar da necessidade de conhecimento paradigmático, ou seja, a origem da auto-imunidade tinha de ser esclarecida.

A partir de 1989, a pesquisa no Laboratório Multidisciplinar de Pesquisa em Doença de Chagas, na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília foi conduzida em coelhos chagásicos tratados com drogas tripanocidas (Teixeira, 1990a, 1990b). Supunha-se que o tratamento que diminuía drasticamente a carga parasitária melhorasse o prognóstico do chagásico. Mas isso não aconteceu, pois, os coelhos chagásicos tratados morriam com lesões ativas similares às aquelas encontradas nos coelhos chagásicos que não foram tratados. Diante dessa constatação (Teixeira e cols. 1991; Teixeira e cols 1994), postulou-se que se o DNA do *T. cruzi* ficasse retido no genoma do hospedeiro seria possível explicar a patogênese da doença. Isso significa dizer que alteração genotípica em

conseqüência de mutação introduzida no genoma pelo *T. cruzi* poderia explicar a origem auto-imune da doença de Chagas.

As pesquisas conduzidas no paciente chagásico e em mamíferos infectados com o *T. cruzi* mostraram que sequências de minicírculos de kDNA do parasito integram em vários cromossomos. Em 65% dos casos as mutações de kDNA estão presentes em elementos retrotransponíveis LINE-1 (long interspersed nuclear element-1). De grande interesse, em mais de 15% dos casos as mutações foram encontradas em genes associados com crescimento e diferenciação celular, reparo de DNA, respostas imunes, e outros que codificam proteínas importantes para a contração do tecido muscular (Nitz e cols. 2004; Simões Barbosa e cols. 2006; Hecht e cols. 2010). Os resultados obtidos sugeriram que as mutações resultantes da integração de seqüências de minicírculos de kDNA do *T. cruzi* em regiões sensíveis do genoma poderia ser a origem genética da auto-imunidade descrita na doença de Chagas. Porém, o tratamento com droga tripanossomicida não eliminou a infecção pelo *T. cruzi* e, por isso, não era possível excluir completamente a possibilidade de que o DNA residual de uma e infecção críptica pudesse contaminar o resultado dos experimentos conduzidos em mamíferos. Essa sugestão de possível contaminação jamais foi comprovada, mas a dúvida persistia.

Enfim, não tendo sido possível erradicar a infecção chagásica no mamífero pelo tratamento com droga anti-tripanosossoma, a solução foi buscar a alternativa do modelo animal trans-filo não susceptível às infecções pelo *T. cruzi* (Nitz e cols, 2004). Então, foram conduzidos experimentos em aves que são refratárias ao *T. cruzi* e tal refratariedade fora reconhecida pelo parasitologista Emile Brumpt, em 1912. Desde então, aves têm sido usadas para alimentar barbeiro criado em laboratório, isento de infecção, e que pode ser usado no xenodiagnóstico. Adicionalmente, em determinada fase de busca de tratamento para a doença de Chagas no nosso Laboratório, uma investigação foi conduzida para avaliar o efeito letal da temperatura corporal (42°C) e/ou dos fatores séricos (anticorpo e complemento) da galinha sobre o *T. cruzi*. Verificou-se que nenhum desses fatores era impeditivo à sobrevivência das formas tripomastigotas do parasita (Teixeira, 1987). Por volta de 1972, o assunto dessa investigação na Universidade de Brasília fora compartilhado com o Pesquisador Felipe Nery Guimarães, do

Instituto Oswaldo Cruz. Em consequência desse intercâmbio de idéias, Nery-Guimarães fez experimentos visando à infecção do ovo embrionado com formas epimastigotas de *T. cruzi*, e os resultados foram publicados em número atrasado da revista Memórias do Instituto Oswaldo Cruz (Nery-Guimaraes e Lage, 1972; Nery Guimaraes e cols. 1974). Os autores mostraram que alguns embriões tinham formas amastigotas do *T. cruzi* no tecido, mas os pintos que sobreviviam não tinham a infecção.

Diante da impossibilidade de tratamento com droga tripanossomicida para eliminar a infecção chagásica em mamíferos e no homem, restava o caminho de usar o modelo *Gallus gallus* para eliminar a infecção pelo *T. cruzi*, na expectativa de que os pintos nascidos de ovos inoculados com o protozoário retivessem apenas o DNA do parasito no corpo. Este estudo está relatado na Tese de Doutorado de Clever Cardoso Gomes, Universidade de Brasília, 2006. Em seguida, foi feita a inovação na técnica *tpTAIL-PCR* (HECHT e cols. 2010) e a estratégia de combinar *primers* obtidos de CR-1 de galinha (equivalente a LINE-1 de mamífero) com *primers* de kDNA permitiu mapear as seqüências de minicírculos de kDNA no genoma das aves nascidas de ovos inoculados com o *T. cruzi*. Verificou-se que a maioria das mutações estava inserida em regiões codificadoras de macro cromossomos, rompendo fases de leitura aberta de genes. Diante desses achados, o seguimento clínico das aves adultas com mutações no genoma revelou cardiomegalia em até 63% dos casos, onde sinais de falta de ar, cianose e prostração prenunciavam morte iminente. Quando essas aves faleciam o exame mostrava aspectos macroscópicos típicos da doença humana e o exame microscópico revelava infiltrado de linfócitos efetores citotóxicos que lisa as fibras cardíacas, na ausência de parasitismo. Em publicações recentes (Teixeira e cols. 2011; Teixeira e cols. 2012) foi confirmada a origem genética da auto-imunidade na doença de Chagas.

Visando a um objetivo prático, deve haver uma explicação de como uma célula imune efetora genotipicamente modificada destrói seu próprio corpo. No estado de saúde fisiológico a célula imune é tolerante ao constituinte próprio, mas, a modificação do genoma introduzida pela mutação faz com que, rompendo a tolerância imunológica e adquirindo capacidade fisiopatológica a célula efetora agride seu próprio coração. Esta explicação satisfaz a demonstração da

capacidade pré-formada de linfócitos chagásicos para destruir mioblasto e da observação de que linfócitos efetores com mutações de kDNA são auto-destrutivos e destroem o coração da galinha. Linfócitos efetores de galinha controle (kDNA-) não destroem o coração. Esta explicação adquire validade nos experimentos conduzidos aqui, cujos resultados sugerem um tratamento específico para a cardiopatia chagásica.

Uma descoberta científica surge depois de muito trabalho e, por isso, faz-se necessário explicar como a pesquisa que gerou conhecimento paradigmático e estabeleceu uma nova hipótese de tratamento para a Doença de Chagas (Nitz e cols, 2004; Simoes-Barbosa e cols, 2006). De fato, há cerca de oito anos foi iniciada uma nova pesquisa com aves congênicas de Praga, visando a continuar a investigação sobre as alterações genótípicas nas células da medula óssea progenitoras dos linfócitos efetores que rejeitam o coração da ave, com características semelhantes à cardiopatia do chagásico. Uma nova hipótese sugeriu que a destruição da medula óssea da ave doente (kDNA+) com drogas e sua substituição pela transferência de medula óssea de ave sadia (kDNA-) poderia inibir o processo de destruição do coração. Esses experimentos foram conduzidos em linhagens de galinhas copias idênticas para todos os genes (congênicas) com MHC histocompatível, produzidas no Instituto de Genética Molecular (Svobada e cols, 1992; Kaufman, 2000; Plachý & Hejnar, 2002) da Academia de Ciências de Praga.

Com a hipótese formulada, a pesquisa foi desenhada de forma que o modelo aves de Praga, tendo compatibilidade genética de cópias idênticas possibilita transferência de tecidos entre indivíduos sem causar rejeição imune. A colônia de aves congênicas de Praga, mantida e propagada por inseminação artificial, gerava pintos compatíveis para todos *loci* genéticos. A histocompatibilidade de aves de haplótipos K1 (B12/B12) e K2 (B4/B4) foi confirmada em experimentos de enxertos de pele. Enxerto de retalho de pele de ave K1 para K1 ou de K2 para K2 não foram rejeitados. Entretanto, enxerto de pele de K1 para K2 ou vice versa eram seguidos de inflamação local, necrose e rejeição do retalho. A histocompatibilidade foi confirmada também com enxerto de miocárdio de pinto de um dia de idade no subcutâneo de ave. Quando a receptora do enxerto tinha o mesmo haplótipo o enxerto não era rejeitado. Porém, enxerto

entre aves de haplótipos diferentes era prontamente rejeitado pela intensa inflamação que lesava o miocárdio.

O trabalho prévio do nosso laboratório (Teixeira e cols. 2011; Teixeira e cols. 2012) mostrou que as aves mutadas (kDNA+) desenvolviam cardiopatia inflamatória semelhante a doença de Chagas no coração. Então, foi feita a tentativa de transferir passivamente a patologia de uma ave kDNA+ para outra kDNA- pela injeção de células mononucleares do sangue. Quando as células imunes efectoras da ave kDNA+ eram marcadas *in vitro* com fluorocromo e injetadas na veia da asa da ave kDNA-, encontrou-se agregados de células vermelhas infiltradas no miocárdio, porém, sem lise da célula alvo. Em experimentos controle, a injeção de linfócitos imunes de ave kDNA- em receptora kDNA- não mostrou infiltrados de células marcadas com fluorocromo. Este resultado sugeriu que não é possível transferir a patologia autoimune com células imunes de aves kDNA+. Diante disso, procurou-se produzir a patologia chagásica pela transferência de medula óssea.

Resultado obtido nesta tese mostra transferência da patologia chagásica documentada no miocárdio repórter e no coração da ave adulta sadia, receptora de medula óssea doente. A transferência de medula óssea de ave kDNA-para ave kDNA+, que teve a medula óssea destruída pelas drogas, revelou que o miocárdio repórter, analisado 11 dias após o enxerto, não tinha o infiltrado inflamatório indicativo de rejeição. Ainda mais importante foi verificar que o coração da ave receptora kDNA+ também não tinha o infiltrado inflamatório e, portanto, sua rejeição fora inibida. Esses resultados preliminares confirmaram a hipótese original que sugeriu a possibilidade de tratamento da doença de Chagas mediante transplante de medula óssea.

Diante desses resultados promissores, a pesquisa prosseguiu com outros experimentos em dois grupos de aves K2 que não foram injetadas com fluorocromos visto que foram planejados para um novo tipo de avaliação da rejeição do enxerto e do coração da ave adulta receptora que teve medula óssea destruída e substituída pela medula óssea de ave kDNA+. Nesse primeiro grupo de experimentos o miocárdio enxertado foi analisado após 11 dias e as secções histológicas foram submetidas à fenotipagem com anticorpos monoclonais contra subpopulações de linfócitos imunes eferentes que lisa a fibra cardíaca.

Os resultados demonstraram que a destruição autoimune do coração é devida a resposta imune timo-dependente de linfócitos efetores T CD8- α , CD8- β , CD8- $\gamma\delta$, CD8- $\nu\beta 1$, e CD8- $\nu\beta 2$ que lisa a célula cardíaca normal. De que forma essas células efectoras alteram sua atividade fisiológica e assumem atividade fisiopatológica produzindo as lesões semelhantes àquelas da doença de Chagas humana, é uma indagação para a qual a ciência ainda não tem resposta clara. Mas esta mudança do estado fisiológico para o patológico só é encontrada nas aves com mutações de kDNA no genoma. Sabe-se que existe retrotransposon CR-1 ativo no genoma de aves e outros vertebrados. Esses elementos possuem uma maquinaria interna de transposição composta de ORF1 que codifica uma integrase (proteína ligante a ácido nucléico) e a ORF2 que contem domínios de endonuclease e de transcriptase reversa (HASS e cols, 1997; BURCH e cols, 1993). Essa atividade mobilizadora relacionada à retrotransposon tem sido associada com transposição do kDNA integrado para outra localidade. Frequentemente, uma seqüência quimera pode ser mobilizada para a fase aberta de leitura de um gene, produzindo *knockout* e inativação da sua transcrição, ou, ainda, a inserção de longas seqüências pode modificar a sinalização intra-genômica, prejudicando transcrição e expressão de proteínas essenciais para a fisiologia da célula muscular. Um exemplo típico desta situação é encontrado na mutação no gene da distrofina, com as conseqüências fisiopatológicas de miocardite e fraqueza muscular (Teixeira e cols. 2011).

A interpretação do fenômeno descrito sugere que durante a divisão celular, se houver alguma seqüência de kDNA de *T. cruzi* livre no citoplasma, as proteínas do CR-1 podem se ligar ao minicírculo mobilizando-o para dentro do núcleo. No seu interior, a seqüência de minicírculo pode ser ligada em seqüência repetitiva rica em citosina-adenina (CA) que seve de *hot spot* de integração de DNA exógeno no genoma do hospedeiro, sob a ação das endonucleases ORF2, serina-treonina quinases e outras que se ligam no *hot spot* e clivam a dupla fita do DNA genômico. Subseqüentemente, as ligases emendam os pontos de cortes na fita de DNA hospedeiro (Nitz, 2001). A replicação e mobilização de seqüências de minicírculos de kDNA de *T. cruzi* na célula hospedeira mutada ocorre em duas fases, uma nuclear e outra citoplasmática. Na fase nuclear ocorre a transcrição do CR1 no núcleo. O RNA pode ser transportado para o citoplasma onde ocorre sua

tradução em proteína. Como vimos, entre as propriedades apresentadas pelas proteínas de CR-1 está sua capacidade de ligação a ácidos nucléicos. A transferência lateral de kDNA do *T. cruzi* para a célula hospedeira tem significado evolutivo pelo crescimento do genoma de eucariotos, pela remodelação e *hitchhiking* dependentes da atividade de retrotransposon em área de instabilidade do genoma, fechando um elo perdido na cadeia de evolução das espécies (Simões-Barbosa e cols. 2006). Em resumo, transferência lateral de DNA com subsequente arranjo-rearranjo, *hitchhiking* e remodelamento, são imprescindíveis para evolução dos indivíduos modificados pelas mutações de sequências de minicírculos de DNA mitocondrial de *T. cruzi*.

A transferência lateral de kDNA do *T. cruzi* para o genoma de aves refratárias à infecção é um sistema biológico limpo usado para estudar o papel da autoimunidade na doença de Chagas. Nesse estudo, a maioria das aves mutadas desenvolvia insuficiência cardíaca e morte. Em alguns casos foi observado que algumas aves kDNA+ desenvolviam fraqueza muscular generalizada e morriam com dificuldade respiratória, cianose e sinais de insuficiência cardíaca. A histopatologia dos tecidos das aves kDNA+ revelou lesões típicas da doença de Chagas no coração: “unidades de rejeição” confluentes produzindo lesões severas da patologia auto-imune. As aves controles kDNA- não tinham as lesões no coração. Essas alterações patológicas em aves kDNA+ podem ser devidas a modificações na função e estrutura do DNA, à medida que o kDNA se integre em introns ou nas regiões promotoras de genes. Essas mudanças são importantes porque têm o potencial de induzir respostas imunes contra o tecido próprio. De fato, as lesões severas encontradas em aves kDNA+ são sugestivas de que o *T. cruzi* é o vetor da doença genética, e a associação da mutação com a patologia é um denominador comum explicando a origem da patogênese da doença de Chagas. Todavia, estudos no nosso Laboratório, utilizando aves congênicas com o kDNA inserido em seu genoma poderão esclarecer os mecanismos moleculares da patogênese da doença de Chagas.

A origem da autoimunidade em aves que tinham seqüências de minicírculos de kDNA integradas no genoma e desenvolveu cardiopatia semelhante à doença de Chagas em humanos foi correlacionada com as modificações genotípicas, visto que as aves controles sem mutação não tinha a

doença no coração. Diante desse achado, foram conduzidos experimentos nas aves congênicas de Praga, com haplótipos histocompatíveis, visando a possibilidade de inibir a patologia na ave mutada (kDNA+) mediante destruição de sua medula óssea com drogas e substituição por medula óssea de ave sadia. Este modelo permitiu investigar aspectos da auto-imunidade na ave kDNA+ e sua ausência após o transplante de medula óssea de ave sadia. Um conjunto de experimentos demonstrou que a transferência de medula óssea de ave sadia para ave doente (kDNA+) podia mostrar a inibição da rejeição auto-imune de miocárdio repórter, histocompatível, enxertado no subcutâneo. O experimento de inibição da patologia consistiu na destruição da medula óssea da ave sadia e sua substituição pela medula óssea de ave kDNA+. Nesse caso o miocárdio enxertado no subcutâneo da ave receptora mostrou a rejeição autoimune do miocárdio repórter. Grupos de experimentos controles consistiram no implante de miocárdio repórter no subcutâneo de aves mutadas (kDNA+) e, também, no subcutâneo de ave controles (kDNA-). No primeiro caso (controle positivo) o miocárdio repórter sofreu rejeição auto-imune e, no segundo, (controle negativo) o coração repórter não foi rejeitado.

Em resumo, tendo sugerido que a doença de Chagas tem uma base genética e que as lesões são decorrentes de autoimunidade celular timo-dependente, foi possível desenhar experimentos visando à inibição do mecanismo básico que leva à destruição do coração chagásico. Este tratamento consiste na destruição da medula óssea da ave mutada (kDNA+) e sua substituição pela medula óssea de ave sadia (kDNA-). As aves doentes (kDNA+) que receberam transplante de medula óssea não mais rejeitavam enxerto de miocárdio no subcutâneo. Quando essas aves tratadas foram sacrificadas, verificou-se que o coração estava isento da lesão que produz insuficiência cardíaca e morte. Tendo decifrado um tratamento em ave mutada (kDNA+) para a lesão similar àquela da doença de Chagas humana, foi estabelecida a base para curar a doença de Chagas.

VI. CONCLUSÕES

- 1) O modelo experimental da cardiopatia em aves nascidas de ovos inoculados com *T. cruzi* permite excluir o parasito como fator diretamente associado com a destruição do miocárdio.
- 2) A rejeição do coração nas aves com genótipo modificado pelas mutações de kDNA do *T. cruzi* sugere uma origem genética para a cardiopatia
- 3) As lesões nas aves mutadas são produzidas por linfócitos T CD8 citotóxicos que ataca e lisa fibras cardíacas do coração adulto e do coração repórter enxertado em aves kDNA+ e em aves controles kDNA- que receberam medula óssea de ave kDNA+
- 4) A modificação genotípica nas células T citotóxicas resulta na perda da tolerância imunológica de forma que essas células saem do estado fisiológico para o fisiopatológico à medida que destroem o próprio tecido.
- 5) A citotoxicidade descrita nesta investigação mostrou-se independente de anticorpos, visto que esses estavam ausentes nas aves que tinham o coração destruído pelas células citotóxicas genotipicamente modificadas pelas mutações de kDNA.
- 6) O esclarecimento para a patogênese autoimune da cardiopatia indicou o seu tratamento mediante transferência de medula óssea de ave congênica, histocompatível, sadia kDNA- para receptoras kDNA+ doentes. O benefício do tratamento foi observado in vivo pelo enxerto de coração repórter.
- 7) Experimentos controle positivo revelaram que a patologia pode ser transferida de ave kDNA+ para ave controles kDNA- mediante transferência de medula óssea de ave doente para a receptora sadia.
- 8) O conjunto dos experimentos sugere o tratamento da cardiopatia chagásica pela transferência de medula óssea de doador histocompatível sadio. Mas a aplicação do conhecimento para tratar a doença cardíaca manifestada em humanos depende de uma droga para inibir a multiplicação do *T. cruzi*

e, também, requer o avanço da tecnologia de identificação de medula óssea histocompatível.

- 9) A transferência e inibição da patologia em aves mutadas com o kDNA do *T.cruz* no modelo 'transkingdom' sugere que chagas humana é uma doença autoimune de origem genética.




Universidade de Brasília
Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 01 de julho de 2008.

DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "AVES CONGÊNICAS DE PRAÇA: TRANSFERÊNCIA PASSIVA DA AUTO-IMUNIDADE DE AVES MUTADAS COM KDNA DE TRYPANOSOMA CRUZI PARA AVES RECEPTORAS SADIAS", UNBDOC nº 35714/2008, sob responsabilidade do Prof. Antônio R. L. C. Teixeira, foi avaliado e aprovado pelo Comitê de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.


Prof. Antonio Sebden
Coordenador do CEUA

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRADE, Z.A; ANDRADE G.S; CORREA R; SADIGRURSKY M; FEURANS J.V. **Miocardial changes in Acute Trypanosoma cruzi infection.** *American Journal of Pathology.*, Vol. 144, No. 6, June 1994.
2. ANDRADE, Z.A. **Immunopathology of Chagas Disease.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz.* V. 94 (Suppl.1), p. 71-80, 1999.
3. ARGANARAZ, E.R. **Integração de seqüências de minicírculo de kDNA de Trypanosoma cruzi em elementos L1 no genoma de células hospedeira.** *Tese, Universidade de Brasília,* 1996.
4. AUFDERHEIDE, A. C., W. SALO, M. MADDEN, J. STREITZ, J. BUIKSTRA, F. GUHL, B. ARRIAZA, C. RENIER, L. E. WITTMERS, JR., G. FORNACIARI, AND M. ALLISON.. **A 9,000-year record of Chagas' disease.** *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101:2034-2039, 2004
5. BACON, L.D; CRITTENDEN, L.B; WITTER, R.L. **B1 and B15 associated with progressive Marek's disease, Rous sarcoma, and avian leukosis virus-induced tumors in inbred 1514 chickens.** *Poult. Sci.*,62:573-578., 1983
6. BARBOSA, W; CZEREWUTA, A.C; OLIVEIRA, R.L. **Tentativa de isolamento primário de T. cruzi de pacientes crônicos de doença de Chagas por hemocultura agentes bloqueadores.** *Ver Patol Trop.* 1983; 12:155-63.
7. BARRETO, A.C; MARSDEN P.D; CUBA, C.C; ALVARENGA, N.J. **Estudo preliminar sobre o emprego de Dipetalogaster maximus (uhler, 1894) (triatominae) na técnica do xenodiagóstico em forma crônica da doença de Chagas.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical,* São Paulo 1978; 20:183-9.
8. BENOIST, C. AND MATHIS, D. **(Autoimmunity provoked by infection: how good is the case for T cell epitope mimicry?** *Nat. Immunol.* 2, 797–801, 2001.
9. BITTENCOURT, A. L.. **Congenital Chagas' disease.** *Am. J. Dis. Child.* 130:97-103, 1976

10. BOONNEY, K.M., ENGMAN, D.M. **Chagas heart disease pathogenesis one mechanism or many?** *Curr Mol Med.* 8, p. 510-518, 2008.
11. BOCCHI E.A. **Heart transplants for patients with Chagas' heart disease.** *Sao Paulo Med J.* 113(2):873-9, 1995
12. BOCCHI E.A, FIORELLI, A. **First Guideline Group for Heart Transplantation of the Brazilian Society of Cardiology. The Brazilian experience with heart transplantation: a multicenter report.** *J Heart Lung Transplant.* 20(6):637-45, 2001.
13. BRAGA, M.S; LAURIA-PIRES L; ARGANARAZ, E.R; NASCIMENTO, R.J; TEIXEIRA, A.R. **Persistent infections in chronic Chagas disease patients treated with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivatives.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 42, p. 157-161, 2000.
14. BRENER, Z; GAZZINELLI, R. T. **Immunological control of Trypanosoma cruzi infection and pathogenesis of Chagas disease.** *International Archives of Allergy and Immunology*, 114, p. 103-110, 1997.
15. BRILES, W.E.; MCGIBBON, W.H; IRWIN, M.R. **On multiple alleles affecting cellular antigens in chicken.** *Genetics.* v. 35, p.633-652, 1950.
16. BRILES, W.E; STONE, H.A; COLE, R.K.. **Marek's disease: effects of B histocompatibility alloalleles in resistant and susceptible chicken lines.** *Science*, 195:193-195. 1977
17. BRILES, W.E; BUMSTEAD, N; EWERT, D.L; GILMOUR, D. G; GOGUSEV, J; HÁLA, K; KOCH, C; LONGENECKER, B.M; NORDSKOG, A.W; PINK, J.R.L; SCHIERMAN I.W; SIMONSEN, M; TOIVANEN, A. VANIO, O WICK, C. **Nomenclature for chicken major histocompatibility (B) complex.** *Immunogenetics* 15,441-447, 1982a.
18. BRILES, E. W; BRILES, W. **Identificação of haplotypes of the chicken Major Histocompatibility complex (B).** *Immunogenetics* 15: 449-459, 1982b.
19. BRILES, W.E; BRILES, R.W; TAFFS, R.E; STONE, H.A. **Resistance to a malignant lymphoma in chickens is mapped to subregion of major histocompatibility (B) complex,** *Science* 219, 977-979, 1983

20. BRILES W.E; GOTO R.M; AUFRAY C; MILLER M.M. **A polymorphic system related to but genetically independent of the chicken major histocompatibility complex.** *Immunogenetics*, 37:408-414,1993.
21. BRINSTER, R.L; AVARBOCK, M.R. **Germline transmission of donor haplotype following spermatogonial transplantation.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:11303-7, 1994.
22. BRINSTER, R.L; ZIMMERMANN, J.W. **Spermatogenesis following male germ-cell transplantation.** *Proc Natl Acad Sci USA*; 91:11298-302.1994
23. BURCH, J.B.; DAVIS, D.L. & HAAS, N.B. **Chicken repeat 1 elements contain a pol-like open reading frame and belong to the non-long terminal repeat class of retrotransposons.** *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8199-8203, 1993.
24. BRUMPT, E. **Schizoytypamum cruzi a différentes phases de son cycle évolutif.** *Bull. Soc. Path. Exot.*; 5, 261, 1912.
25. CALNEK, B. W., AND R. L. WITTER.. **Marek's Disease.** Pages 367–413 in *Diseases of Poultry, 10th ed.* B. W. Calnek, ed. Iowa State University Press, Ames, IA. 1997
26. CAMPBELL, D; WESTENBERGER, S.J; STURN, N.R. **The determinants of Chagas disease: connecting parasite and host genetics.** *Curr. Mol. Med.*, 4, p. 549-562, 2004.
27. CHAGAS, C. **Nova tripanossomíase. Morfologia e ciclo de vida do *Schizotrypanum cruzi*, agente de uma nova doença humana.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*,1, p. 159-218,1909.
28. CHAGAS, C. **Uma nova doença humana. Sumário de estudos etiológicos e clínicos.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, 3, p. 219-275, 1911
29. CHAGAS, C. **Tripanosomíase Americana. Forma aguda da molétia.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 8;37-65.1916
30. CHEN, J., C.A. RAUCH, J.H. WHITE, P.T. ENGLUND, AND N.R. COZZARELLI. **The topology of the kinetoplast DNA network.** *Cell* 80: 61-69, 1995

31. COLLINS, W.M; BRILES, W.E; ZSIGRAY, R.M; DUNLOP, R.W; CORBETT, C.A; CLARK, K.K; MARKS, L.J; MCGRAIL, P.T. **The B locus (MHC) in the chicken: Association with the fate of RSV-induced tumors.** *Immunogenetics*, 5:333-343, 1977.
32. COURA, J, R. **Mecanismo de transmissão da infecção chagásica ao homem por via oral.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 44,p.159-165, 1997.
33. CUNHA-NETO, E; COELHO,V; LUÍZA GUILHERME, L; FIORELLI, A; STOLF, N; KALIL, K. **Autoimmunity in Chagas' disease identification of cardiac myosin – B13 Trypanosoma cruzi protein crossreactive T cell clones in heart lesions of a chronic Chagas' cardiomyopathy patient.** *J. Clin. Invest.* 98, 1709-1712, 1996.
34. CUNHA-NETO, E; KALIL, J. **Autoimmunity in Chagas' heart disease.** *Rev Paul Med* 113: 757-766, 1995.
35. CUNHA-NETO, E. et al. **Induction of cardiac autoimmunity in Chagas heart disease: a case for molecular mimicry.** *Autoimmunity, Londres*, v. 39, p. 41-54, 2006.
36. DAVIDSON, ANNE M.B., B.S., AND DIAMOND BETTY , M.D. **Autoimmune diseases.** *N Engl J Med*, Vol. 345, No. 5 - August 2, 2001
37. DELANY, M.E; ROBINSON, C.M; GOTO, R.M; MILLER, M.M. **Architecture and organization of chicken microchromosome 16: order of the NOR, MHCY, and MHC-B subregions.** *J Hered* 100:507-514, 2009.
38. DIAS,,J.C.P; COURA J.R. Epidemiologia. In: DIAS, COURA JR (EDS). **Clínica e terapêutica da doença de Chagas. Uma abordagem pratica para clínica geral.** *Rio de Janeiro: FIOCRUZ editora*, 33-66, 1997.
39. DIAS, J.C.P; SCHOFIELD, C. **The evolution of Chagas disease (American trypanosomiasis) control after 90 years since Carlos Chagas discovery.** *Mem Inst Oswaldo Cruz.*94,(1):103-21,1999.
40. DIAS JCP, SILVEIRA AC, SCHOFIELD CJ. **The impact of Chagas control in Latin América: a review.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*;97:603-12, 2002.

41. DIAS JCP, MACEDO VO. **Doença de Chagas.** In: Coura JR, editor. *Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan Editora; 2005.
42. DIGHIRO, G; ROSE N.R. **Critical self-epitopes are key to the understanding of self-tolerance and autoimmunity.** *Immunology Today.* Vol. 20. No 09. 423, September 1999.
43. DODD, R.Y. **Current safety of the blood supply in the United States.** *International Journal of Hematology*, 80, p. 301-305, 2004.
44. DUTRA O.W; GOLLOB J.K. **Current concepts in immunoregulation and pathology of human Chagas disease.** *Curr Opin Infect Dis.* 2008 June ; 21(3): 287–292.
45. DUTRA, O.W; MENEZES, S.A.C; VILLANI, A.N.F; COSTA, C.G; SILVEIRA M.B.A; REIS, A.D; GOLLOB J.K. **Cellular and genetic mechanisms involved in the generation of protective and pathogenic immune responses in human Chagas disease.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de Janeiro, Vol. 104(Suppl. I): 208-218, 2009
46. FUENMAYOR C, HIGUCHI ML, CARRASCO H, PARADA H, GUTIERREZ P, AIELLO V, PALOMINO S. **Acute Chagas' disease: immunohistochemical characteristics of T cell infiltrate and its relationship with T. cruzi parasitic antigens.** *Acta Cardiol.* 2005 Feb;60(1):33-7.
47. GADELHA, A. A. M.; VERÇOSA, A. F. A.; LORENA, V. M. B.; NAKAZAWA, M.; CARVALHO, A. B.; SOUZA, W. V.; FERREIRA, A. G. P.; SILVA, E. D.; KRIEGER, M.A.; GOLDENBERG, S.; GOMES, Y. M. **Chagas' disease diagnosis: comparative analysis of recombinant ELISA with conventional ELISA and hemagglutination test.** *Vox Sanguinis*, v. 85, p. 165-170, 2003.
48. GARCIA, S.B. **Doença de Chagas: os 100 anos da descoberta e a atualidade do pensamento do seu descobridor.** *Arq Gastroenterol*, v. 46 – no.4 – out./dez. 2009
49. GARCIA-ZAPATA, M.T.A; MARSDEN, D.P. 1986. **Chagas' disease.** *Clin. Trop. Med. Commun. Dis.* 1:537-585.
50. GILMOUR, D.C. **Segregation of genes determining red cell antigens at high levels of inbreeding in chickens.** *Genetics* 1959;44:14-33.

51. GIRONES, N; FRESNO, M. **Etiology of Chagas disease myocarditis: autoimmunity, parasite persistence, or both?** *Trends in Parasitology*. 19, p. 19-22, 2003.
52. GIRONES N; CUERVO H; FRESNO M. **Trypanosoma cruzi-Induced Molecular Mimicry and Chagas' Disease.** *Curr Top Microbiol Immunol*. 2005; 296:89-123.
53. GOLDENBERG RC, JELICKS LA, FORTES FS, WEISS LM, ROCHA LL, ZHAO D, et al. **Bone marrow cell therapy ameliorates and reverses chagasic cardiomyopathy in a mouse model.** *J Infect Dis*. 2008;197(4):544-7.
54. GOMES, C.C. **Lesões típicas da Doença de Chagas em Aves com Genoma Alterado por Interações de Sequências de minicírculos de kDNA de Trypanosoma cruzi.** Tese, Universidade de Brasília, 2006.
55. GONÇALVES, S.C. **Transfusional Chagas' disease.** *Rev Bras. Reumatologia*, 34(2): 105-106, 1994.
56. GOGARTEN, J.P; TOWNSEND, J.P. **Horizontal gene transfer, genome innovation and evolution.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 3, n. 9, p. 679-687, 2005.
57. GRANT, I.H; GOLD J.W.M; WITTNER M; TANOWITZ, H.B; NATHAN, C; MAYER, K; REICH, L; WOLLNER, L. STEINHERZ, F; O'REILLY, R.J; ARMSTRONG, D. **Transfusion associated acute Chagas' disease acquired in the United States.** *Ann. Intern. Med*. 111:849-851,1989.
58. GUILLEMOT, F; TURMEL, P; CHARRON, D; DOURAIN, LE N; AUFFRAY, C;. **Structure, biosynthesis, and polymorphism of chicken MHC class II (B-L) antigens and associated molecules.** *J. Immunology*, 137(4):1251-1257, 1986
59. GUILLEMOT F, BILLAULT A, POURQUIÉ O, BÉHAR G, CHAUSSÉ A.M, ZOOROB R, KREIBICH G, AUFFRAY C: **A molecular map of the chicken major histocompatibility complex: the class II beta genes are closely linked to the class I genes and the nucleolar organizer.** *EMBO J* 1988, 7:2775-2785.

60. GUYRE PM, ZSIGRAY RM, COLLINS WM, DUNLOP WR. **Major histocompatibility complex (B): effect on the response of chickens to a second challenge with Rous sarcoma virus.** *Poult Sci* 61:829–834, 1982
61. GYLES N. R, BLYTHE M, TEST P, BOWANKO A, BROWN C. J. **Immune response in progressor and regressor strains of chickens at specific intervals after a primary challenge with Rous sarcoma virus.** *Poult Sci.* 1977 May;56(3):758-66.
62. HACKER, J. KAPER, J. B. **Pathogenicity islands and the evolution of microbes.** *Annual Review Microbiology* , v. 54, p. 641-679, 2000.
63. HÁLA, K; HASEK, M; HLOZÁNEK, I; HORT, J; KNÍZETOVÁ, F; MERVARTOVÁ, H. **Syngenic lines of chicken II. Inbreeding and selection within the M, W and I lines and crosses between the C, M and W lines.** *Folia. Bio. (Praha)*, 12: 407, 1966.
64. HALÁ, K; VILHELMOVÁ, M; HARTMANOVÁ J. **Probable crossing-over in the B blood group system of chickens.** *Immunogenetics.* 3, 97-103. 1976
65. HÁLA, K; VILHELMOVÁ, M; SCHULMANNOVÁ, J; PLACHÝ, J. **A new recombinat allele in the B complex of the chicken.** *Folia biologica (Praha)*, vol.5, 1979.
66. HALÁ, K; BOYD, R; WICK, G. **Chicken major histocompatibility complex and disease.** *Scand. J. Immunol.* 14, 606-616. 1981a.
67. HALÁ, K; PLACHÝ, J; SCHULMANNOVÁ, J. **Role of the B-G region antigen in the humoral immune response to the B- F region antigen of the chicken MHC.** *Immunogenetics* 14, 393-401, 1981b
68. HÁSEK, M; KNIZETOVÁ, F MERVARTOVÁ, H; **Syngenic lines of chicken, I. inbreeding and selection by means of skin grafts and tests for erythrocyte antingens in the C lines chickens.** *Fol. Biol. (Praha)*, 12: 335, 1966.
69. HAAS, N.B.; GRABOWSKI, J.M.; SIVITZ, A.B. & BURCH, J.B. **Chicken repeat 1 (CR1) elements, which define an ancient family of vertebrate non-LTR retrotransposons, contain two closely spaced open reading frames.** *Gene* 197: 305-309, 1997.
70. HECHT, M, M; NITZ, N. ARAÚJO, P.F; SOUSA, A,.O; ROSA, A.C; GOMES, D. A; LEONARDECZ, E; TEIXEIRA, A.R.L. **Inheritance of DNA Transferred**

from American Trypanosomes to Human Hosts. *PloS One*. 5 (2): e9181. 2010.

71. HINES J.C; RAY D.S. **Structure of discontinuities in kinetoplast DNA-associated minicircles during S phase in *Crithidia fasciculata*.** *Nucleic Acids res* 3: 444-450. 2008.
72. HIGUCHI M.L; GUTIERREZ P.S AIELLO V.D; PALOMINO, S; BOCCHI, E; KALIL, J; BELLOTI, G; PILEGI, F. **Immunohistochemical characterization of infiltrating cells in human chronic chagasic myocarditis: comparison with myocardial rejection process.** *Virchows Archiv*.1993;423(3):157-60.
73. HIGUCHI M.L.. **Chronic chagasic cardiopathy: the product of a turbulent host-parasite relationship.** *Rev Inst Med Trop. Sao Paulo* 39: 53-60,1997.
74. HOFFLIN, J.M; SADLER, R.H; ARAUJO, F.G. **Laboratory-acquired Chagas' disease.** *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 81:437-440,1987.
75. HOFT, D.F; SCHNAPP, A.R; EICKHOFF, C.S; ROODMA, S.T. **Involvement of CD4+ TH1 cells in systemic immunity protective against primary and secondary challenges with *Trypanosoma cruzi*.** *Infection and Immunity*, 68, p. 197-204, 2000.
76. HUDSON, L; P. J. HINDMARSH. **The relationship between autoimmunity and Chagas' disease: causal or coincidental?** *Curr.Top.Microbiol.Immunol.* 117:167–177, 1985.
77. HYLAND, K. V.; ENGMAN, D. M. **Further thoughts on where we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease.** *Trends Parasitology*, Londres, v. 22, p. 101-102, 2006.
78. IWAI K.L; JULIANO, A..M; JULIANO L; KALIL J; CUNHA-NETO, E. **T-cell molecular mimicry in Chagas disease: identification and partial structural analysis of multiple cross-reactive epitopes between *Trypanosoma cruzi* B13 and cardiac myosin heavy chain.** *Journal of Autoimmunity* 24 (2005) 111e117.
79. KAUFMAN, J; SKJODT, K; SALOMONSEN J. **The B-G multigene family of the chicken MHC.** *Crit Rev Immunol* 1991 ;11:113-143.

80. KAUFMAN J, WALLNY H.J. **Chicken MHC molecules, disease resistance and the evolutionary origin of birds.** *Curr Top Microbiol Immunol* 212:129–41,1996.
81. KAUFMAN, J. **Co-evolving genes in MHC haplotypes: the “rule” for non mammalian vertebrates?** *Immunogenetics* (1999a) 50: 228–236
82. KAUFMAN J; MILNE S; GÖBEL T.W; WALKER B.A; JACOB J.P; AUFFRAY, C; ZOOROB, R; BECK, S. **The chicken B locus is a minimal essential major histocompatibility complex.** *Nature* 1999b, 401:923-925.
83. KAUFMAN, J. **The simple chicken major histocompatibility complex: life and death in the face of pathogens and vaccines.** *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 355, 1077-1084,2000.
84. KERNER, N; LIEGEARD, P; LEVIN, M; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. **Trypanosoma cruzi: antibodies to a MAP-like protein in chronic Chagas’ disease cross-react with mammalian cytoskeleton.** *Exp. Parasitol.*, v.73, p.451-459, 1991.
85. KERNDT, R.P; WASKIN, H.A; KIRCHHOFF, V.L; STEURER, F; WATERMAN, H.S; NELSON, J.M.G; GELLERT, A; SHULMAN, A.I.. **Prevalence of antibody to Trypanosomacruzi among blood donors in Los Angeles, California.** *Transfusion* 31:814-818,1991.
86. KIDWELL, M.G. **Lateral transfer in natural populations of eucaryotes.** *Annual Review of Genetic.*, v. 27: 235-256, 1993.
87. KIERSZENBAUM, F. **Autoimmunity in Chagas disease.** *J. Parasitol.*, 72: 201-211, 1986.
88. KIERSZENBAUM, F. **Chagas disease and the autoimmunity hypotheses.** *Clinical Microbiology Reviews.* 12, p. 2210-222, 1999.
89. KIERSZENBAUM, F. **Where do we stand on the autoimmunity hypothesis of Chagas disease?** *Trends Parasitol.* , 2005 21, 513–516
90. KIERSZENBAUM, F. **Mechanisms of pathogenesis in Chagas disease.** *Acta Parasitologica*, 52(1), 1–12; ISSN 1230-2821, 2007.
91. KIRCHHOFF, V.L. **American trypanosomiasis (Chagas’ disease) – a tropical disease now in the United States.** *N. Engl. J. Med.* 329:639- 644. 1993.

92. KLINGBEIL, M.M & ENGLUND, PT. Closing the gaps in kinetoplast DNA network replication. *PNAS*. V. 101(13): 4333-4334, 2004.
93. KÖBERLE, F. **Enteromegaly and cardiomegaly in Chagas disease**. *Gut*. 1963 December; 4(4): 399–405
94. KURLAND, C.G. **Something for everyone. Horizontal gene transfer in evolution**. *EMBRO Reports*, 1(2): 92-95, 2000.
95. KURLAND, C.G; CANBACK, B; BERG, O.G. **Horizontal gene transfer: A critical view**. *Proceedings of the National Academy Science of the USA (PNAS)*, v. 100, n. 17, p.9658-9662, 2003.
96. LARANJA, F.S; NOBREGO, G; MARINDA, A. **Chagas disease a clinical, epidemiologic and pathologic study**. *Circulation*, 14, 1035-1060, 1956.
97. LAHTI, J. M.; CHEN, C. L.; TJOELKER, L. W.; PICKEL, J. M.; SCHAT, K. A.; CALNEK, B. W.; THOMPSON, C. B.; COOPER, M. D. **Two distinct alpha beta T-cell lineages can be distinguished by the differential usage of T-cell receptor V beta gene segments**. *Proceedings of the National Acadademy of Sciences of the USA*, v.88, n.23, p.10956-10960, 1991.
98. LAUCELLA, S.A; ROTTENBERG, M.E; DE TITO, E.H. **Role of cytokines in resistance and pathology in Trypanosoma cruzi infection**. *Revista Argentina de Microbiología*, 28, p. 99-109, 1996.
99. LAURIA-PIRES, L; BRAGA, M.S; VEXANAT ,A.C; NITZ, N; SIMÕES-BARBOSA, A; TIINOCO, D.L; TEIXEIRA, A.R. **Progressive chronic Chagas heart disease tem years after treatment with anti-Trypanosoma cruzi nitroderivates**. *Am. J. Trop. Med. Hyd.*, 63 (3-4): 111-118, 2000.
100. LEON J.S; ENGMAN D.M. **Autoimmunity in Chagas heart disease**. *International Journal for Parasitology* 31 (2001) 555±561
101. LEON, J.S; ENGMAN, D.M. **The significance of autoimmunity in the pathogenesis of Chagas heart disease**. *Front. Biosci.*, 8: 315-322, 2003.
102. LEVIN, M. J. **In chronic Chagas heart disease, don't forget the parasite**. *Parasitology Today*, 12, p. 415-416, 1996..

103. LOPES-BERGAMI, P. **Antibodies against the carboxyl-terminal end of the *Trypanosoma cruzi* ribosomal P proteins are pathogenic.** *FASEB J.*, v.15, p.2602-2612, 2001.
104. MACEDO, A.M; PENA, S.D.J. **Genetic variability of *Trypanosoma cruzi*: implications for the pathogenesis of Chagas Disease.** *Parasitol. Today*, 14: 119-124, 1998.
105. MACEDO, A.M.; OLIVEIRA, R.P. & PENA, S.D. **Chagas disease: role of parasite genetic variation in pathogenesis.** *Expert. Rev. Mol. Med.*, 1-16, 2002.
106. MADY C; LANNI B.M; SOUZA JR. **Benznidazole and chagas disease: can an old drug be the answer to an old problem?** *Expert Opin Investig Drugs* 17: 1427-1433, 2008.
107. MAGUIRE JH. **Chagas' disease - - can we stop the deaths?** *N Engl J Med.* 2006; 355(8):760-1.
108. MARIN-NETO J.A, CUNHA-NETO E, MACIEL B.C, SIMÕES MV. **Pathogenesis of chronic Chagas heart disease.** *Circulation.* 2007; 6 (9): 1109-23.
109. MENGEL, J.O; ROSSI M.A. **Chronic chagasic myocarditis pathogenesis: Dependence on autoimmune and microvascular factors.** *Am. Heart J.* 124:1052–1057, 1992.
110. MILLER, M.M; GOTO, R.M; TAYLOR, R.L.J; ZOOROB, R; AUFRAY, C; BRILES, R.W; BLOOM, S.E: **Assignment of Rfp-Y to the chicken major histocompatibility complex/NOR microchromosome and evidence for high-frequency recombination associated with the nucleolar organizer region.** *Proc Natl Acad Sci USA* 1996, 93:3958-3962.
111. MILLER, M.M; BACON, L.D; HALA, K; HUNT, H.D; EWALD, S.J; KAUFMAN, J; ZOOROB, R; BRILES, W.E: **2004 Nomenclature for the chicken major histocompatibility (B and Y) complex.** *Immunogenetics* 2004, 56:261-279.
112. MILES MA, FELICIANGELI MD & ARIAS AR. **American trypanosomiasis (Chagas' disease) and the role of molecular epidemiology in guiding control strategies.** *British Medical Journal*, 28, 1444-1448, 2003.
113. MINOPRIO, P; EISEN, H; FORNI, L; D'IMPÉRIO LIMA MR; JOSKOWICZ M; COUTINHO, A. **Polyclonal lymphocyte responses to murine**

Trypanosoma cruzi infection. I Quantification of both T-and B-cell response. *Scand J Immunol.* 24: 661 – 668, 1986.

114. MINOPRIO, P; ITOHARA, S; HEUSSER, C; TONEGAWA, S; COUTINHO A. **Immunobiology of T. cruzi infection: the predominance of parasite-non specific responses and the activation of TCRI T cells.** *Immunol. Rev.* 112:183–207,1989.
115. MONCAYO, A. **Chagas disease: Current Epidemiological trends after the interruption of vetorial and transfusional transmission in the southern cone countries.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz.* 98 (5); 577-591, 2003.
116. MOSER, D.R.; KIRCHHOFF, L.V; DONELSON, J. **Detection of Trypanosoma cruzi by DNA amplification using the polymerase chain reaction.** *J. Clin. Microbiol.,* 27: 1477-1482, 1989.
117. NERY-GUIMARÃES F; SILVA N.N; CALUSELL D.T; MELLO A.L; RAPONE T; SNELL T; RODRIGUES N. **Um surto epidêmico de doença de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutônia (Estrela, Rio Grande do Sul).** *Hospital* 73: 1767-1804, 1968.
118. NERY-GUIMARÃES F; LAGE, A.H. **A refratariedade das aves ao Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi. II – Refratariedade das galinhas desde o nascimento; persistência da refratariedade após bursectomia; infecções em ovos embrionados.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 70 (1), 1972.
119. NERY-GUIMARÃES F; VENÂNCIO I; GRYNBERG N. **Refratariedade das galinhas ao Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi III – dissociação dos fenômenos da refratariedade e da lise dos epimastigotas pelo soro das aves.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz,* 72 (1/2) 131-136. 1974
120. NEVES DA SILVA N; CLAUSELL, T.D; NÓLIBOS, H; MELO A.L; OSSANAI, J; RAPONE, T; SNELL T. **Surto epidêmico de doença de Chagas com provável contaminação oral.** *Rev Inst Med Trop São Paulo* 1968; 10: 265-76.
121. NORDSKOG, A.W; GEBRIEL, G.M. **Genetic aspects of Rous sarcoma-induced tumor expression in chickens.** *Poult. Sci.,* 62:725-732,1983.
122. NITZ, N; GOMES, C; ROSA, A.C; D'SOUZA-AULT, M.R; MORENO, F; LAURIA-PIRES, L; NASCIMENTO, R.J; TEIXEIRA, A.R.L. **Heretable integration of kDNA minicircle sequences from Trypanosoma cruzi into**

avian genome: Insight into human Chagas Disease. *Cell*, 118: 175-186, 100,2004.

123. OKADA, I. **The B complex in the chicken -Development from a blood group system into the major histocompatibility complex. *Journal of Faculty of Applied Biological Science, Hiroshima University*, 31 : 11-28. 1992.**
124. O'NEILL MA; LIVANT J. E.; EWALD J. S. **The chicken BF1 (classical MHC class I) gene shows evidence of selection for diversity in expression and in promoter and signal peptide regions. *Immunogenetics* (2009) 61:289–302**
125. PÉREZ-MORGA, D; P.T. Englund. **The attachment of minicircles to kinetoplast DNA networks during replication. *Cell* 74: 703-711,199.**
126. PETRY, K.; EISEN, H. **Chagas' disease: a model for the study of autoimmune diseases. *Parasitol. Today*, v.5, p.111-121, 1989.**
127. PINK, J.R.L; DROEGE, W; HALA, K; MIGGIANO V.C; ZIEGLER, A. **A three-locus model for the chicken major histocompatibility complex. *Immunogenetics* 1977:5:203-216.**
128. PIRARD, M; LIHOSHI, N; BOELAERT, M; BASANTA, P; LOPEZ, F; VAN DER STUYFT, P. **The validity of serologic tests for *Trypanosoma cruzi* and the effectiveness of transfusional screening strategies in a hyperendemic region. *Transfusion*, 45,p.554-561, 2005.**
129. PLACHÝ, J; HÁLA, K. **Comparative aspects of the chicken immunogenetic (Review). *Folia Biologica (Praha)* 43, 133-151 (1997).**
130. PLACHY, J; BENDA, V. **Location of the gene responsible for Rous sarcoma regression in the B-F region of the B complex (MHC) of the chicken. *Folia Biol. (Praha)* 27:363–368,1981.**
131. PLACHY, J. **Hierarchy of the B (MHC) haplotypes controlling resistance to Rous sarcomas in a model of inbred lines of chickens. *Folia Biol. (Praha)* 30:412–425,1984.**
132. PLACHY, J; VILHELMOVA, M. **Syngeneic lines of chickens. 7. The lines derived from the recombinants at the B complex (MHC) of Rous sarcoma regressor and progressor inbred lines of chickens. *Folia Biol. (Praha)* 30:189-201,1984.**

133. PLACHÝ, J; KARAKOZ, I; BENDA, V. **Concomitant immunity leads to retardation or acceleration of the growth of Rous sarcomas in genetically resistant or susceptible inbred lines of chickens.** *Folia Biológica (Praha)*, 1986.
134. PLACHÝ, J; VILHELMOVÁ, M; KARAKOZ, I; SCHULMANNOVÁ, J. **Prague inbred lines of chickens: a biological model for MHC research.** *Folia bio. (Praha)* 35, 177-196. 1989.
135. PLACHÝ, J; HÁLA, K; HEJNAR J; GERYK, J; SVOBODA, J. **src-specific immunity in inbred chickens bearing v-src DNA- and RSV – induced tumours.** *Immunogenetics* 40, 257-265. 1994.
136. PLACHY, J; HEJNAR J. **Chicken cells - oncogene transformation, immortalization and more.** *Folia Biol. (Praha)* 48:126–138, 2002..
137. PRATA, A. **Clinical and epidemiological aspects of Chagas disease.** *Lancet Infectious Diseases*, 1, p. 92-100, 2001.
138. RASSI A JR, DIAS JC, MARIN-NETO JA, RASSI A. **Challenges and opportunities for primary, secondary and tertiary prevention of Chagas' disease.** *Heart*. 2009; 95 (7): 524-34.
139. REIS, D.D.; JONES, E.M; TOSTES, S.JR; LOPES, E.R; GAZZINELLI, G; COLLEY, D.G; MCCURLEY, T.L. **Characterization of inflammatory infiltrates in chronic chagasic myocardial lesions: presence of tumor necrosis factor-alpha+ cells and dominance of granzyme A+, CD8+ lymphocytes.** *American Journal of Tropical Medicine Hygiene*, 48, p. 637-644, 1993.
140. REYES P.A PEDRO; VALLEJO, MAITE. **Trypanocidal drugs for late stage, symptomatic Chagas disease (Trypanosoma cruzi infection).** This is a reprint of a Cochrane review, prepared and maintained by The Cochrane Collaboration and published in The Cochrane Library 2008, Issue 3. <http://www.thecochranelibrary.com>
141. REQUENA, J.M; JIMEMEZ-RUIZ, A; SOTO, M; LOPEZ, M.C; ALONSO, C. **characterization of a highly repeated interspersed DNA sequence of Trypanosoma cruzi: its potential use in diagnosis and strain classification.** *Mol biochem Parasitol*. V 51:271-280, 1992.

142. REZENDE J.M; RASSI A. DOENÇA DE CHAGAS. IN: CASTRO, L.P; CUNHA, A.S; **Protozooses Humanas**. São Paulo, Fundo editorial Byk, 1994.
143. RIBEIRO DOS SANTOS, R; PRIMEZ, C. SAVINO, W. **Role of auto reactive immunological mechanisms in chagasic carditis**. *Res Immunol*. 142: 134-137.1991.
144. RIBEIRO DOS SANTOS R, ROSSI M.A; LAUS J.L; SANTANA-SILVA J; SAVINO W; MONGEL, J. **Anti-CD4 abrogates rejection and reestablishes long-term tolerance to syngeneic newborn hearts grafted in mice chronically infected with Trypanosoma cruzi**. *J ExpMed* 175: 29-39, 1992.
145. RIBEIRO, I; SEVCSIK, A.; ALVES, F; DIAP, G; DON, R; HARHAY , O.M.; CHANG, S; PECOUL, B. **New, Improved Treatments for Chagas Disease: From the R&D Pipeline to the Patients**. *PLoS Negl Trop Dis*.7;3(7):e484. 2009 Jul.
146. RIBEIRO A. L; ROCHA M.O. **Indeterminate form of Chagas disease: considerations about diagnosis and prognosis**. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 1998;31(3):301-14.
147. ROTTENBERG M.E; BAKHIET, M; OLSSON, T; KRISTENSSON, K; MAK, T; WIGZELL, H; ORN, A. **Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with Trypanosoma cruzi or Trypanosoma brucei**. *Infect Immun*. 61: 5129-5133,1993.
148. RUBIN-DE-CELIS SS, UEMURA H, YOSHIDA N, SCHENKMAN S 2006. **Expression of trypomastigote trans-sialidase in metacyclic forms of Trypanosoma cruzi increases parasite escape from its parasitophorous vacuole**. *Cell Microbiol* 8: 1888-1898.
149. SHARMA, J. **Avian Cellular Immunology**. 1. CRC Press, 1990.
150. SAMBROOK, J; RUSSEL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual**. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory, 3^a edition, 2001.
151. SANTOS-BUCH, C.A; TEIXEIRA, A.R. **The immunology of experimental Chagas' disease. Rejection of allogeneic heart cells in vitro**. *J. Exp. Med.*, 140 (1), 38-53, 1974.
152. SHAW, I; POWELL, J. T; MARSTON, A. D; BAKER, K; HATEREN, V. A; RIEGERT, P; WILES, V. M; MILNE, S; BECK, S; KAUFMAN, J. **Different**

Evolutionary Histories of the Two Classical Class I Genes *BF1* and *BF2* Illustrate Drift and Selection within the Stable MHC Haplotypes of Chickens. *The Journal of Immunology*, 2007, 178: 5744 –5752.

153. SCHMID M, NANDA I, GUTTENBACH M, STEINLEIN C, HOEHN M, SCHARTL M, HAAF T, WEIGEND S, FRIES R, BUERSTEDDE JM, WIMMERS K, BURT DW, SMITH J, A'HARA S, LAW A, GRIFFIN DK, BUMSTEAD N, KAUFMAN J, THOMSON PA, BURKE T, GROENEN MA, CROOIJMANS RP, VIGNAL A, FILLON V, MORISSON M, PITEL F, TIXIER-BOICHARD M, LADJALI-MOHAMMEDI K, HILLEL J, MÄKI-TANILA A, CHENG HH, DELANY ME, BURNSIDE J, MIZUNO S: **First report on chicken genes and chromosomes 2000.** *Cytogenet Cell Genet* 2000, 90:169-218
154. SCHIERMAN, L.W; NORDSKOG, A.W. **Relationship of blood type to histoconpatibility in chickens.** *Science* 1961 ;134:1008-1009
155. SCHMUNIS G,A. **Risk of Chagas disease through transfusions in the Americans.** *Medina (Bueno Aires)*, 59, p. 125-134, 1999.
156. SCHMUNIS, G.A; YADON, Z.E. **Chagas disease: a Latin American health problem becoming a world health problem.** *Acta Tropica*. 2009.11.003.
157. SCOFIELD, V.L; SPENCE, J.L; BRILES, W.E. **Differential mortality and lesion responses to reticulo endotheliosis virus infection in Mareks disease resistant and susceptible chicken lines.** *Immunogenetics*, 7:169-172., 1978.
158. SHIKANAI-YASUDA M.A; MARCONDES C.B; GUEDES L.A; SIQUEIRA G.S; BARONE A.A; DIAS J.C.P; AMATO NETO V; TOLEZANO J.E; PERES B.A; ARRUDA JÚNIOR E.R; LOPES M.H; SHIROMA M; CHAPADEIRO E. **Possible oral transmission of acute Chagas' disease in Brazil.** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 33: 351-357,1991;
159. SHIKANAI-YASUDA M.A; LINDOSO-PORTELA A.B. **Chronic Chagas' disease: from xenodiagnosis and hemoculture to polymerase chain reaction.** *Review. Rev Saúde Pública* 2003;37(1):107-15..
160. SMITH, J.; BURT, D.W. **Parameters of the chicken genome (*Gallus gallus*).** *Animal Genetics*, v. 29, p.290-294, 1998.
161. SILVEIRA A.C. & VINHAES M., **Chagas disease: the epidemiological and control aspects.** *Rev Soc Bras Med Trop* , 31, (2):15-60, 1998.

162. SIMÕES-BARBOSA, A.; BARROS, A.M; NITZ, N; ARGANARAZ, E.R; TEIXEIRA, A.R. **Integration of *Trypanosoma cruzi* kDNA minicircle sequences in the host genome may be associated with autoimmune serum factors in Chagas disease patients.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 94 Suppl 1: 249-252, 1999.
163. SILVER , M. L. **Mouse Genetics Oxford University Press. 1995)**
164. SIMÕES-BARBOSA, A.M. **Transferência horizontal de seqüências de minicírculo de kDNA de *Trypanosoma cruzi* para transposon LINE-1 e alteração de expressão do gene p9 na célula hospedeira.** *Tese, de Doutorado Universidade de Brasília, 2000.*
165. SIMÕES-BARBOSA, A; ARGANARAZ, E.R; BARROS, A.M; ROSA A.C; ALVESN. P; LOUVANDINI, P; D'SOUZA-AULT M.R.D; NITZ, N; STURN N.R; NASCIMENTO R.J; TEIXEIRA A.R.L. **Hitchhiking *Trypanosoma cruzi* minicircle Dna affects gene expression in human host cells via line-1 retrotransposon.** *Mem Inst Oswaldo Cruz*, Rio de janeiro, vol 101 (8): p. 833-843. 2006.
166. SIMPSON, A.G.B; STEVENS JR, LUKES J. **The evolution and diversity of kinetoplastid flagellates.** *Trends Parasitol* 22: 168-174. 2006.
167. SOARES, MILENA BOTELHO PEREIRA AND SANTOS, RICARDO RIBEIRO DOS. **Current status and perspectives of cell therapy in Chagas disease.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* . vol.104, suppl.1, pp. 325-332. 2009.
168. STURM, N.R.; DEGRAVE, W.; MOREL, C. & SIMPSON, L. **Sensitive detection and schizodeme classification of *Trypanosoma cruzi* cells by amplification of kinetoplastide minicircle DNA sequences: use in diagnosis of Chagas disease.** *Mol. Biochem. Parasitol.*, 33: 205-214, 1989.
169. SVOBOBA, J.; PLACHY, J.; HEJANR, J.; KARAKOZ, I.; GUNTAKA, R.V., GERYK. **Tumor induction by the LTR, v-src, LTR DNA in four B (MHC) congenic lines of chickens.** *Immunogenetics*, 35: 309-315, 1992.
170. TANOWITZ HB, KIRCHHOFF LV, SIMON D, MORRIS SA, WEISS LM, et al. **Chagas' disease.** *Clin Microbiol Rev* 5: 400-419, 1992

171. TANOWITZ HB, MACHADO FS, JELICKS LA, SHIRANI J, CARVALHO ACC, SPRAY DC, e cols. **Perspectives on Trypanosoma cruzi-induced heart disease (Chagas disease).** *Prog Cardiovasc Dis.* 2009; 51(6):524-39.
172. TARLETON, R.L. **Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice with Trypanosomacruzi.** *J Immunol.* 144: 717-724, 1990.
173. TARLETON, R.L; ZHANG, L. **Chagas disease etiology: Autoimmunity or parasite persistence?** *Parasitol. Today* 15, 94-99. 1999.
174. TARLETON, R.L. **Parasite persistence in the aetiology of Chagas disease.** *International Journal of Parasitology, Trends* 31, p.550-554, 2001.
175. TARLETON, R.L. **Chagas disease; a role for autoimmunity?** *Trends in Parasitology* 19, p.447-451, 2003.
176. TEIXEIRA, A. R. L; SANTOS-BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease. I. Preoaration of Trypanosoma cruzi antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol*, 113, 859,1974.
177. TEIXEIRA, A.R.L; TEIXEIRA M.L; SANTOS-BUCH C.A. **The immunology of experimental Chagas' disease II. Delayed- hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens.** *Immunology*, 28, 401, 1975a.
178. TEIXEIRA, A.R.L; TEIXEIRA M.L; SANTOS-BUCH C.A. **The immunology of experimental Chagas' disease – IV. Production of lesions in rabbits similar to those of chronic Chagas' disease in man.** *Am J Path.*V 80: 163-180. 1975b.
179. TEIXEIRA, A.R.L. **Autoimmune mechanism in Chagas' disease.** *In: American Trypanosomiasis Research. Pan Am Health Org Sci Publ* 1975 318:98-108.
180. TEIXEIRA, A. R; TEIXEIRA, G; MACEDO, V; PRATA, A. **Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chaggas disease.** *Journal of Clinical Investigation*, 62, p. 1132-1141, 1978.
181. TEIXEIRA, A.R.L; **Chagas disease inbred III/J rabbits.** *American Journal Pathology*, 124, p. 363-365, 1986.

182. TEIXEIRA, A. R. L. ; CUNHA NETO, E. ; RIZZO, L. V. **Auto-Imunidade não é impedimento para vacinação contra Doença de Chagas.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, v. 20, n.2, p. 123-127, 1987
183. TEIXEIRA, A. R. L.; CORDOBA, J. C.; MAYOR, I. C. S; SOLORA, N. O. **Chagas'Disease: Lymphoma growth in rabbits treated with Benzonidazole.** *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 43, n.2, p. 146-158, 1990a
184. TEIXEIRA, A. R. L; SILVA, R; RIZZO, L. V; CUNHA NETO, E. . **Trypanocidal nitroarene treatment of experimental Trypanosoma cruzi infection does not prevent progression of chronic phase heart lesion in rabbits.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 162, p. 1420-1420, 1990b
185. TEIXEIRA, A.R.L; CUNHA-NETO, E; RIZZO, L.V; SILVA, R. **Trypanocidal nitroarene treatment of experimental Trypanosoma cruzi infection does not prevent progression of chronic-phase heart lesions in rabbits.** *J. Infec. Dis.*, 162: 1420, 1990c
186. TEIXEIRA, A.R.L; LACAVA, Z.G.M; SANTANA, J.M; LUNA, H. **Insertion of Trypanosoma cruzi DNA in the genome of mammal host cell through infection.** *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 24(1): 55-58, 1991.
187. TEIXEIRA, A.R.L; AARGANARAZ, E.R; FREITAS, J.R; LACAVA, Z.G.M; SANTANA, J.M; LUNA, H. **Possible integration of Trypanosoma cruzi kDNA minicircles into the host cell genome by infection.** *Mut. Res.*, 305: 197-209, 1994.
188. TEIXEIRA, A. R. **Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigen I. Experimental study in rabbits.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28, p.249-257, 1995.
189. TEIXEIRA, A. R; TEIXEIRA, M. G. **Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigen III. Sensitivity of the skin test T12E antigen in the diagnosis of Chagas disease in hospitalized patients.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 28, p.267-271, 1995.
190. TEIXEIRA, A.R.L; NASCIMENTO, R.J; STURM, N.R. **Evolution and pathology in Chagas disease – A Review.** *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 101(5): 463-491, 2006.
191. TEIXEIRA, A.R.L, GOMES, C; NITZ, N; SOUSA, A.O; ALVES, R.M; GUIMARO, C.M; CORDEIRO, C; BERNAL, M.F; ROSA, C.A; HEJNAR, J;

- LEONARDECZ, E; HECHT, M.M. **Trypanosoma cruzi in the Chicken Model: Chagas-Like Heart Disease in the Absence of Parasitism.** *PLoS Negl Trop Dis* 5(3): e1000, 2011.
192. TEIXEIRA, L. R. A; HECHT, M. M; GUIMARO, C. M; SOUSA, O. A; NITZ, N. **Pathogenesis of Chagas' Disease: Parasite Persistence and Autoimmunity.** *Clin Microbiol Rev.* 2012 July; 24(3): 592–630.
193. TEIXEIRA, A. R. L., NITZ, N., BERNAL, F. M., HECHT, M. M. **Parasite Induced Genetically Driven Autoimmune Chagas Heart Disease in the Chicken Model.** *J. Vis. Exp.* (65) .2012
194. TORRES, C. B. MARGARINOS: **Sobre a anatomia patológica da doença de Chagas.** *Mem. Inst. O. Cruz*, 36 (3): 391-404, 1941.
195. TREGASKES, C.; KONG, F.; PARAMITHIOTIS, E.; CHEN, C.; RATCLIFFE, M.; DAVISON, T.; YOUNG, J. **Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes.** *The Journal of Immunology*, v.154, n.9, p.4485-4494, 1995.
196. TYLER, K.M; ENGMAN D.M.. **The life cycle of Trypanosoma cruzi revisited.** *International Journal for Parasitology* 31 (2001) 472±481
197. VAINIO, O; KOCH, C; TOIVANEN, A. **B-L antigen (class II) of the chicken major histocompatibility complex controls T-B interaction.** *Immunogenetics* 19, 131-140.1984.
198. VANIO, O; VEROMAA, T; EEROLIN A, E; TOIVANEN, P; RATCLIFFE, M.J.H. **Antigen-Presenting cell – T interaction in the chicken is MHC class II antigen restricted.** *J. Immunol.* 140, 2864-2868,1988.
199. VEXENAT, AC. **Diagnóstico sorológico diferencial de infecções causadas por Trypanosoma cruzi, Leishmania (Viannia) braziliensis, Leishmania chagasi e outras doenças crônicas.** *Dissertação de mestrado*, Universidade de Brasília, 1993
200. VIANNA, GASPAR OLIVEIRA DE 1911 '**Sobre uma nova espécie de leishmânia (nota preliminar)**'. *O Brasil Médico*, nº 25, p. 411.
201. VILAS-BOAS F, FEITOSA GS, SOARES MBP, PINHO-FILHO JA, MOTA A, ALMEIDA AJG. **Bone Marrow Cell Transplantation to the**

Myocardium of a Patient with Heart Failure Due to Chagas' Disease. *Arq Bras Cardiol.* 2004; 82: 185-7

202. VINHAES, M.C.; DIAS, J.C.P. **Doença de Chagas no Brasil.** *Cadernos de Saúde Pública* 16. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, 2000. p. 7-12.
203. VOELKER R. **A century after Chagas disease discovery, hurdles to tackling the infection remain.** *JAMA.* 2009;302(10):1045-7.
204. WESTENBERGER, S.J; BARNABÉ, C; CAMPBELL, D.A; STURN, N.R. **Two hybridization events define the population structure of *Trypanosoma cruzi*.** *Genetics*, 171, p. 527 – 543, 2005.
205. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Control of Chagas disease.** *Technical Report Series* 905, p. 1-109. 2002.
206. ZIEGLER A, PINK J. R. L. **Chemical properties of two antigens controlled by the major histocompatibility complex of the chicken.** *J Biol Chem* 251: 5391–5396,1976.