

ARNALDO STELINI JUNIOR

RESISTÊNCIA À INFEÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* (CHAGAS, 1909):

I. A IMPORTÂNCIA DA RESPOSTA CELULAR NA FASE AGUDA
DA INFEÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do grau
de Mestre em Biologia (Imunologia).

CAMPINAS - SP

1986

ARNALDO STELINI JUNIOR

*Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo aluno Arnaldo Stelini Junior
e aprovada pela comissão julgadora.*

Campinas 14/11/86



RESISTÊNCIA À INFECÇÃO PELO *TRYPANOSOMA CRUZI* (CHAGAS, 1909):

**I. A IMPORTÂNCIA DA RESPOSTA CELULAR NA FASE AGUDA
DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL EM CAMUNDONGOS**

Tese apresentada ao Instituto de
Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do grau
de Mestre em Biologia (Imunologia).

Orientadores

Prof. Dr. Marcos Garcia Costa

Prof. Dr. Antonio Carlos Corsini

Departamento de Microbiologia e Imunologia
Instituto de Biologia
Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP)
Campinas, São Paulo

1986

A G R A D E C I M E N T O S

Aos Profs. Dr. Antonio Carlos Corsini, Dr. Marcos Garcia Costa e Luiz Sebastião Prigenzi, pela confiança, apoio, estímulo e orientação científica.

À Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Imunologia, pelo voto de confiança, e aos seus professores, pelos ensinamentos.

Aos colegas do Curso de Pós-Graduação e de laboratório, pela amizade e colaboração.

Ao pessoal técnico do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial à Sra. Ismália Menegon Donê, pelos cuidados com o Biotério.

A todos os que, direta ou indiretamente, tenham colaborado para a concretização deste trabalho.

As instituições abaixo relacionadas, pelos recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS (UNICAMP),
FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO (FAPESP),
CONSELHO DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E TECNOLÓGICO (CNPq),
COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DO ENSINO SUPERIOR (CAPS).

A B R E V I A T U R A S

B	Linfócitos tímicos independentes
FCR	Força centrífuga relativa (*)
F ₁	Camundongos (CBA x C ₅₇ Bl/10)F ₁
F ₁ B	Camundongos (CBA x C ₅₇ Bl/10)F ₁ timectomizados, irradiados e reconstituídos com células hepáticas fetais
F ₁ R	Camundongos (CB ₁ x C ₅₇ Bl/10)F ₁ irradiados e recons- tituídos com células hepáticas fetais
I.P.	intraperitonal
I.V.	intravenosa
LTN	linfócitos tímicos dependentes normais
LTI	linfócitos tímicos dependentes imunes
MME	meio mínimo essencial de Eagle
R	Roentgen
SI	soro ímune
SST	solução salina tamponada
T	linfócitos tímicos dependentes

$$(*) FCR = 1,118 \times 10^5 \times R \times N$$

R: Raio rotacional (distância em cm do eixo
central da centrífuga até a ponta do tubo)

N: velocidade em rotações por minuto

Í N D I C E

I. Introdução	1
II. Material e Métodos	8
2.1. Animais	8
2.2. <i>Trypanosoma</i>	8
2.3. Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	8
2.4. Parasitemia	9
2.5. Contagem de Células e Viabilidade Celular	9
2.6. Timectomia	10
2.7. Irradiação	10
2.8. Separação de Linfócitos com Lã de Náilon	10
2.9. Camundongos (CBA x C ₅₇ B1/10)F ₁ , Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais	12
2.10. Transferência Adotiva de Linfócitos	12
2.11. Soro Imune	13
III. Resultados	14
3.1. Parasitemia em Camundongos (CBA x C ₅₇ B1/10)F ₁	14

3.2. Infecção pelo <i>T. cruzi</i> de Camundongos Timectomizados, Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais	17
3.3. Infecção de Camundongos Timectomizados, Irrradiados, Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais e Tratados com Soro Imune (F ₁ B + SI)	18
3.4. Transferência Adotiva de Linfócitos Tímicos Dependentes Normais em Camundongos Timectomizados, Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais	21
3.5. Transferência Adotiva de Linfócitos Tímicos Dependentes e Soro Imune em Camundongos Timectomizados, Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais	22
3.6. Transferência Adotiva de Linfócitos Tímicos Dependentes Imunes	25
IV. Discussão	31
V. Conclusões	41
Referências Bibliográficas	42

I
I N T R O D U Ç Ã O

A doença de Chagas, primitivamente uma enzootia silvestre, apenas ocasionalmente acomete o homem, à medida que este se introduz nos nichos ecológicos originais (BARRETO, 1979).

O parasita se mantém na área endêmica através do ciclo vetor-hospedeiro. O vetor pertence à subfamília *Triatominae*, que elimina a forma infectante, junto com o material fecal, no momento em que se alimenta no hospedeiro (BARRETO, 1968a). Os hospedeiros de importância são: o homem e mamíferos domésticos e silvestres (BARRETO, 1968b).

A infecção humana por *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909) é um grave problema para o continente americano, particularmente para o Brasil. A doença, nos homens, apresenta grande importância, já que tem ampla distribuição geográfica, alta prevalência, altos índices de mortalidade (BARRETO, 1979) e, finalmente, limitadíssima terapêutica (CANÇADO & BRENER, 1979), fazendo com que a moléstia tenha elevado custo social.

Sob o aspecto clínico, a doença de Chagas pode ser observada em quatro fases distintas (WHO, 1974): incubação, aguda, indeterminada e crônica. A fase de incubação se caracteriza pela proliferação das formas amastigotas nos tecidos, com especial predileção para células do músculo cardíaco e do sistema fagocitário mononuclear, seguida da sua maturação em tripomastigotas (ANDRADE & ANDRADE, 1979). Ao ganharem o sangue periférico, as formas tripomastigotas caracterizam a fase aguda, momento em que o hospedeiro é acometido de febre, linfadenopatia generalizada e diminuição de suas reservas fisiológicas. Segue-se a fase indeterminada, com acentuada diminuição, ou mesmo negatificação, da parasitemia, quando então o paciente não se mostra clinicamente doente: ela pode durar dez ou mais anos para, finalmente, evoluir para a fase crônica, quando frequentemente se observam miocardite e dilatação das vísceras ocas (LARANJA et al., 1956, e KOBERLE, 1968).

Obscuro é o conhecimento dos fatores decisivos de evolução da fase indeterminada para a crônica, ainda que o hospedeiro mostre reações sorológicas positivas facilmente detectáveis por métodos de laboratório habituais (KOBERLE, 1968).

Na fase crônica, geralmente não se encontram, ao exame microscópico, parasitas no sangue periférico. Indivíduos com infecção chagásica podem ter então o diagnóstico da doença através de investigação sorológica, ou mesmo de alterações eletrocardiográficas (KOBERLE, 1968).

KOBERLE (1968) acredita que a evolução da doença de Chagas, da fase aguda para a indeterminada e desta para a crônica, seja decorrente das lesões originadas na fase aguda, já que a imunidade desenvolvida previne novas infecções agudas, mas não interrompe o curso da doença.

No que diz respeito à etiopatogenia, nessa doença, ainda não se tem consenso sobre os mecanismos determinantes, como se verá a seguir.

COSSIO et al. (1974) demonstraram a existência de anticorpos dirigidos a componentes da fibra cardíaca (E.V.I.). TEIXEIRA (1975) propôs a existência de hipersensibilidade do tipo tardio, dirigida a fibras do músculo cardíaco, decorrente de auto-sensibilização. Como expressões imunológicas de compartimentos diferentes, humoral e celular, são mecanismos que interpretam a miocardite frequentemente observada em pacientes cronicamente infectados, e descrita por LARANJA et al. (1956).

KOBERLE (1968) propôs a lesão de neurônios pela neurotoxina liberada da desintegração das formas amastigotas. Mais recentemente, KHOURY et al. (1979) demonstraram a existência, no decurso de uma infecção chagásica, de anticorpos dirigidos a neurônios, o que explicaria a dilatação das vísceras ocas, em especial do intestino grosso (LARANJA et al., 1956), pela destruição de neurônios e conseqüente perda de tonicidade do órgão.

Em especial, a resposta imune do hospedeiro, na doença de Chagas, tem sido intensamente estudada, principalmente em modelos experimentais.

As manifestações humorais da resposta imune apresentada pelo hospedeiro tiveram sua participação avaliada desde os estudos iniciais, por GUERREIRO & MACHADO (1913), com finalidades diagnósticas.

CULBERSTON & KOLODNY (1938) observaram que o soro de ratos sobreviventes de uma infecção chagásica aguda confere proteção parcial a receptores normais que, infectados, apresentaram uma infecção atenuada.

Os anticorpos de vários mamíferos apresentam *in vitro* ação lítica para as formas epimastigotas, enquanto as tripomastigotas e amastigotas intracelulares não sofrem tal efeito (MUNIZ & FREITAS, 1946, SANTOS-BUCH & TEIXEIRA, 1974).

Em camundongos, KIERSZEMBAUM & HOWARD (1976) demonstraram que os animais produtores de altos títulos de anticorpos, durante a infecção por *T. cruzi*, têm sobrevida maior que os de baixa capacidade de resposta humoral, e que estes últimos puderam ser protegidos, quando inoculados com anticorpos provenientes dos camundongos com maior capacidade de resposta humoral.

Camundongos tratados com soro anti *T. cruzi* tiveram a sobrevivência aumentada, quando comparados com os controles infectados nas mesmas condições (KAGAN & NORMAN, 1962; KIERSZEMBAUM & HOWARD, 1976).

Segundo TAKEHARA & MOTA (1979), os anticorpos protetores do soro imune de camundongos são "IgG_{2a}" e "IgG_{2b}".

KRETTLY & BRENER (1976) demonstraram *in vivo* que *T. cruzi* (cepa "Y") aglutinado por soro imune de camundongos sobreviventes de infecção aguda, teve sua infectividade diminuída quando inoculado em camundongos normais.

Posteriormente, KRETTLY & BRENER (1982) descreveram *in vitro* a lise de formas tripomastigotas por anticorpos mediada pela ativação do sistema complemento, com soro de camundongos cronicamente infectados. Todavia, é desconhecido o mecanismo de controle dos baixos níveis parasitêmicos *in vivo* observados nos camundongos produtores de altos títulos de anticorpos líticos. Concluíram os autores que somente camundongos que produzem anticorpos líticos são fortemente resistentes, não importando que produzam anticorpos detectáveis pelos métodos convencionais de imunofluorescência.

Quanto à imunidade celular, embora nosso atual conhecimento indique importante participação, não temos ainda estabelecido o preciso papel desempenhado na infecção chagásica.

Há aproximadamente trinta anos, TALIAFERRO & PIZZI (1955), ao estudarem a imunidade celular na doença de Chagas experimental, sugeriram importante participação desde compartimento imune, pois observaram grande redução do número de parasitas às custas de fagocitose e destruição parasitária.

A timentomia neonatal de camundongos (SCHMUÑIS et al., 1971) e o tratamento com soro antitímócito impedem o desenvolvimento de imunidade eficaz na infecção por *T. cruzi*, de forma que os hospedeiros apresentam sobrevida diminuída,

maior parasitemia e infecção tissular aumentada (HANSON, 1976). Resultados concordantes foram observados por ROBERSON et al. (1973) ao trabalhar com ratos timectomizados.

Transferência de células linfóides (ROBERSON & HANSON, 1974), provenientes de baços de ratos com infecção chagásica aguda, confere a receptores singênicos normais, aumento de sobrevivência e diminuição da parasitemia, quando infectados com *T. cruzi*.

Mais recentemente, REED (1980), transferindo populações linfocíticas de camundongos imunizados com formas epimastigotas de *T. cruzi*, para animais singênicos, encontrou maior proteção quando a população celular estava enriquecida de linfócitos tímicos dependentes (T). Ao serem infectados, os camundongos receptores apresentavam maior sobrevivência e menor parasitemia, quando comparados aos controles receptores de linfócitos tímicos independentes (B).

No que diz respeito à memória imunológica, BURGESS & HANSON (1980) observaram sua íntima relação com os T: esses autores demonstraram a proteção que tais linfócitos, provenientes de camundongos sobreviventes de infecção aguda por *T. cruzi*, conferem a animais normais, podendo tal efeito ser abolido após o tratamento da população linfocítica a ser transferida, com soro antitimócito.

Apesar do acúmulo de informações sobre a resposta imune frente a uma infecção chagásica em diferentes espécies animais, havia a necessidade de um modelo experimental capaz

de demonstrar as diferentes fases da infecção, tão próximo quanto possível da infecção natural.

Seguindo esta última proposta e considerando os camundongos, pelo baixo custo, facilidade de manuseio e manutenção, CORSINI et al. (1980) descreveram como modelo experimental da doença de Chagas, o uso de camundongos (CBA x C₅₇ B1/10)F₁ com inóculo de 10² formas sanguícolas de *T. cruzi* (cepa "Y"), onde se observaram com clareza as fases aguda e crônica da infecção chagásica.

Utilizando esse modelo, o presente trabalho tem como objetivo estudar a importância do compartimento celular da resposta imune de camundongos (CBA x C₅₇ B1/10)F₁ durante infecção por 10² *T. cruzi*.

Para tanto, os camundongos (CBA x C₅₇ B1/10)F₁ tiveram sua imunidade celular total ou parcialmente exaurida e no decurso da infecção chagásica observaremos a mortalidade e a parasitemia.

II MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Animais

Camundongos (CBA X C₅₇ B1/10)F₁, de ambos os sexos, criados e mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia da UNICAMP, utilizados aos três meses de idade, foram denominados camundongos F₁.

2.2. Tripanosoma

Trypanosoma (schizotrypanum) cruzi: Cepa "Y" (PEREIRA DA SILVA & NUSSEMZWEIG, 1953), cedida pelo Dr. Zigman Brener (Belo Horizonte), foi mantida em camundongos Swiss-55 com dois a três meses de idade, por inoculação intraperitoneal (I.P.), a cada sete dias, de 12×10^4 formas tripomastigotas, segundo instruções de BRENER (1968).

2.3. Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Os camundongos foram infectados por via intraperitoneal com cem formas, obtidas no pico parasitêmico de camun-

dongos Swiss-55 infectados com 10^5 parasitas. Após a sangria dos animais pelo plexo braquial, o sangue foi colocado em meio mínimo essencial (MME) contendo 1% de soro bovino fetal (SBF) e 10 UI/mililitro de heparina, mantendo-se a mistura em banho de gelo. Em seguida, os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e as diluições finais, realizadas em MME, de modo a se obterem cem parasitas em 0,2 ml.

2.4. Parasitemia

A contagem do número de parasitas foi efetuada segundo o método de BRENER (1968). Os camundongos foram sangrados mediante pequeno corte da extremidade da cauda: desprezando a primeira gota, o sangue foi coletado em pipeta de hemoglobina calibrada em nosso laboratório para coletar 5 mm^3 , colocado em lâmina de microscópio e coberto por lamínula de 22 x 22 mm, de tal maneira a se obter o sangue homogeneamente distribuído.

A preparação foi examinada em microscópio binocular com lente ocular de 12,5 e objetiva de 40 aumentos, contando-se os parasitas em cem diferentes campos microscópicos. Os camundongos foram marcados na pata traseira, de modo que a parasitemia pudesse ser seguida diariamente em cada um dos animais.

2.5. Contagem de Células e Viabilidade Celular

O número total de células das suspensões utilizadas foi obtido em câmara de Neubauer, diluindo-se a suspensão de células em ácido acético 1% para eliminar os eritrócitos.

As células inviáveis foram determinadas pela diluição em solução de azul-tripán preparada segundo M.G. COSTA, em 1982: 1 ml de azul-tripán (2 mg/ml), 0,25 ml de NaCl 4,25% e 1 ml de tampão fosfato pH 7,2.

2.6. Timectomia

Camundongos com trinta dias de idade foram timectomizados por incisão cirúrgica supra-esternal. O timo foi retirado com auxílio de pinça cirúrgica, e a cavidade torácica fechada com grampos metálicos (agrafes de Michel).

2.7. Irradiação

Os camundongos contidos em caixas plásticas foram irradiados com 850 R utilizando fonte de Co^{60} .

2.8. Separação de Linfócitos com Lã de Náilon

Lã de náilon manuseada com luvas de borracha, foi lavada por nove vezes em água bidestilada. Após secagem de lã, sempre com as mãos protegidas por luvas de borracha, pesou-se 0,6 g, que foi compactada em seringa hipodérmica de 10 cm³. O conjunto, rotulado como "coluna de lã de náilon", foi protegido com papel alumínio até seu emprego, para se evitar o empoeiramento.

Nesse momento, tais colunas foram encharcadas com solução salina tamponada (SST) contendo 5% de soro bovino

fetal e levadas a 37° durante 30 minutos, protegidas nas extremidades por rolhas de borracha, para evitar o dessecação.

Células esplênicas, obtidas a partir da fragmentação do baço em macerador de vidro, foram lavadas em MME uma vez e ressuspensas com cloreto de amônia (0,83%) durante cinco minutos para lise das hemácias. Comumente, utilizaram-se 40 ml de cloreto de amônia para seis baços normais ou três infectados.

O material foi centrifugado a 240 FCR, durante cinco minutos, e ressuspensão em SST-5% soro bovino fetal, de modo a se obterem 2×10^8 células/mililitro, e imediatamente levado para as colunas de náilon, na quantidade de 1 ml por coluna.

Após incubação a 37° C durante 45 minutos, procedeu-se à eluição, adicionando-se 20 ml de SST-5% soro bovino fetal, gota a gota, durante aproximadamente dez minutos.

O material eluído foi centrifugado a 240 FCR, por cinco minutos, e ressuspensão em SST-5% de soro bovino fetal, de modo a conseguir 2×10^8 células/mililitro.

A suspensão celular assim preparada foi colocada em nova coluna de náilon e o procedimento, repetido.

Os ensaios, com rendimento de 8 a 12% de células eluídas, estão de acordo com JULIUS et al. (1973), que mostram rendimento máximo de 10 a 15% com menos de 5% de contaminação de linfócitos tímicos independentes nas células eluídas das colunas.

2.9. Camundongos (CBA X C₅₇ B1/10)F₁, Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais

Camundongos (CBA X C₅₇ B1/10)F₁, com um mês de idade, foram timectomizados e, trinta dias após, irradiados (850 R) e imediatamente reconstituídos, por via intravenosa, com 10⁷ células hepáticas fetais (CHF) de camundongos (CBA X C₅₇ B1/10)F₁ com cerca de doze dias de vida intra-uterina (KLAUS & HUMPHREY, 1977). Os animais assim preparados foram denominados F₁B.

2.10. Transferência Adotiva de Linfócitos

Camundongos F₁B receberam diferentes quantidades de linfócitos tímicos dependentes, provenientes de baços de animais singênicos, após dupla separação em coluna de náilon.

Dois lotes de camundongos F₁B receberam 2 x 10⁷ e 4 x 10⁷ T provenientes de camundongos singênicos normais. A transferência sempre precedeu de trinta dias a infecção com 10² *T. cruzi*. Os lotes de camundongos foram denominados F₁B + 2 x 10⁷ LTN e F₁B + 4 x 10⁷ LTN.

Três outros lotes de camundongos F₁B receberam T oriundos de camundongos singênicos que sobreviveram por oito semanas a uma infecção chagásica. A transferência precedeu de sete dias a infecção com 10² *T. cruzi*. Os lotes assim preparados foram denominados F₁B + 10⁷ LTI, F₁B + 2 x 10⁷ LTI e F₁B + 4 x 10⁷ LTI.

A transferência das diferentes populações linfocitárias para os camundongos receptores, sempre foi feita por via intravenosa.

2.11. Soro Imune

Camundongos (CBA X C₅₇ Bl/10)F₁ sobreviventes de infecção chagásica foram, aos 56 dias, sangrados pelo plexo braquial. O sangue obtido foi mantido a 4-8° até a obtenção do soro que, após decomplexação (56° C por uma hora), foi mantido a -20° C até o momento de uso.

Rotularam-se (camundongos receptores do imunessoro) conforme sua nomenclatura de lote acrescida das letras SI (soro imune). Quando se utilizou soro proveniente de camundongos (CBA x C₅₇ Bl/10)F₁ normais nos controles, acrescentaram-se as letras SN na denominação do lote.

A inoculação sempre foi feita por via intravenosa; a partir do 49 dia de infecção, utilizando-se 0,2 ml de soro a cada dois dias.

III R E S U L T A D O S

3.1. Parasitemia em Camundongos (CBA x C₅₇ Bl/10)F₁

Com a finalidade de verificar o decurso da infecção com a cepa "Y" em camundongos (CBA x C₅₇ Bl/10)F₁, procuramos inicialmente estabelecer a curva parasitêmica nos animais infectados por via I.P., com cem formas de parasitas.

Conforme se pode observar na figura 1, a parasitemia foi detectada somente a partir do 7º dia, atingindo o pico parasitêmico no 11º. A partir do 13º dia, os animais controlaram a parasitemia, havendo poucos parasitas circulantes nos dias que se seguiram. Os animais apresentaram alta resistência ao inóculo, visto que o nível de sobrevivência foi de 100% aos 180 dias (Tab. 1).

TABELA 1. Mortalidade: Número de camundongos mortos/número de camundongos ensaiados

Camundongos	Dias de infecção				
	20	30	90	120	180
F ₁	0/19	0/19	0/19	0/19	0/19
F ₁ B	34/34	34/34	34/34	34/34	34/34
F ₁ B + SI	21/21	21/21	21/21	21/21	21/21
F ₁ B + 2x10 ⁷ LTN	17/17	17/17	17/17	17/17	17/17
F ₁ B + 4x10 ⁷ LTN	10/10	10/10	10/10	10/10	10/10
F ₁ B + SI + 2x10 ⁷ LTN	7/12	12/12	12/12	12/12	12/12
F ₁ B + 10 ⁷ LTI	3/14	3/14	3/14	3/14	3/14
F ₁ B + 2x10 ⁷ LTI	2/19	2/19	2/19	2/19	2/19
F ₁ B + 4x10 ⁷ LTI	1/11	1/11	1/11	1/11	1/11
F ₁ R	0/20	0/20	0/20	0/20	0/20

QUADRO 1. Valores dos pontos plotados na Figura 1. Representam a média geométrica com erro padrão da parasitemia observada nos camundongos F₁, F₁R e F₁B

Camundongos	Dias de infecção													
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
F ₁	Média	9,8	11,7	14,1	111,0	357,9	149,2	19,7	22,0	19,9	19,4	19,4	14,1	11,3
	Erro geométrica													
	Erro padrão	1,0	1,2	1,2	1,2	1,4	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,4
F ₁ R	Média	19,6	43,6	234,3	226,3	15,1	22,4	13,9	23,2	25,8	29,8	27,6	24,5	17,1
	Erro geométrica													
	Erro padrão	1,0	1,9	2,1	1,7	1,7	2,2	1,6	2,2	2,1	2,3	1,5	1,8	2,1
F ₁ B	Média	9,8	30,6	60,4	122,4	1503,5	2688,0	1238,5	844,5	1587,1	1460,8	405,5	611,8	
	Erro geométrica													
	Erro padrão	1,0	1,4	1,6	1,7	1,3	1,5	2,0	2,2	2,0	1,8	2,0	1,4	

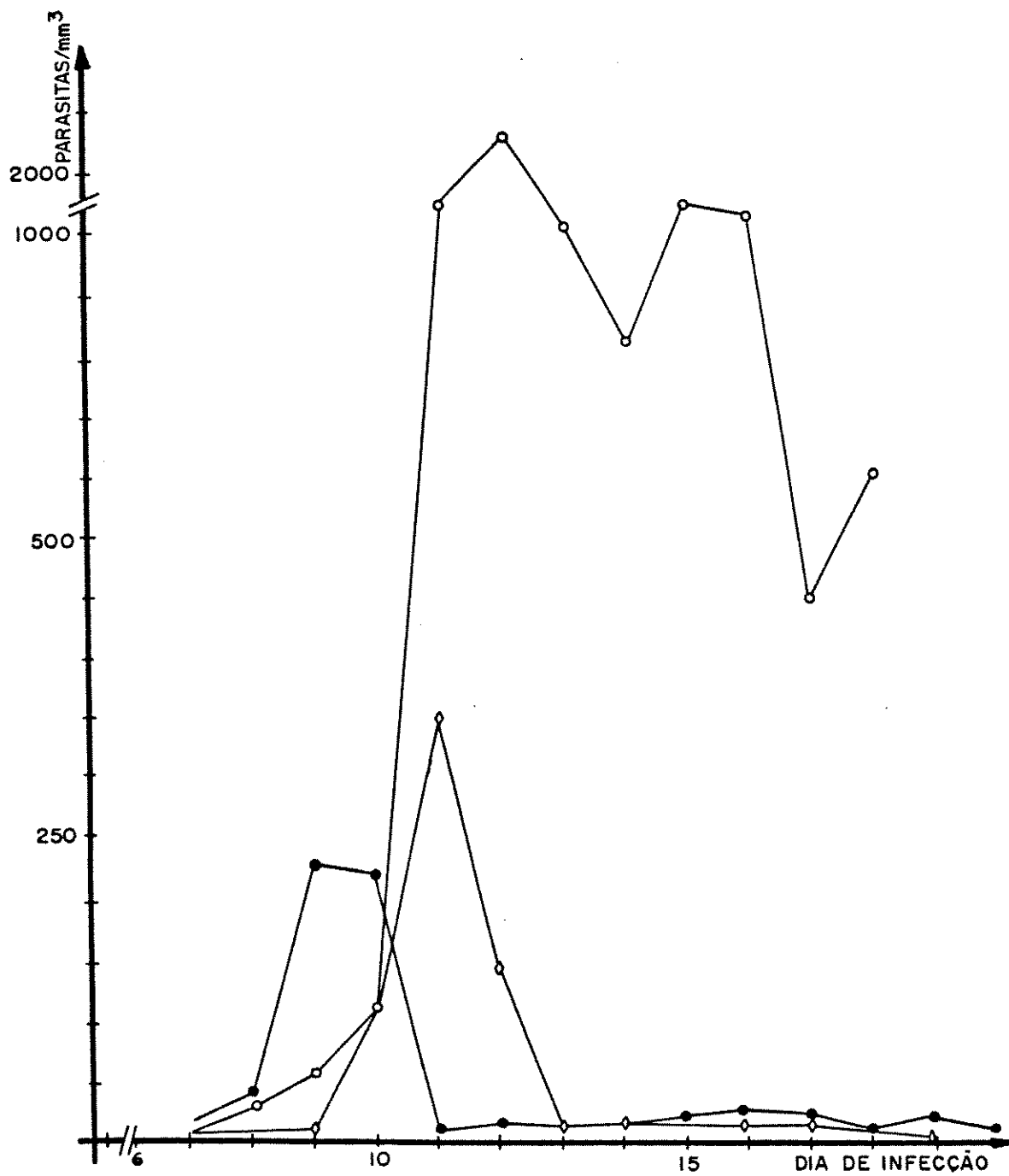


Figura 1. Parasitemia de camundongos (CBA x C₅₇ B1/10)F₁ normais (F₁:—◇—), irradiados e reconstituídos com células hepáticas fetais (F₁R:—●—), timectomizados e irradiados e reconstituídos com células hepáticas fetais (F₁B:—○—).

Tais resultados mostram a reprodutibilidade dos obtidos por CORSINI et al. (1980), que evidenciaram pico parasitêmico no 11º dia de infecção, com valor médio de 350 parasitas/milímetro³ e sobrevivência maior que 90%.

3.2. Infecção pelo *T. cruzi* de Camundongos Timectomizados, Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais

Com a finalidade de verificar a participação de *T* na resistência à infecção pelo *T. cruzi*, os camundongos F₁ foram timectomizados, irradiados subletalmente e reconstituídos com células hepáticas fetais singênicas (F₁B). Assim preparados, e decorridos trinta dias, foram infectados por via I.P., com 10² *T. cruzi*, e tiveram a parasitemia controlada diariamente.

De acordo com a figura 1, o encontro de parasitas no sangue periférico aconteceu no 7º dia de infecção e atingiu o pico parasitêmico no 12º dia, com 2.500 parasitas/milímetro³, portanto, cerca de oito vezes mais que o observado nos controles normais (F₁). Em seguida, houve controle dos níveis parasitêmicos, com mínimos de 400 a máximos de 1.000 parasitas/milímetro³ aproximadamente, até o 19º dia, quando se constatou 100% de óbito.

Como controle de irradiação, utilizaram-se camundongos F₁ irradiados subletalmente, nas mesmas condições dos

F₁B, mas não timectomizados e denominados F₁R: esses animais apresentaram sobrevivência de 100% e curva parasitêmica semelhante à dos F₁, verificando-se, porém, antecipação do pico e diminuição dos níveis parasitêmicos (Figura 1).

Em relação aos camundongos F₁, os F₁B e F₁R sempre apresentaram maior erro-padrão.

3.3. Infecção de Camundongos Timectomizados, Irradiados, Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais e Tratados com Soro Imune (F₁B + SI)

Considerando o efeito protetor do soro imune no decurso da infecção chagásica (TAKEHARA & MOTA, 1979), ensaiamos camundongos F₁B, que, após inóculo de 10² *T. cruzi*, receberam adotivamente, ao contrário dos F₁ e F₁B controles, 0,2 ml de SI por via I.V. a partir do 4º dia de infecção, a cada dois dias.

O encontro de parasitas circulantes iniciou-se no 8º dia de infecção, e o controle parasitêmico foi discreto, mas perceptível a partir do 13º dia.

Os camundongos F₁B + SI apresentaram pico parasitêmico no 12º dia, com valor aproximadamente cinco vezes menor, quando comparado ao apresentado pelos F₁B, conforme se pode notar na figura 2 e quadro 2.

QUADRO 2. Valores dos pontos plotados na Figura 2. Representam a média geométrica com erro padrão da parasitemia de camundongos F₁B que receberam adotivamente soro imune, dos camundongos F₁B e dos F₁

Camundongos	Dias de infecção												
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
Média	30,6	40,8	89,8	194,8	423,4	380,5	302,0	206,4	142,3	370,3			
F ₁ B + SI geométrica													
Erro padrão	1,5	2,0	1,8	3,0	1,6	1,4	1,3	1,3	1,9	2,0			
Média	9,8	30,6	60,4	122,4	1503,5	2688,0	1238,5	844,5	1587,1	1460,8	405,5	611,8	
F ₁ B geométrica													
Erro padrão	1,0	1,4	1,6	1,7	1,3	1,5	2,0	2,2	2,0	1,8	2,0	1,4	
Média	9,8	11,7	14,1	111,0	357,5	149,2	19,7	22,0	19,9	19,4	19,4	14,1	11,3
F ₁ geométrica													
Erro padrão	1,0	1,2	1,2	1,2	1,4	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,4

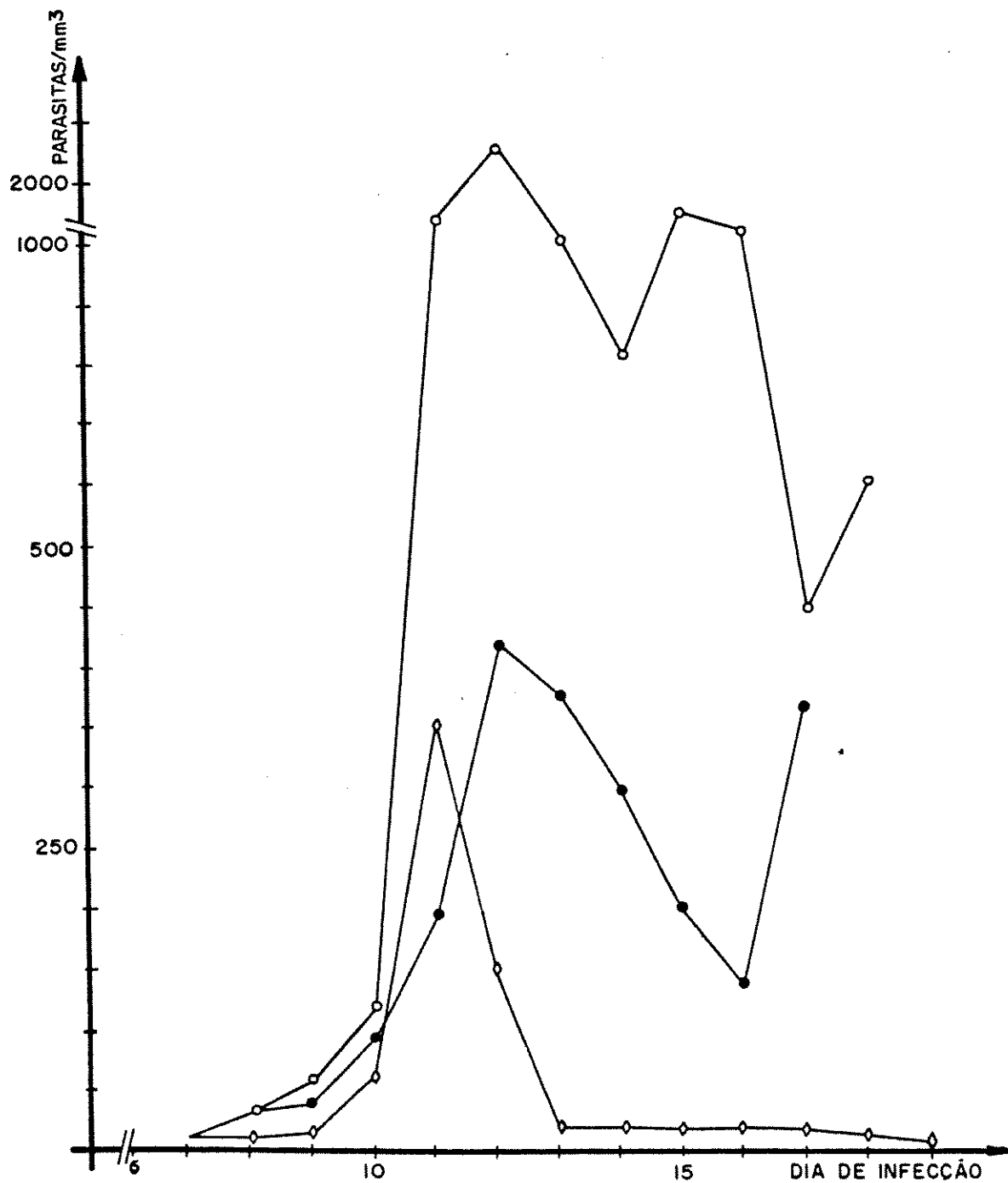


Figura 2. Parasitemia em camundongos (CBA x C₅₇ Bl/10)F₁ timectomizados e irradiados e reconstituídos com células hepáticas fetais (F₁B:—●—) receptores de soro imune. As parasitemias dos camundongos (F₁B:—○—) e (F₁:—◇—) são controles e servem para melhor comparação.

O soro imune conferiu aos camundongos F₁B proteção parcial perante a infecção chagásica, pois não restaurou a resistência natural que possuem os F₁, já que constatamos mortalidade de 100% aos 20 dias de infecção.

Quanto ao erro-padrão, observamos maior homogeneidade quando comparado ao dos controles F₁B.

3.4. Transferência Adotiva de Linfócitos Tímicos Dependentes Normais em Camundongos Timectomizados, Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais

Considerando que os camundongos F₁B foram suscetíveis à infecção de 10² *T. cruzi*, transferimos a estes animais diferentes quantidades de **T** obtidas em F₁ normais.

Para tanto, suspensões celulares esplênicas de camundongos F₁ normais foram processadas através de dupla separação em coluna de lã de náilon. Em seguida, os **T** foram transferidos aos receptores F₁B, que, após quatro semanas, receberam inóculo de 10² *T. cruzi*.

O lapso de tempo entre a transferência de linfócitos e inóculo do parasita foi observado para permitir acomodação e eventualmente maturação das populações linfocíticas transferidas.

Os camundongos F₁B receberam diferentes quantidades de linfócitos tímicos dependentes normais (LTN) e foram rotulados de acordo com o inóculo da seguinte forma: F₁B + 2 x 10⁷ LTN e F₁B + 4 x 10⁷ LTN.

Os períodos pré-patentes observados nesses dois lotes foram de seis dias.

Os $F_1B + 2 \times 10^7$ LTN tiveram am pico parasitêmico no 11º dia de infecção, assim como os F_1 controles, mas com valor cerca de três vezes maior.

Nos camundongos $F_1B + 4 \times 10^7$ LTN, o pico parasitêmico foi observado no 9º dia, com valor muito próximo e controle do nível muito semelhante ao dos F_1 controles, como indica a figura 3 e quadro 3.

Todavia, apesar da proteção parcial conferida aos F_1B , constatada pelo maior controle parasitêmico, a transferência adotiva de T normais não foi capaz de restaurar a resistência à infecção dos F_1 , já que foi observada mortalidade de 100% aos vinte dias de infecção.

Comparativamente aos F_1 , o erro-padrão dos níveis parasitêmicos sempre foi maior.

3.5. Transferência Adotiva de Linfócitos Tímicos Dependentes e Soro Imune em Camundongos Tímectomizados, Irrradiados e Reconstituídos com Células Hepáticas Fetais

Camundongos F_1B , ao receberem linfócitos normais ou soro imune, foram suscetíveis à infecção por *T. cruzi*, ao contrário dos seus originadores F_1 .

Com o intuito de avaliar o efeito das duas transferências, quando executadas simultaneamente, transplantamos

QUADRO 3. Valores dos pontos plotados na Figura 3. Representam a média geométrica com erro padrão da parasitemia dos camundongos F₁B que receberam diferentes quantidades de linfócitos tímicos dependentes normais e dos F₁

Camundongos	Dia de infecção												
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
F ₁ B + 2x10 ⁷ LTN	Média geométrica	13,4	154,5	705,7	886,5	955,7	258,7	242,0	380,1	153,9	84,1		
	Erro padrão	1,3	1,7	1,5	1,4	1,6	3,1	2,7	2,2	1,4	1,2		
F ₁ B + 4x10 ⁷ LTN	Média geométrica	11,2	149,1	428,9	236,4	37,8	16,3	14,2	67,8	27,0	39,2	24,0	
	Erro padrão	1,8	1,4	1,4	1,5	1,5	1,2	1,2	1,9	1,6	1,3	1,2	
F ₁	Média geométrica	9,8	11,7	14,1	111,0	357,5	149,2	19,7	22,0	19,9	19,4	14,1	11,3
	Erro padrão	1,0	1,2	1,2	1,2	1,4	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,2	1,4

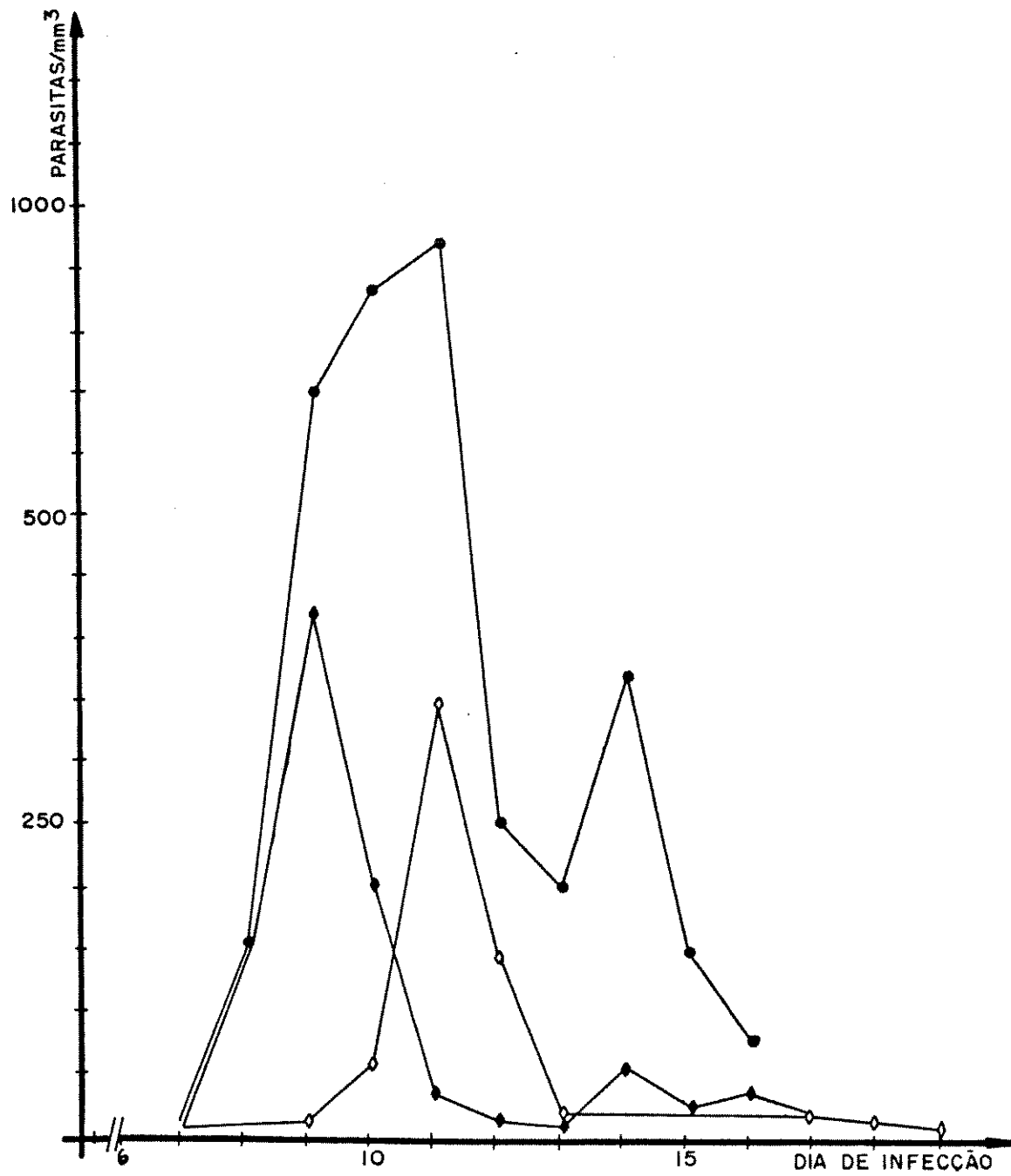


Figura 3. Parasitemia de camundongos F₁B que receberam previamente diferentes quantidades de linfócitos tímicos normais (F₁B + 2 x 10⁷ LTN: —●— e F₁B + 4 x 10⁷: —◆—) e de (F₁: —◇—).

2×10^7 LTN em camundongos F_1B , que, após quatro dias de infecção por *T. cruzi*, receberam 0,2 ml de soro imune, por via I.V., a cada dois dias.

Houve um período pré-patente de seis dias e pico parasitêmico no 10º dia, com valor aproximadamente quatro vezes menor em relação aos F_1B .

Comparativamente aos F_1 , controles, o pico parasitêmico foi menor, como se observa na figura 4 e quadro 4.

A transferência adotiva simultânea de linfócitos tímicos normais e soro imune conferiu proteção aos F_1B , sem, no entanto, restituir-lhes a resistência dos F_1 . A taxa de mortalidade de 60% dos animais deu-se no 20º dia de infecção e de 100% somente no 30º dia.

O erro-padrão observado neste experimento, quando comparado com o F_1 controle, foi sempre maior.

3.6. Transferência Adotiva de Linfócitos Tímicos Dependentes Imunes

Considerando que os camundongos F_1B não tiveram a resistência natural dos F_1 restaurada, apesar das transferências adotivas de linfócitos normais e/ou soro imune, no presente experimento transferimos T imunes (LTI), provenientes de camundongos sobreviventes de infecção chagásica.

QUADRO 4. Valores dos pontos plotados na Figura 4. Representam a média geométrica com erro padrão da parasitemia dos camundongos F₁B que receberam linfócitos tímicos dependentes normais e soro imune e dos camundongos F₁

Camundongos	Dias de infecção													
	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
F ₁ B + SI + 2x10 ⁷ LTN	Média geométrica	16,9	154,3	102,9	192,6	157,8	112,3							
	Erro padrão	1,4	2,1	1,9	2,0	2,9	2,4							
F ₁	Média geométrica	9,8	11,7	14,1	111,0	357,5	149,2							
	Erro padrão	1,0	1,2	1,2	1,2	1,4	1,2							
F ₁ B + SI + 2x10 ⁷ LTN	Média geométrica	54,8	25,8	30,0	15,6	23,2	19,6	22,4	30,6					
	Erro padrão	1,8	1,3	1,8	1,4	1,9	1,6	1,9	2,0					
F ₁	Média geométrica	19,7	22,0	19,9	19,4	19,4	14,1	11,3						
	Erro padrão	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,4						

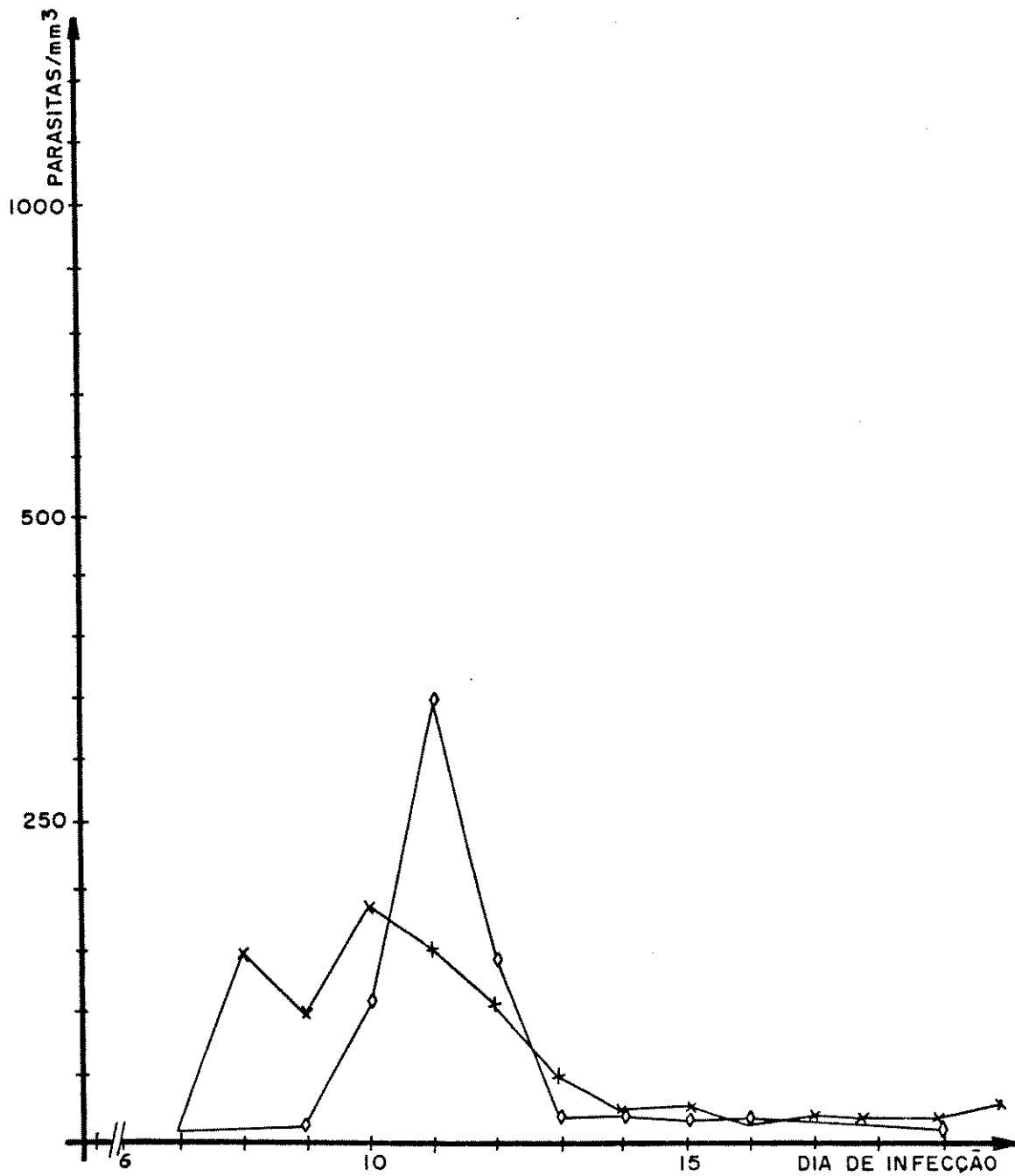


Figura 4. Parasitemia dos camundongos F₁B receptores de linfócitos tímicos dependentes normais e de soro imune (—x—). Como controle valores de parasitemia em (F₁:—o—) infectados nas mesmas condições experimentais.

Diferentes lotes de F₁B foram rotulados conforme a quantidade de LTI transferida, a saber: F₁B + 10⁷ LTI, F₁B + 2 x 10⁷ LTI e F₁B + 4 x 10⁷ LTI

O período pré-patente de quatro dias foi observado nos camundongos F₁B + 2 x 10⁷ LTI e o de seis dias, nos F₁B + 10⁷ LTI e F₁B + 4 x 10⁷ LTI.

Quanto ao pico parasitêmico, os camundongos que receberam 10⁷ LTI, 4 x 10⁷ LTI e 2 x 10⁷ LTI, apresentaram-no, respectivamente, no 9º, 10º e 11º dia de infecção.

Após o pico parasitêmico, sempre com valores menores que o dos F₁ controles, os lotes ensaiados apresentaram imediato controle da parasitemia (figura 5 e quadro 5).

A taxa de mortalidade aos 90 dias de infecção foi de aproximadamente 10% nos lotes que receberam 2 x 10⁷ e 4 x 10⁷ LTI, e de 20% nos receptores de 10⁷ LTI.

O erro-padrão dos três lotes ensaiados mostrou-se sensivelmente mais homogêneo quando comparado aos F₁B.

Além da proteção conferida aos camundongos F₁B, perceptível através do eficiente controle da parasitemia, a transferência adotiva de linfócitos tímicos imunes restaurou aos F₁B receptores a resistência peculiar dos F₁ perante a infecção chgásica por 10² *T. cruzi*.

QUADRO 5. Valores dos pontos plotados na Figura 5. Representam a média geométrica com erro padrão da parasitemia dos camundongos F₁B que receberam diferentes quantidades de linfócitos tímicos dependentes imunes e dos F₁

Camundongos	Dias de infecção														
	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
F ₁ B + 10 ⁷ LTI	Média	14,8	74,5	315,8	320,9	125,5	59,9	26,0	24,3	17,4	11,5	12,3	9,8		
	geométrica														
	Erro padrão	1,2	1,5	1,4	1,3	1,6	1,6	1,7	1,5	1,2	1,3	1,1			
F ₁ B + 2x10 ⁷ LTI	Média	9,8	9,8	29,8	87,8	100,1	53,4	207,2	81,4	54,5	56,9	60,2	27,7		
	geométrica														
	Erro padrão	1,0	1,0	2,1	2,5	2,2	1,6	1,5	2,1	1,9	2,1	2,1	1,6		
F ₁ B + 4x10 ⁷ LTI	Média	13,8	160,8	201,0	59,7	36,9	13,8	14,1							
	geométrica														
	Erro padrão	1,4	2,2	1,5	1,8	1,8	1,3	1,4							
F ₁	Média	9,8	11,7	14,1	111,0	357,5	149,2	19,7	22,0	19,9	19,4	14,1	11,3		
	geométrica														
	Erro padrão	1,0	1,2	1,2	1,2	1,4	1,2	1,2	1,3	1,3	1,3	1,3	1,2	1,4	

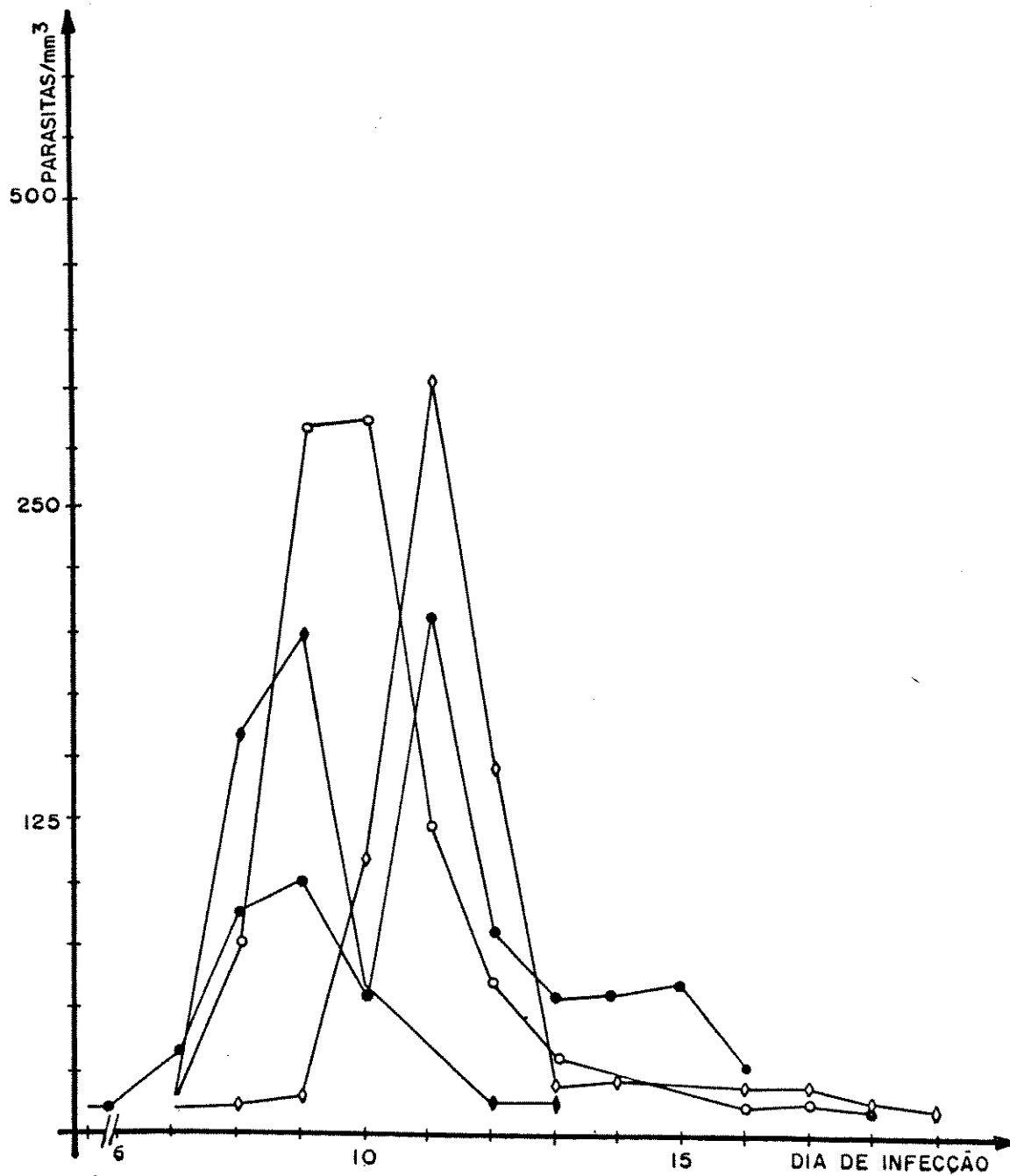


Figura 5. Parasitemia de camundongos F₁B que receberam diferentes quantidades de linfócitos tímicos imunes (F₁B + 10⁷ LTI: —○—, F₁B + 2 x 10⁷ LTI: —●—, F₁B + 4 x 10⁷ LTI: —◆—) e de camundongos (F₁: —◇—).

IV DISCUSSÃO

Nossos experimentos evidenciaram que camundongos timectomizados, irradiados e reconstituídos com células hepáticas fetais, portanto com população T drasticamente exaurida, não foram capazes de controlar uma infecção por *T. cruzi*: apresentaram grande parasitemia e alta mortalidade, ao contrário de seus originadores (CBA x C₅₇ Bl/10)F₁, que, nas mesmas condições experimentais, revelaram efetivo controle dos níveis parasitêmicos e baixa mortalidade (CORSINI et al., 1980).

De imediato, pudemos inferir que a população T é imprescindível na resposta primária de uma infecção chagásica experimental, em camundongos.

Nossa conclusão, a partir do modelo experimental proposto, encontra sólido respaldo na literatura especializada, como veremos a seguir.

TALIAFERRO & PIZZI (1955), apoiados em estudos morfológicos, indicaram que a resistência de murinos a uma infecção chagásica é principalmente mediada por células.

Camundongos com imunidade celular diminuída, quer congenitamente (TRISCHMANN et al., 1978), quer através de timectomia neonatal (SCHMUÑIS et al., 1971), ou mesmo tratados com soro antitimócito (ROBERSON, 1974), apresentam um aumento nos níveis parasitêmicos e mortalidade quando comparados com os normais.

Mais recentemente, BURGESS & HANSON (1980), descrevendo modelo semelhante ao do presente trabalho, utilizando camundongos C₅₇ B1/6J, timectomizados, irradiados e reconstituídos com medula óssea singênica, concluíram que a resposta primária, em murinos, depende intensamente dos T. Segundo aqueles autores, a exaustão da população linfocítica tímica dependente permitia um aumento nos níveis parasitêmicos e uma diminuição da sobrevivência dos camundongos infectados por *T. cruzi*.

Apesar de o trabalho não se propor ao estudo da forma de participação dos linfócitos tímicos na resposta imune primária, pelo menos três sugestões podem ser discutidas.

Primeiramente, os linfócitos tímicos considerados como efetores da resposta imune (SANTOS-BUCH & TEIXEIRA, 1974), ao apresentarem um efeito lítico maior sobre células parasitadas por *T. cruzi*.

O segundo mecanismo de participação seria através da ativação de macrófagos, tendo como mediadores linfoquinas (NOGUEIRA & COHN, 1977), de forma que, quando ativados, pudessem destruir os parasitas intracelulares, ao contrário

dos macrófagos normais, que, impotentes diante da reprodução do parasita, são destruídos (NOGUEIRA & COHN, 1976), caracterizando um modelo semelhante ao descrito por JONES et al. (1972) para a toxoplasmose.

Como terceira proposta de participação dos **T**, lembramos a cooperação com **B** para a produção de anticorpos (KATZ, 1982), ainda que saibamos serem os camundongos exauridos de linfócitos **T** (F_1B) capazes de produzir anticorpos suficientes para o controle parasitêmico (SCHMUÑIS et al., 1971).

Entretanto, temos evidências experimentais de que a cooperação de linfócitos **T** e **B**, no que diz respeito à produção de anticorpos, não foi fator determinante na resistência dos camundongos F_1 diante de inóculo de 10^2 *T. cruzi*. Como se observa na figura 2, a transferência adotiva de soro imune não restaurou aos F_1B receptores a resistência dos seus originadores (CBA x C_{57} Bl/10) F_1 .

Restou-nos atribuir ao compartimento humoral na resposta imune primária um relevante papel no controle dos parasitas, provavelmente por mecanismos conhecidos: efeito opsonizante, citotoxicidade auxiliada pelo sistema complemento (HANSON, 1976) e citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos (OKABE et al., 1980). Essa posição concorda com a observação de PIZZI et al. (1950) que o compartimento humoral da resposta imune numa infecção chagásica não é fator determinante na resistência de camundongos.

Nossos resultados, embora se mostrassem de acordo com o descrito efeito protetor dos anticorpos na infecção

por *T. cruzi*, conforme relataram KRETTLI & BRENER (1976) e TAKEHARA & MOTA (1979), pois controlaram efetivamente a parasitemia, são conflitantes com os obtidos por BRAZ (1981) em nossos laboratórios.

Segundo essa autora, a resistência de camundongos a uma infecção chagásica é dependente do título de anticorpos encontrados já na fase pré-patente da infecção. Todavia, o conflito estabelecido poderá ser aclarado se considerarmos que, no próprio trabalho de BRAZ (1981), os camundongos "Biozzi", apesar de apresentarem os mais altos títulos de anticorpos, também detinham índice de mortalidade maior quando comparados com os (CBA x C₅₇B1/10)F₁.

Consideremos, ainda, que no trabalho de BRAZ (1981), a técnica para a detecção de anticorpos foi a de imunofluorescência indireta, o que, segundo KRETTLI & BRENER (1982) não nos autoriza a inferir conclusões seguras, pois alguns esquemas de vacinação comprovadamente ineficazes produzem anticorpo-gênese com títulos comparáveis aos observados em uma infecção chagásica aguda.

KRETTLI & BRENER (1982) responsabilizaram os anticorpos líticos para tripomastigotas, detectáveis na fase crônica por técnicas de lise mediada por complemento, pelos baixos níveis parasitêmicos e resistência dos camundongos a uma infecção por *T. cruzi*.

Resumindo, temos evidências de que o papel dos linfócitos tímicos dependentes, na resistência de camundongos a

uma infecção chagásica, possa não ser somente o de auxiliar na anticorpo-gênese, mas também estarem envolvidos como efetores da resposta imune.

Em consequência dos três mecanismos de ação dos T anteriormente apresentados, restava-nos analisar, dentro da proposta do parágrafo anterior, a sua participação como efetores da resposta imune, o que não foi feito, pois nos ativemos tão somente ao caráter de imprescindibilidade.

Colocada a importância dos linfócitos tímicos na imunidade desenvolvida pelos camundongos F_1 diante de uma infecção por *T. cruzi*, os experimentos que se seguiram tiveram por objetivo reconstruir a capacidade funcional dos camundongos F_1B através da transferência adotiva de T.

A tentativa de restauração dos F_1B com linfócitos tímicos normais mostrou-se ineficaz, pois os diferentes lotes de camundongos não resistiram a uma infecção por 10^2 *T. cruzi*, como era nossa expectativa.

Com certeza, esta última observação não se deveu a componentes radiosensíveis. A transferência de células hepáticas fetais para camundongos (CBA x C_{57} Bl/10) F_1 irradiados, mas não timectomizados (F_1R), restaurou completamente a resistência ante uma infecção por 10^2 *T. cruzi*.

Períodos longos, como sessenta dias, foram respeitados entre a transferência de linfócitos normais tímicos dependentes e a infecção, para que afastássemos uma possível maturação insuficiente da população celular transplantada.

Todavia, o cuidado se mostrou completamente ineficiente no tocante à restauração da resistência dos F₁B à infecção por *T. cruzi*.

Conforme figura 3, os níveis parasitêmicos dos F₁B receptores de LTN foram sempre menores que os dos F₁B e, entre aqueles, o que recebeu população linfocítica maior.

Entendemos que, por serem os camundongos exauridos de linfócitos tímicos dependentes capazes de produzir anticorpos durante infecção chagásica (SCHMUNIS et al., 1971), o lote que recebeu quantidade maior de linfócitos teve um contingente maior de T auxiliares envolvidos na anticorpo-gênese (BURGESS et al., 1981).

Ainda com relação ao insucesso obtido na transferência adotiva de T normais para a restauração da resistência dos F₁B, colocamos a possibilidade de ser devido à falta de alguma subpopulação linfocítica indispensável para o sucesso esperado.

Pelo menos no tocante à quantidade, a partir do mace-rado de baço, obtivemos rendimento de 8 a 12% de T, quando sabemos existir no órgão em torno de 20% (BURGESS & HANSON, 1980), o que nos possibilita suspeitar que a referida diferença fique por conta de uma ou mais subpopulações tímicas dependentes.

A sobrevida dos camundongos ensaiados mostrou-se discretamente aumentada aos vitne dias de infecção, ocorrendo o óbito de todos os animais aos trinta dias.

Admitimos que o pequeno incremento na sobrevivência dos camundongos $F_1B + 2 \times 10^7$ LTN + SI seja devido ao maior controle da parasitemia, que diminuiu a velocidade de infecção tissular (HANSON & ROBERSON, 1974), particularmente dos órgãos nobres.

Reforçando nossa posição, pudemos constatar que a falência em restaurar a resistência dos camundongos F_1B com LTN não está relacionada à anticorpopogênese na fase primária, dado que a transferência simultânea de soro imune, apesar do excelente desempenho no controle parasitêmico, não mudou de forma significativa a taxa de mortalidade dos F_1B (Tabela 6).

Observamos que a transferência adotiva de linfócitos T normais não foi suficiente para permitir uma adequada indução e/ou efetivação no compartimento celular, possivelmente responsável pela determinação do fator resistência dos camundongos F_1 durante uma infecção primária por 10^2 *T. cruzi*.

Na última série de experimento, ao utilizarmos T imunes, ou seja, provenientes dos camundongos sobreviventes de infecção chagásica, obtivemos nos F_1B a restauração de sua capacidade de sobrevivência a um inóculo de 10^2 *T. cruzi*.

O resultado foi amplamente concordante com o nosso atual conhecimento e particularmente com trabalhos de BURGESS & HANSON (1980) e REED (1980), que obtiveram, em camundongos, resistência à infecção por meio da transferência de linfócitos imunes caracterizados como tímicos dependentes.

Nossos experimentos evidenciaram uma relação inversa entre o número de células imunes transplantadas e o nível parasitêmico: o lote de camundongos F₁B, que maior número de **T** recebeu, apresentou os menores níveis parasitêmicos, sem, no entanto, modificar as taxas de mortalidade, que se mostraram muito semelhantes às dos F₁ utilizados como controles.

Pela figura 5, representativa da parasitemia nos camundongos F₁B, que receberam adotivamente **T** imunes, os níveis parasitêmicos sempre foram menores que os dos F₁ controles.

Se considerarmos ainda a antecipação do pico parasitêmico e a precoce negatização da parasitemia, em relação aos F₁, teremos como conclusão que a memória imunológica está intimamente relacionada aos **T**. Somente camundongos receptores de linfócitos com memória imune para infecção por *T. cruzi* poderiam de forma antecipada, relativamente aos controles, apresentar em qualidade e quantidade melhor controle da parasitemia.

Todavia, a sobrevivência dos F₁B receptores de **T**, imunes aos 20 dias de infecção por *T. cruzi*, não alcançou o valor observado nos F₁, 100%, o que é perfeitamente justificável pelos erros operacionais com os F₁B e pelas condições de manutenção dos animais, frequentemente acometidos de infecções bacterianas.

Comparando as figuras de transferências de LTN + SI e LTI, verifica-se que o controle da parasitemia foi igualmente eficiente, mas que os dois experimentos divergem radicalmente no tocante à taxa de mortalidade (Tabela 1).

Enquanto os F₁B receptores de LTN + SI apresentaram 100% de mortalidade aos vinte dias de infecção, os de LTI a tiveram de 20% no máximo.

Se o compartimento humoral, portanto, é suficiente para o controle parasitêmico, temos evidências de que essa atividade funcional não determina a resistência dos camundongos F₁ perante um inóculo de 10² *T. cruzi*.

Por fim, colocamos nossa posição de que, a despeito dos fatores inerentes aos hospedeiros e parasitas, a resistência de camundongos a uma infecção por *T. cruzi* tem como fator determinante a presença de um adequado aparato celular do sistema imune, ainda na resposta primária, podendo mesmo ser este o fator determinante do caráter resistência observado em algumas cepas de camundongos.

V
C O N C L U S Õ E S

1. A imunidade celular é imprescindível na modulação da resposta primária de murinos, diante de uma infecção por *T. cruzi*.
2. A imunidade humoral não restaura em camundongos exauridos de linfócitos T (F₁B) a resistência de seus originadores F₁, em que pese o eficiente controle da parasitemia durante a fase aguda da infecção.
3. A memória imunológica, na infecção chagásica experimental em camundongos, está relacionada aos linfócitos tímicos dependentes.
4. A imunidade celular é fator determinante da resistência de camundongos infectados por *T. cruzi*, durante a fase aguda, além de sua possível participação na anticorpo gênese.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDRADE, S.G. & ANDRADE, Z.A. Patologia da doença de Chagas experimental de longa duração. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 10:180-187, 1968.
- ANDRADE, Z.A. & ANDRADE, S.G. Patologia. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z., ed. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1979. p. 199-248.
- BARRETO, M.P. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. In: CANÇADO, J.R., ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968a. p. 163-188.
- _____. Transmissores do *Trypanosoma cruzi*: Triatomíneos. In: CANÇADO, J.R., ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968b. p. 189-224.
- _____. Epidemiologia. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z., ed. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1979. p. 89-151.

- BRAZ, R.F.S. Resistência na infecção pelo *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909): I. A importância da resposta humoral no período pré-patente da infecção experimental em camundongos. Tese de Mestrado apresentada ao Departamento de Imunologia e Microbiologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, SP, Brasil, 1981 Mimeo.
- BRENER, Z. Terapêutica experimental. In: CANÇADO, J. R., ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte. Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p. 501-516.
- BURGESS, D.E. & HANSON, W.L. *Trypanosoma cruzi*. The T-Cell dependence of the primary immune response and the effects of depletion of T-cells and Ig-Bearing cells on immunological memory. *Cell Immunol.*, 52:176-186, 1980.
- _____, KUHM, R.E. & CARLSOM, K. Induction of Parasite Specific Helper T - Lymphocytes During *Trypanosoma cruzi* Infections in mice. *The Journal of Immunology* 127(5):2092-2095, 1981
- CANÇADO, J.R. & BRENER, Z. Terapêutica. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z., ed. *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro, Guanabara-Koogan, 1979. p. 362-424.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1:159-218, 1901.
- CORSINI, A.C., COSTA, M.G., OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & STELINI JR., A. Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Revta. Inst. Med. trop. São Paulo*. 22:192-196, 1980.

- COSSIO, P.M.; LAGUEMS, R.P.; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; SEGAL, A. & ARAMA, R.M. Chagasic cardiopathy antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*, **50**:1252-1259, 1974.
- CULBERTSON, B.L. & KOLODNY, M.H. Acquired immunity in rat against *Trypanosoma cruzi*. *J. Parasitol.*, **24**:83-90, 1938.
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na moléstia de Carlos Chagas como elemento diagnóstico. *Brasil-med.*, **27**:225-226, 1913.
- HANSON, W.L. Immunology of American Trypanosomiasis (Chagas' Disease). In: COHEN, S. & SADUN, E.H., ed. *Immunology of Parasitic Infections*. Edinburgh, Great Britain, Blackwell Scientific Publications, 1976. p. 222-234.
- _____. & ROBERSON, E.L. Density of Parasites in various organs and the relation to Numbers of Trypomastogotes in the Blood during Acute Infections of *Trypanosoma cruzi* in Mice. *J. Protozool.*, **21**:512-517, 1974.
- JONES, T.C., YEH, S. & HIRSCH, J.G. The interaction between Toxoplasma and mammalian cells. Mechanisms of entry and fate of the intra-cellular parasite. *J. Exp. Med.*, **136**:1157-1172, 1972.
- JULIUS, M.H., SIMPSON, E. & HERZEMBERG, L.A. A rapid method for the isolation of functional thymus derived murine lymphocytes. *Eur. J. Immunol.*, **3**:645-649, 1973.

- KAGAN, J.G. & NORMAN, L. Immunological studies on *Trypanosoma cruzi*. IV. Serial transfer of organism from immune to non immune mice. *J. Parasitol.*, **48**:584-588, 1962.
- KATZ, D.H. The Immune System: an overview. In: Stites, D.P., Stobo, J.D., Fudenberg, H.H. & Wells, J.V., ed. *Basic & Clinical Immunology*. Los Altos - USA, 1982, p. 13-20.
- KIERSZEMBAUM, F. & HOWARD, J.C. Mechanisms against experimental *T. cruzi* infections: the importance of antibodies and antibodyforming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.*, **116**:1208-1211, 1976.
- KLAUS, G.G.B. & HUMPHREY, J.H. The generation of memory cells. I. The role of C₃ in generation of B memory cells. *Immunology*, **33**:33-41, 1977.
- KHOURY, E.L.; RITACCO, V.; COSSIO, P.M.; LAGUEMS, R. P.; SZARFMAN, A.; DIEZ, C. & ARAMA, R.M.; Circularizing antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas'disease). *Clin. Exp. Immunol.*, **36**:8-12, 1979.
- KOBERLE, F. Patogenia da Moléstia de Chagas. In: Cançado, J.R., ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p. 238-260.
- KRETTLI, A.V. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.*, **116**:755-760, 1976.

- KRETTLI, A.V. & BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living Trypomastigote antibodies. *J. Immunol.*, **126**:2009-2012, 1982.
- LARANJA, F.S.; DIAS, E.; NOBREGA, G. & MIRANDA, A. Chagas disease. A clinical, epidemiologic and pathologic study. *Circulation*, **14**:1035-1060, 1956.
- MUNIZ, J. & FREITAS, G. de. Estudos sobre a imunidade humoral na doença de Chagas. *Brasil Med.*, **60**:337-341, 1946.
- NOGUEIRA, M. & COHN, Z.A. *Trypanosoma cruzi*: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. *J. Exp. Med.*, **143**:1402-1413, 1976.
- ; GORDON, S. & COHN, Z.A. *Trypanosoma cruzi*: modification of macrophage function during infection. *J. Exp. Med.*, **146**:157-171, 1977.
- OKABE, K.; KIPNIS, T.L.; GALICH, V.L.G. & DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I. Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to tripomastigote blood stream form. *Clin. Immunol. Immunopathol.*, **16**:344-352, 1980.
- PEREIRA DA SILVA, L.H. & NUSSEMZWEIG, V. Sobre uma cepa de *T. cruzi* altamente virulenta para camundongo branco. *Folia clin. Biol.*, São Paulo, **20**:191-201, 1953.
- PIZZI, T.; RUBIO, M. & KNIERIM, F. Immunologia de la enfermedad de Chagas. *Bol. Chil. Parasitol.* **9**: 35-47, 1954.

- REED, S.G. Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-Lymphocyte - Enriched Spleen Cells. *Infect. Immun.*, **28**:404-410, 1980.
- ROBERSON, E.L. & HANSON, W.L. Transfer of immunity to *T. cruzi*. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **68**:338, 1974.
- ; ————— & CHAPMAN, W.L. *Trypanosoma cruzi*: effect of antithymocyte serum on mice and neonatal thymectomy in rats. *Exp. Parasitol.*, **34**:168-180, 1973.
- SANTOS-BUCH, C.A. & TEIXEIRA, A.R.L. The Immunology of Experimental Chagas' disease. III. Rejection of allogenic heart cells in vitro. *J. Exp. Med.*, **140**: 38-59, 1974.
- SCHMUÑIS, G.A.; GONZALEZ-CAPPA, S.M.; TRAVERSA, O.C. & JANOVSKY, J.F. The effect of immuno depression due to neonatal thymectomy on infections with *Trypanosoma cruzi* in mice. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.*, **65**:89-94, 1971.
- TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. Role of different antibody classes in protection against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. Congresso Internacional sobre Doença de Chagas. Rio de Janeiro, 1979.
- TALIAFERRO, W.H. & PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulo-tropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, **96**:199-226, 1955.

TEIXEIRA, A.R.L. Autoimmune mechanisms in Chagas Disease. *New Approaches in American Trypanosomiasis Research*. Proceedings of an International Symposium. Belo Horizonte, Pan American Health Organization, 1975. p. 98-108.

_____ & SANTOS-BUCH, C.A. The immunology of experimental Chagas' Disease. I. Preparation of *Trypanosoma cruzi*. Antigens and Humoral Response to these Antigens. *J. Immunol.*, **113**:859-869, 1974.

TRISCHMAN, T.; TANOWITZ, H.; WITTMER, M. & BLOOM, B. *T. cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, **45**:160-168, 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) memoranda. Immunology of Chagas' disease. *Bull. Who* **50**(5):459-472, 1974.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Report of the first meeting of the scientific working Chagas' Disease. TDR/CHA - SWG (1) 77.3. Buenos Aires, 1977. p. 1-45.