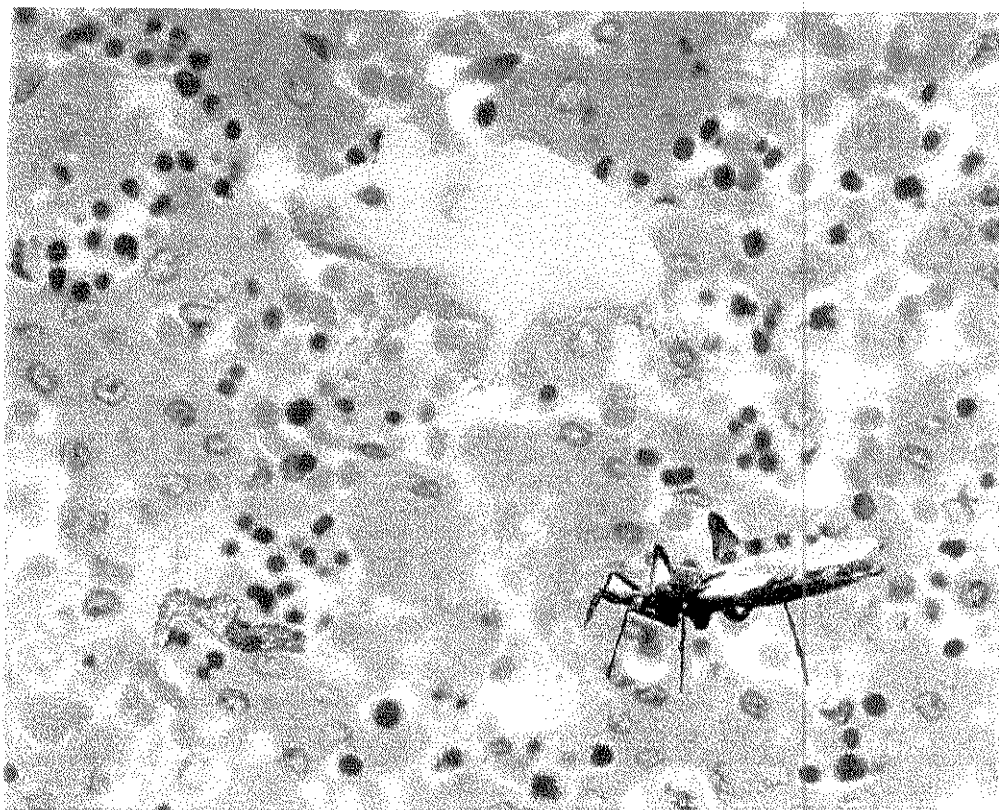




Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia
Departamento de Microbiologia e Imunologia

O papel das Células Linfóides
de Camundongos BALB/c Normais e do
Anticorpo anti- *T.cruzi* em Camundongos C.B-17 scid/scid
infectados com o *Trypanosoma cruzi*

Ângela Maria de Assis



As76p

31548/BC

Campinas
1997



Ângela Maria de Assis

O papel das Células Linfóides de Camundongos BALB/c normais e do Anticorpo anti-T.cruzi em Camundongos C.B-17 scid/scid infectados com o Trypanosoma cruzi

Orientadora: Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) Ângela Maria de Assis e aprovada pela Comissão Julgadora

27/02/97 Júlia Keiko Sakurada

Tese de mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas na área de Imunologia.

Campinas

1997



05710062

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Assis, Ângela Maria de

As76p O papel das células linfoides do camundongo BALB/c normal e do anticorpo anti-T.cruzi em camundongos C.B-17 scid/scid infectados com Trypanosoma cruzi/ Ângela Maria de Assis. -- Campinas, SP: [s.n.], 1997.
56f.: ilus.

Orientadora: Júlia Keiko Sakurada

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia.

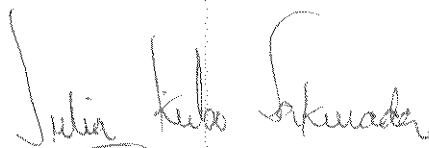
1. Anticorpos. 2. Parasitas. 3. Chagas, Doença de.
4. Trypanosoma cruzi. I. Sakurada, Júlia Keiko. II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 27 de fevereiro de 1997.

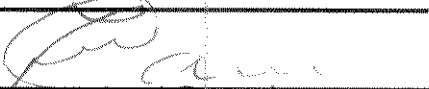
BANCA EXAMINADORA

TITULARES

Profa. Dra Júlia Keiko Sakurada (Orientadora)



Prof. Dr. Irineu José B. Camargo



Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo



SUPLENTE

Profa. Dra. Dagmar S. Machado



APROVADA

Trabalho realizado no CPG em Imunologia
do Departamento de Microbiologia e
Imunologia da Universidade Estadual de
Campinas, com auxílio financeiro do CNPq,
Fapesp e Faep.

Agradecimentos

- À Deus.
- À mim pela minha determinação, paciência, dedicação e disposição.
- Aos camundongos.
- Aos meus pais Adeni e Maria que mesmo na simplicidade, sempre admiraram e respeitaram meu trabalho.
- Aos meus irmãos Imaculada, Carlos e Marcos pelo apoio e amizade.
- Aos meus primeiros orientadores, Profa. Dra. Maria Helena S. Kraemer, Prof. Dr. Humberto de Araujo Rangel.
- Aos amigos Arthur, Vera Cecília, Margareth, Ana Cristina e Paulinho do laboratório de Imunogenética de transplantes pela amizade.
- Aos amigos Cristina, Dirce, Dorival, D. Ismália e Sr. Guilherme do laboratório 3 do Depto. de Microbiologia e Imunologia, pelo apoio técnico. Muito obrigada.
- Aos Professores Dr. Paulo Maria Araujo e Dr. Irineu J. B. Camargo pelas críticas e sugestões para o aprimoramento deste trabalho.
- Ao Sr. Nelson, Maria e Ana Raquel Augusti pelo carinho e atenção durante a minha caminhada.
- À Profa. Dra. Wirla M. S. C. Tamashiro e Profa. Dra. Dagmar R. Stach-Machado, pelo apoio e incentivo.
- **Agradeço especialmente a Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada que além da orientação e apoio, com paciência oriental, me ensinou tanto profissionalmente.**

Siglas e Abreviaturas

SCID - (Imunodeficiência combinada severa) o camundongo apresenta uma mutação autossômica recessiva no cromossomo 16 que resultou num defeito no sistema recombinase VDJ levando a deficiência de linfócitos T e B funcionais.

β_2 -microglobulina - Camundongos que não expressam produtos do gene MHC classe I, portanto faltam células T CD8 e resposta de células T citotóxicas.

nu/nu - Camundongos geneticamente atímico apresentam um defeito hereditário nas células epiteliais na pele levando a não produção de pêlos e no revestimento da 3ª e 4ª bolsas faringianas, provocando hipoplasia tímica.

Xid - Imunodeficiência ligada ao cromossomo X. Defeito recessivo que leva ao bloqueio no desenvolvimento de células B CD5, não responde a certos antígenos T independentes.

Biozzi - Linhagens murinas geradas para a produção de altas ou baixas respostas de anticorpos a vários antígenos.

Leaky - Camundongo SCID adultos, de 3 a 9 meses de idade, produzem alguns clones de células T e B funcionais, com rearranjo dos genes VDJ e VJ.

Pré-patente - período que antecede a infecção aguda.

Opsonização - Ocorre pela ligação de anticorpos específicos e/ou proteínas do complemento aos parasitas promovendo sua eliminação através de macrófagos. Ocorre normalmente e pode ser aumentada pela imunização.

SBF - Soro Bovino Fetal

H-2 - Complexo Principal de Histocompatibilidade do Camundongo

BCG - Bacilo de Calmette Guérin

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogenio ou água oxigenada

TNF α - Fator de Necrose Tumoral alfa

IFN - Interferon

NO - Óxido Nítrico

NK - Células Natural Killer

Th1 - Células T helper 1

Th2 - Células T helper 2

IL - Interleucina

CD - (Cluster of differentiation) marcadores de membrana

Fc - Fragmento cristalizável de imunoglobulina

ADCC - Citotoxicidade Celular Dependente de Anticorpo

TCR - Receptor de Célula T

Tc - Tripomastigota de cultura

Ts - Tripomastigota sangüícola

LPS - Lipopolissacarideo

SPF - (Specific Pathogen Free) livre de patógenos específicos

SN - Soro Normal

SRE - Sistema Retículoendotelial

Índice

| | |
|---------------------------------|----|
| Resumo..... | 1 |
| Introdução | 2 |
| Objetivos | 17 |
| Material e Métodos..... | 18 |
| Animais | 18 |
| Parasitos Tc..... | 18 |
| Parasitos Ts..... | 18 |
| Infecção experimental..... | 19 |
| Suspensão Celular | 19 |
| Transferencia celular | 19 |
| Imunoproteção passiva..... | 19 |
| Soro anti-T. cruzi | 20 |
| Parasitas tratados..... | 20 |
| Resultados | 22 |
| Discussão..... | 38 |
| Conclusões | 48 |
| Summary..... | 49 |
| Referências Bibliográficas..... | 50 |

Resumo

Para investigar a doença de Chagas experimental, camundongos BALB/c normais e C.B-17 scid/scid deficientes em linfócitos T e B funcionais foram inoculados com diferentes doses dos estoques tripomastigota de cultura (Tc) e tripomastigota sangüícola (Ts) da cêpa Y de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados obtidos com camundongos BALB/c mostraram que somente a dose 10^5 do estoque Ts foi capaz de matar 60% dos animais e com os camundongos SCID a infecção foi letal com todas as doses e ambos os estoques do parasita.

Esse perfil foi significativamente alterado, após a repopulação dos animais com 2×10^7 células esplênicas do camundongo BALB/c, e desafiados, em tempos diferentes, com o estoque Tc, mostrando um desvio no nível de parasitemia e controle da mortalidade.

Os animais repopulados com células tímicas, apresentaram uma modificação no nível de parasitemia quando desafiado com baixa dose de parasita do estoque de virulência atenuada (Tc).

Os estudos de imunoproteção realizados em camundongos SCID através da imunização passiva com várias doses do soro anti-*T. cruzi* obtidos de animais cronicamente infectados, foi no sentido de verificar o efeito dos anticorpos na ausência de imunidade celular. Observou-se um deslocamento no período de pré-patência nos animais que receberam uma única dose do anticorpo e as doses adicionais de anticorpos não alteraram a infecção.

O conjunto de resultados mostrou que as células esplênicas foram efetivas no controle da parasitemia e mortalidade, enquanto que as células tímicas foram eficientes em controlar o nível de parasitemia, ressaltando a importância da imunidade celular e humoral no desenvolvimento de uma resposta protetora durante o período de infecção.

Introdução

A doença de Chagas, parasitose grave e um dos principais problemas de saúde pública em muitos países da América Latina, tem como agente etiológico o protozoário *Trypanosoma cruzi*. A transmissão da doença ocorre através do inseto vetor da família *Reduviidae*, onde os tripanosomas crescem extracelularmente, passando por 2 estágios: epimastigotas, no intestino médio, multiplicam-se e migram para o intestino posterior, onde se transformam em tripomastigotas metacíclicos, que são as formas infectantes para o hospedeiro vertebrado, eliminadas nas fezes do inseto enquanto estes se alimentam. Uma vez no hospedeiro, os parasitas penetram em uma variedade de células como macrófagos, células do músculo cardíaco e musculatura lisa do intestino, neurônios e fibroblastos. Uma vez nos tecidos, transformam-se em amastigotas, que se diferenciam em formas tripomastigotas que são liberadas na circulação. O ciclo de vida se completa quando o triatomídeo, alimentando-se, ingere tripomastigotas da circulação sanguínea do hospedeiro.

Em humanos e animais experimentais, a infecção pelo *T. cruzi* é seguida por uma fase aguda, caracterizada, após um período pré-patente, pela multiplicação intracelular da forma amastigota, por um grande número de formas tripomastigotas circulantes no sangue e por um baixo nível de anticorpos no soro (Brener, 1980). Observa-se que, nessa fase, animais

infectados com *T. cruzi* apresentam altos níveis de transformação blástica em todas as classes de linfócitos (Minóprio et alli, 1986).

Na fase crônica da infecção, há um equilíbrio entre o hospedeiro e o parasita, devido a uma resposta imune aos antígenos do parasita determinando a presença de altas concentrações de anticorpos específicos e baixo nível de parasitas circulantes e/ou no tecido, resultando numa resistência a uma infecção posterior (Kierszenbaum & Howard, 1976; Brener, 1979; Brener, 1982).

Os estudos sobre as bases genéticas da resistência entre o parasita e o hospedeiro, na infecção aguda com *T. cruzi* tiveram início com as variações ocorridas na susceptibilidade das linhagens isogênicas de camundongos, levando em consideração a virulência da cepa do parasita, "background" genético, condições ambientais e sexo dos animais (Trischmann et alli, 1978; Trischmann & Bloom, 1982; Trischmann, 1983; Wrightsman et alli, 1982; Powell & Wassom, 1993).

Evidências de que, uma resposta imune protetora é controlada geneticamente, foi demonstrada por alguns autores através do cruzamento de linhagens isogênicas de camundongos, com diferentes "backgrounds" genéticos que geravam F1 mais resistentes que os parentais, observaram ainda que o locus de resistência à infecção não estaria ligado somente ao haplótipo H-2 mas que diferentes genes poderiam ser responsáveis pela

resistência nessas linhagens de camundongos (Trischmann & Bloom, 1982; Wrightsman, et alli 1982; Trischmann et alli, 1978; Juri et alli, 1990).

Essa resistência foi atribuída, por diversos autores, à imunidade inata, direcionando a defesa anti-protozoário à atividade do macrófago, que pode ser um importante mecanismo de defesa natural contra o *T. cruzi* ocorrendo, inicialmente, após a entrada do parasita no hospedeiro, induzindo, no primeiro instante, a uma resposta mediada por células com o reconhecimento do epítipo antigênico do parasita (Kierszenbaum et alli, 1974; Hoff, 1975; Nogueira & Cohn, 1978; Trischmann et alli, 1978).

O reconhecimento do *T. cruzi* pelo macrófago ocorre com a interação de receptores de superfície do macrófago através de glicoconjugados da superfície do parasita e/ou componentes do plasma que aderem a sua membrana (De Souza, 1984). A interação do parasita com a célula é seguida pela internalização, onde ocorre a ativação da endocitose com formação do fagossomo, seguida pela ingestão do parasita e fusão do fagolisossoma. No entanto, o parasita escapa do fagolisossoma através da lise da membrana vacuolar e prolifera no citoplasma do macrófago (Araujo-Jorge, 1989).

Para verificar a função do macrófago na defesa do organismo contra o *T. cruzi* Kierszenbaum e colaboradores realizaram, em 1974, a depleção "in vivo" de macrófagos utilizando partículas de sílica em camundongos resistentes, nos quais foi observado um aumento na susceptibilidade.

As evidências iniciais da atividade anti-tripanicida do macrófago, demonstrada por Hoff (1975), foram obtidas através de macrófagos de animais imunes ao *T. cruzi*, BCG ou *Listéria monocytogenes*, que se mostraram mais efetivos na destruição do parasita (Nogueira & Cohn, 1978). Posteriormente, Nathan et alli (1979) demonstraram que essa atividade anti-tripanicida estava correlacionada à capacidade do macrófago em liberar H₂O₂. Nogueira et alli (1981) verificaram que as células esplênicas de animais resistentes secretavam concentrações maiores de fatores capazes de ativar o macrófago. Ao encontro dessas observações, Russo et alli (1989) observaram que os animais susceptíveis eram capazes de liberar maiores concentrações de H₂O₂ e TNF que os animais resistentes.

Na doença de Chagas experimental, o mecanismo de morte do parasita pelas células fagocíticas, através de produtos de redução do nitrogênio, foi estudado por MacCabe & Mullins (1990), que demonstraram que o *T. cruzi* não é capaz de ativar o "burst" respiratório em macrófagos ativados. Gazzinelli et alli (1992) demonstraram que a linhagem celular com o "burst" respiratório defectivo era capaz de matar o *T. cruzi*, através da liberação de óxido nítrico mediante a ativação com IFN- γ ou LPS.

Estudos realizados com uma variedade de patógenos, incluindo *Leishmania major* (Liew et alli, 1991), *Toxoplasma gondii* (Adams et alli, 1990) e *Trypanosoma muscili* (Vicendeau & Daulouede, 1991) têm mostrado a importância do óxido nítrico ou produtos correlacionados produzidos por

macrófagos ativados, mostrando uma atividade citotóxica através da destruição do parasita. Posteriormente, Vespa et alli (1994) demonstraram que a resistência e/ou susceptibilidade à infecção estava correlacionada à concentração de NO produzido, pois o bloqueio da enzima NO sintase levou a um aumento na parasitemia e mortalidade. A enzima NO sintase atua degradando a L-arginina e liberando NO e pode ser induzida por IFN- γ e TNF α (Ding et alli, 1988).

As células responsáveis pela produção de IFN- γ podem ser tanto células NK como linfócitos Th1 (Scott et alli, 1989; Gazzinelli et alli, 1991). O IFN- γ é produzido na fase inicial da infecção e tem um importante papel na ativação do macrófago para inibir a replicação intracelular do parasita através da indução da produção de NO (MacCabe et alli, 1991). Entretanto, até recentemente, a célula responsável pela produção de IFN- γ , no período anterior à geração da imunidade mediada por células T em *T. cruzi*, era desconhecida.

Estudos realizados com animais estimulados com indutor da produção de IFN- γ , sugeriam a participação das células NK no mecanismo de resistência a infecção com *T. cruzi* (Hatcher & Kuhn, 1982; James et alli, 1982).

Atualmente, sabe-se que as células NK são as principais células produtoras de IFN- γ , demonstrado pela depleção das células NK "in vivo" com anticorpos anti-NK1.1 (Rottemberg et alli, 1988; Cardillo et alli, 1996) e anti-asialo GM.1 (Rottemberg et alli, 1988) resultando em um aumento da susceptibilidade à infecção e em uma diminuição na produção de IFN- γ . Além

disso, Rottemberg et alli, 1988 demonstraram que a inoculação in "vivo" de IFN- α/β induziam um controle da infecção.

Mais recentemente, Cardillo e colaboradores (1996) demonstraram que após a depleção de células NK havia uma diminuição na produção de IFN- γ pelas células esplênicas estimuladas com o parasita. Observaram ainda que a produção de IFN- γ induzida pelo *T. cruzi* é dependente de células esplênicas aderentes e células NK, e independente de linfócitos T. Nesse mecanismo de produção de IFN- γ , observaram uma regulação na produção de IL-10 na presença de células NK, mostrando que o macrófago é capaz de induzir a produção de IL-10 que é um inibidor da síntese de IFN- γ . Entretanto, os estudos realizados em animais susceptíveis e resistentes mostraram que ambas as linhagens produzem o mesmo nível de IFN- γ , porém com maior nível de IL-10, em animais susceptíveis, ao longo da infecção (Silva et alli, 1992). Além disso, estudos realizados com camundongos BALB/c Xid, resistentes à infecção pela cepa CL, observaram alta concentração de IFN- γ e baixa concentração de IL-10 em relação ao camundongo BALB/c susceptível (Minoprio et alli, 1993). A regulação da susceptibilidade à infecção por IL-10 foi observada por Reed et alli (1994). Nesse estudo, os animais susceptíveis, tratados com anti-IL-10, apresentaram baixa parasitemia e aumento na resistência à infecção com a cepa Tulahuén de *T. cruzi*. Outra citocina envolvida na regulação é a IL-12. Aliberti et alli (1996) demonstraram que o macrófago infectado com a cepa Y de *T. cruzi* foi capaz de induzir a síntese

de IL-12 e, através da inoculação "in vivo" de anti-IL-12, verificaram um aumento da parasitemia e da mortalidade. Hunter et alli (1996) utilizando a cepa Tulahuén de *T. cruzi* obtiveram resultados similares, um aumento na parasitemia, sem alterações na mortalidade. Os autores aventam a hipótese de que dependendo da cepa do parasita há uma possibilidade da IL-12 mediar resistência ao *T. cruzi*.

Em alguns modelos de infecção experimental, o padrão de susceptibilidade ou resistência tem sido associado ao perfil de produção de citocinas. Por exemplo, camundongos susceptíveis infectados com *Leishmania major*, *Plasmodium chabaudi* (Reed et alli, 1992; Taylor Robinson et alli, 1994) apresentam concentrações maiores de IL-4 e IL-10, associadas à resposta Th2 e baixo nível de IFN- γ , associada à resposta Th1, segundo a caracterização de Coffmann et alli, 1988 e Mosmann et alli, 1991.

Na doença de Chagas experimental, a dicotomia da resposta não parece ser dominante, uma vez que animais susceptíveis produzem tanto a resposta Th1 (IFN- γ) como a Th2 (IL-10). Até o presente momento, a relação entre IL-10 e IFN- γ , na resistência à infecção, não está completamente elucidada, principalmente no que diz respeito à população celular envolvida.

Alguns trabalhos encontrados na literatura demonstraram que os linfócitos T desempenham um papel decisivo na defesa contra a infecção por *T. cruzi*. Sua participação tem sido estudada em animais experimentais, através de manipulações no sistema imune, pela administração de drogas

imunossupressoras tóxicas para linfócitos T como: tratamento com a ciclofosfamida ou irradiação total (Roberson et alli, 1973); injeção de soro anti-timócito (Rodriguez et alli, 1991); ou timectomia neonatal (Roberson et alli, 1973) resultando na exacerbação da infecção.

A indução da resistência tem sido demonstrada através da transferência passiva de células linfóides de animais infectados com *T. cruzi*, tornando-os resistentes ao desafio posterior (Burguess & Hanson, 1979; Reed, 1980).

Resultados similares foram obtidos em camundongos atímicos que após a transplantação neonatal de timo restabelecia a resistência ao *T. cruzi* de forma similar àquela vista em camundongos normais (Schmuñis et alli, 1971; Kierszenbaum & Pienkowschi, 1979). Além disso, foi observado nesses animais baixo nível de anticorpos circulantes, incluindo IgG2a (Rodrigues et alli, 1983), sugerindo a necessidade dos linfócitos Th1, que têm como função auxiliar induzir a produção de IgG2a no camundongo (Coffman et alli, 1988). No entanto, o mecanismo regulatório e o papel das subpopulações de linfócitos T não estão totalmente esclarecidos.

A função das duas subpopulações linfocitárias CD4⁺ e CD8⁺ foi estudada a partir da utilização de diferentes cepas de *T. cruzi* e linhagens de camundongos, mostrando a contribuição de cada subpopulação na infecção aguda.

Os estudos realizados, com a depleção da subpopulação CD8⁺, em animais resistentes e susceptíveis à cepa Brazil de *T. cruzi* apresentaram um

aumento na susceptibilidade com altas parasitemias e mortalidade (Tarleton, 1990).

Posteriormente, a confirmação do papel das células T CD8⁺ na proteção foi demonstrada através do uso de camundongos deficientes da proteína β_2 microglobulina, que não apresentam células T CD8⁺ e, portanto, não expressam moléculas de classe I do MHC. Esses animais são altamente susceptíveis à infecção por *T. cruzi* e apresentam mortalidade precoce com alto parasitismo no tecido em relação aos animais controle e ausência de uma resposta inflamatória no tecido parasitado (Tarleton et alli, 1992).

Sun & Tarleton (1993) observaram que camundongos resistentes C57BL/6, infectados com a cepa Brazil de *T. cruzi*, apresentavam uma parasitemia moderada e tropismo para músculo esquelético; enquanto camundongos susceptíveis C3H, infectados com a cepa *Silvio X10/4* de *T. cruzi*, não apresentavam parasitismo com tropismo para miocárdio. Esses animais apresentaram uma resposta inflamatória com predominância das células T CD8⁺.

Outro importante papel das células T CD8⁺ é a produção de INF- γ na fase aguda da infecção e sua atividade citotóxica, com finalidade de eliminar parasitas circulantes e as células infectadas.

Nesse sentido, os resultados apresentados por Minoprio et alli (1987) em animais depletados de linfócitos T CD4⁺ mostraram um aumento na

parasitemia e uma redução na inflamação dos tecidos como verificado em animais nu/nu.

Alguns autores atribuem a importância dos linfócitos T CD4⁺ a seu papel na ativação de macrófagos, através da secreção de citocinas para iniciar a resposta na fase aguda da infecção (Russo et alli, 1989 e 1991; Tarleton, 1991b e 1993).

Por outro lado, Ben-Younès-Chennoufi et alli (1988) verificaram que as células T CD4⁺ estavam presentes nos infiltrados celulares na infecção com a cepa Y e CL de *T. cruzi* sugerindo que a fase aguda da infecção é devida à presença de células T CD4⁺ e está correlacionada à patogenicidade na fase crônica.

Em concordância com esses resultados, Ribeiro dos Santos (1991) e Joskowicz (1991) correlacionam os LT CD4⁺ à expansão da doença pelo aparecimento de lesões inflamatórias durante as primeiras semanas de infecção.

A função das duas subpopulações linfocitárias CD4⁺ e CD8⁺ foi estudada por Rottemberg et alli (1995) utilizando-se as cepas Tulahuén (virulenta) e CA-I (baixa virulência) de *T. cruzi* em animais que não expressam moléculas CD4⁺ e/ou CD8⁺. Os animais CD4⁻ tiveram um aumento na susceptibilidade com ambas as cepas do parasita, e apresentaram baixo nível de INF- γ e um aumento no nível de IL4 e IL10 com ambas as cepas do

parasita; enquanto animais CD8⁺ foram susceptíveis à infecção com a cepa virulenta, porém resistentes à infecção com a cepa de baixa virulência. Este modelo sugere que o fenômeno de controle da infecção pelo *T. cruzi* é complexo e dependente de interações celulares.

A importância do anticorpo na regulação da infecção foi demonstrada por Kierszenbaum & Howard (1976), em camundongos Biozzi bons e maus respondedores. Os autores observaram que a capacidade de produzir anticorpos é um importante mecanismo de resistência para a infecção onde camundongos maus respondedores foram susceptíveis à infecção com a cepa Y ou Tulahuén de *T. cruzi*.

A confirmação do papel do anticorpo na resistência do hospedeiro contra o *T. cruzi* foi obtida por Krettli & Brener, 1976; McHardy, 1977, através dos estudos de imunoproteção realizados com soros obtidos da infecção experimental em camundongos, demonstrando que os anticorpos protetores estariam presentes na fase crônica da infecção possuindo propriedades altamente específicas. Este fato levou à investigação da classe de imunoglobulina, responsável pela transfêrencia passiva de resistência contra a infecção com a cepa Y de *T. cruzi*. Takehara et alli (1981) demonstraram que camundongos que receberam soro imune livre de IgG tiveram uma exacerbação na infecção, ao passo que os animais que receberam frações de IgG2 ou IgG3 tiveram baixa parasitemia e apenas a fração de IgG2 era capaz

de induzir a sobrevivência. Com a depleção da fração de IgG2a ou IgG2b observaram que a atividade protetora estava presente na fração IgG2b.

As evidências existentes no mecanismo pelo qual o parasita é eliminado mostram a importância do sistema complemento em animais depletados de C3 que apresentaram um aumento na susceptibilidade a infecção com a cepa Tulahen de *T. cruzi* (Budzko 1975).

Através de experimentos "in vitro" foram demonstrados que os anticorpos presentes na fase crônica da infecção eram capazes de opsonizar o parasita e induzir a sua lise na presença de complemento (Kierszenbaum & Howard 1976; Kretzli 1977).

Kretzli & Brener (1982) demonstram que o anticorpo responsável pela lise dependente de complemento estava correlacionado apenas com os epítopos presentes na forma sangüícola de *T. cruzi*, e que os antígenos isolados ou as formas metacíclicas não eram capazes de induzir a produção de anticorpos líticos.

Posteriormente, Yoshida (1986) demonstrou que os antígenos de superfície tanto das formas sangüícola, quanto das de cultura, podem induzir a produção de anticorpos líticos, que reagem apenas com proteínas de formas tripomastigotas viáveis. Kretzli et alii, (1986) verificaram que a presença de anticorpos líticos nos soros da fase aguda era insensível à capacidade de imunoproteção e que a lise do parasita dependente de complemento não seria o único mecanismo da ação do complemento.

Umekita et alli, (1989) trabalhando com soros da fase crônica verificaram que a fração de IgG era capaz de induzir lise mediada por complemento; além disso, observaram que esses anticorpos eram capazes de mediar "clearance" do parasita opsonizado pelos macrófagos através de receptores Fc dos anticorpos (Umekita et alli, 1988).

Scott & Moyes (1982) demonstraram um aumento na capacidade fagocítica do parasita opsonizado com os anticorpos pelo aumento no número de parasitas nas células fagocíticas do SRE do fígado e baço.

Um outro mecanismo de defesa dependente de anticorpo é a citotoxicidade celular dependente de anticorpo (ADCC) que requer a opsonização do parasita com IgG específica. Martins et alli (1985) demonstraram que somente os anticorpos líticos estariam envolvidos nesse mecanismo de eliminação do parasita.

O conjunto de informações mostra que a resposta imunoprotetora para infecção com *T. cruzi* requer claramente uma combinação de vários mecanismos, incluindo células T CD4⁺ e CD8⁺, produção de anticorpo e células NK (Trischmann et alli, 1983; Araújo et alli, 1989; Tarleton et alli, 1990). Essa resposta tem sido investigada principalmente em linhagens de camundongos isogênicos e, mais recentemente, em animais imunodeficientes.

Nesse sentido, o camundongo SCID tem sido utilizado para o estudo de diferenciação e regulação de linfócitos e estudo das funções de células não linfóides na ausência de linfócitos.

C.B-17 é uma linhagem congênita do BALB/cAnIcr, uma mutação recessiva autossômica no cromossomo 16, que resultou em SCID. Essa linhagem carrega o locus de cadeia pesada de Ig da linhagem C57BL/6 Ka (Bosma et alli, 1983; Custer et alli, 1985). O camundongo C.B-17 é homozigoto para a mutação SCID, que é deficiente em linfócitos T e linfócitos B, em função de um defeito no sistema recombinase VDJ. Nesse sistema, uma enzima chave necessária para o rearrajamento de gene de Ig e TCR impede a diferenciação dos linfócitos T e B (Bosma et alli, 1983; Dorshkind et al, 1984), mas não a mielopoiese de granulócitos, monócitos e células NK, que são linhas celulares funcionais (Bosma et alli, 1983; Custer et alli, 1985).

Nesses animais, os tecidos linfóides como placa de Peyer, folículo intestinal e linfonodo são hipoplásicos, contendo poucas células reconhecíveis como linfócitos (Bosma et alli, 1992). As células apresentadoras de antígenos do camundongo SCID são equivalentes às de um camundongo normal (Czitron et alli, 1985). A concentração de imunoglobulinas no soro geralmente é menor que $0,02\text{mg/ml}^{-1}$ (Bosma & Carroll, 1991).

A interrupção no desenvolvimento de linfócitos não é absoluta, alguns (2-23%) camundongos SCID adultos, de 3-9 meses de idade, são "leaky" (Bosma et alli, 1988), e produzem alguns clones de células T e B funcionais, havendo rearranjo dos genes VDJ e VJ (Bosma et alli, 1992).

O camundongo SCID tem sido usado para estudar doenças parasitárias como malária (Sacci et alli 1992), leishmaniose (Holaday et alli, 1991; Varkila et

alli, 1993), schistosomíase (Amiri et alli, 1992), filariose (Nelson et alli, 1991), cryptosporidiose (Mead et alli, 1992; McDonald et alli, 1992; Harp et alli, 1992), amebíase (Cieslak et alli, 1992), giardíase (Gottstein et alli, 1991) toxoplasmose (Johnson et alli, 1992) ou de bactéria intracelular como a listériose (Bancroft et alli 1991), com o objetivo de elucidar o envolvimento de imunidade inata e adquirida e as interações celulares no mecanismo de regulação envolvendo as diferentes citocinas.

Conforme o exposto, o mecanismo de indução da resposta imunológica ao *T. cruzi* é extremamente complexo e a compreensão dessa resposta é aumentada quando se utilizam diferentes linhagens de camundongos e uma variedade de cepas de *T. cruzi*. A proposta do presente trabalho foi estudar a função de linfócitos das células esplênicas e tímicas, e o papel do anticorpo na regulação da infecção pelo *T. cruzi* em camundongos SCID, utilizando os dois estoques da cepa Y.

Objetivos

Diante do exposto anteriormente, foi objetivo deste estudo:

- 1- Acompanhar a evolução da infecção em camundongos C.B-17 scid/scid e BALB/c, inoculados com os estoques Ts (tripomastigota sangüícola) e Tc (tripomastigota cultura) da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.
- 2- Verificar o comportamento de camundongos da linhagem C.B-17 scid/scid, repopulados com células esplênicas ou tímicas do camundongo BALB/c, frente ao desafio com os estoques tripomastigota sangüícola e tripomastigota de cutura.
- 3- Determinar o efeito dos anticorpos específicos anti-*T.cruzi* em camundongos C.B-17 scid/scid através de transferência passiva de soro imune ou opsonização do parasito.

Materiais e Métodos

Animais - Camundongos das linhagens BALB/c (H-2^d IgH^b IgM^a) e C.B-17 scid/scid (H-2^d IgH^a IgM^b) machos e fêmeas, de 8-12 semanas de idade, provenientes de estoques SPF, do **CEMIB** - (Centro de Bioterismo Unicamp). Os camundongos C.B-17 scid/scid foram selecionados através do nível de imunoglobulina sérico, pela técnica de Immunoblot segundo Gordon et alli, (1991) e apenas animais com menos de 5µg/ml de imunoglobulina total foram utilizados.

Parasitas - Formas de *Trypanosoma cruzi* cepa Y foram mantidos em dois estoques Tc e Ts:

Tripomastigota de cultura (Tc) - estoque derivado de Y original por sucessivas passagens em cultura de células LLC-MK₂, em meio RPMI-1640, contendo L- glutamina 1% da solução 0,2 M, estreptomicina/penicilina 1000U/ml e 10% de soro bovino fetal. O sobrenadante de cultura, após 7 dias de infecção, foi centrifugado a 1465g a 4°C e o sedimento contendo o parasita foi lavado 3 vezes. A concentração de parasitas foi determinada pela contagem em câmara de Neubauer, segundo Brener (1962).

Tripomastigota sangüícola (Ts) - estoque derivado da cepa Y original após 10 passagens sucessivas em cultura de células LLC-MK₂ e, em seguida, inoculado em camundongos CBA/J, mantidos por passagens semanais com uma dose de 10⁵ parasitas por via intraperitoneal e mantidos em isoladores.

Infecção experimental - Os camundongos BALB/c e C.B-17 scid/scid foram infectados com os estoques Tc ou Ts por via intraperitoneal (i.p) e mantidos em isoladores do tipo Trexler, no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia. A parasitemia foi determinada segundo Brener (1962). O número de parasitas foi calculado por transformação logarítmica.

Suspensão Celular - As suspensões celulares do baço e timo de camundongos BALB/c normais foram obtidas removendo-se assepticamente os órgãos e macerando-os em meio RPMI-1640 com 2% de SBF. As hemácias foram lisadas, em seguida lavadas e ressuspensas. A viabilidade das células foi determinada pela exclusão de células coradas por azul Trypan em câmara de Neubauer. A concentração celular foi ajustada para 2×10^8 células/ml.

Transferência celular - Os camundongos C.B-17 scid/scid foram repopulados por via retroorbital, com 0,1 ml da suspensão de células esplênicas ou tímicas do camundongo BALB/c, contendo 2×10^8 células/ml. Posteriormente, foram inoculados com os dois estoques Tc ou Ts de *Trypanosoma cruzi* por via intraperitoneal, em diferentes tempos, conforme as indicações apresentadas nos resultados. Os camundongos controle receberam 0,1 ml de meio RPMI-1640 via retroorbital.

Imunoproteção passiva - Camundongos C.B-17 scid/scid foram imunizados passivamente por via i.p. com 0,2 ml de soro anti-*T. cruzi* e desafiados, após 1 hora, com um inóculo de 10^2 formas do estoque Ts por via

intraperitoneal. O grupo controle foi inoculado com 0,2 ml de soro de animais normais e desafiado, após 1 hora, com 10^2 tripomastigota sangüícola.

No experimento de transferência passiva, os animais que receberam várias doses de soro anti-*T. cruzi*, em períodos de tempo diferentes (após o inóculo), foram distribuídos segundo a indicação da tabela abaixo.

| Grupo | Dias do inóculo | Dose do anti-soro | Tempo de desafio | Desafio |
|-------|-----------------|----------------------------------|------------------|-----------|
| I | 0 | 0,2ml soro normal | 1 h | 10^2 Ts |
| II | 0 | 0,2ml soro anti- <i>T. cruzi</i> | 1 h | 10^2 Ts |
| III | 0, 7 | 0,2ml soro anti- <i>T. cruzi</i> | 1 h | 10^2 Ts |
| IV | 0, 7, 14 | 0,2ml soro anti- <i>T. cruzi</i> | 1 h | 10^2 Ts |

Soro anti-*T. cruzi* - Soro obtido de camundongos (CBA x C₅₇BL₁₀ /J)F1 infectados com 10^2 formas de tripomastigota sangüícola, após 8 semanas de infecção. A determinação da especificidade dos anticorpos obtidos foi realizada pela técnica de imunofluorescência indireta, segundo Camargo (1966), contra formas tripomastigota, amastigota e epimastigotas, provenientes da cultura de células no 7º dia de infecção, e a concentração de isótipo foi obtida segundo o método de imunodifusão radial, de acordo com Mancini et alli, (1965).

Parasitas opsonizados - Aliquotas de 0,1 ml de sangue de animal infectado contendo 2×10^2 tripomastigotas sangüícola foram pré-incubadas a 4º C, por 1 hora, com igual volume de soro anti-*T. cruzi* ou soro normal. Os animais foram inoculados por via intraperitoneal com 0,2 ml da mistura de parasitas com

anticorpo ou soro normal. A parasitemia e a mortalidade foram monitoradas no decorrer da infecção.

Resultados

I - Curso da infecção em camundongos BALB/c, inoculados com os estoques tripomastigota sangüícola e tripomastigota de cultura.

A evolução da infecção nos camundongos BALB/c inoculados com diferentes doses (10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 /animal) dos estoques do parasita tripomastigota sangüícola (Ts), e tripomastigota de cultura de virulência atenuada (Tc) foi estudada em grupos de 5 camundongos, determinando-se, diariamente, o nível de parasitemia e a taxa de mortalidade.

Como demonstrado na figura 1, os resultados da avaliação do parasita circulante nos camundongos inoculados com os estoques Tc e Ts da cepa Y apresentam cinéticas de evolução de parasitemia diferentes. Nos animais inoculados com 10^5 Ts (Fig. 1A), o nível máximo de parasitemia foi alcançado no 4º dia de infecção; manteve-se alto no decorrer desse período, com um controle parcial da mortalidade. Os animais inoculados com 10^4 e 10^3 (dados não apresentados) apresentaram vários picos e sobrevida. Nos animais inoculados com 10^5 formas do estoque Tc (Fig.1B), o nível máximo de parasitemia não atingiu o log 5, apresentando 2 picos: o primeiro, no 5º dia, e o segundo, no 9º dia de infecção. Em seguida, o nível de parasitemia diminuiu significativamente e todos os animais tiveram um curto período de infecção. Os animais inoculados com 10^2 formas de Ts (Fig. 1A) e Tc (Fig. 1B) apresentaram uma parasitemia irregular, mas tiveram controle total da infecção (Tabela I).

Comparando a infectividade de ambos os estoques (Ts e Tc), os resultados apresentados na tabela I mostram que 10^5 do estoque Tc não mata

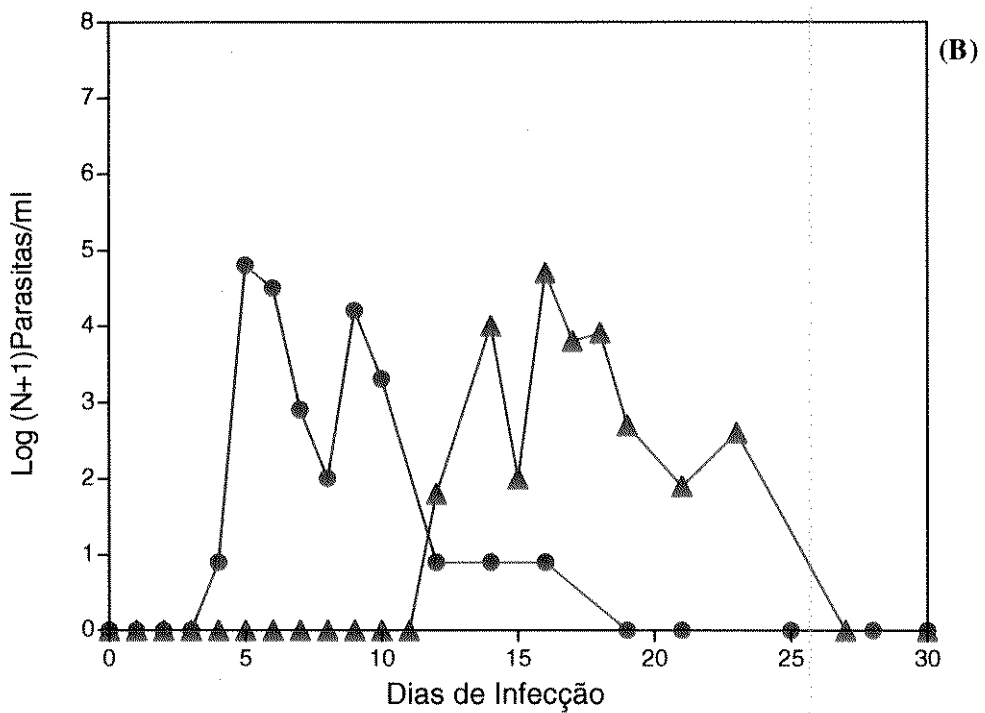
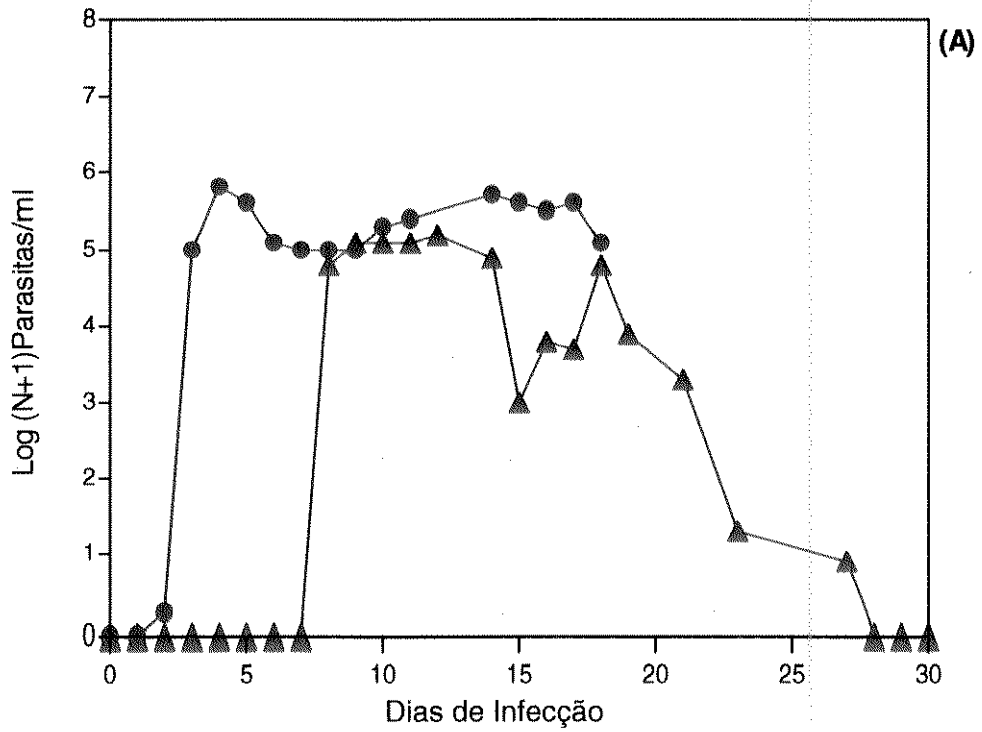


Fig. 1: Perfil de parasitemia em camundongos BALB/c inoculados com os estoques Tc e Ts da cepa Y de *T. cruzi*. (●) 10^5 e (▲) 10^2 tripomastigota sangüícola (A), (●) 10^5 e (▲) 10^2 tripomastigota de cultura (B).

camundongos BALB/c, enquanto que a mesma dose do estoque Ts foi capaz de matar 60% dos animais em um período de 45 dias.

Tabela I - Taxa de mortalidade de camundongos BALB/c inoculados com tripomastigota sangüícola (Ts) e de cultura (Tc).

| Linhagem | Estoque | Dose | d.m.m. | % mortalidade |
|----------|---------|-----------------|----------|---------------|
| BALB/c | Ts | 10 ⁵ | 21,0±1,0 | 60% |
| BALB/c | Ts | 10 ⁴ | - | 0% |
| BALB/c | Ts | 10 ³ | - | 0% |
| BALB/c | Ts | 10 ² | - | 0% |
| BALB/c | Tc | 10 ⁵ | - | 0% |
| BALB/c | Tc | 10 ² | - | 0% |

II - Curso da infecção em camundongos C.B-17 scid/scid inoculados com os estoques Ts e Tc.

Com objetivo de verificar como se comportam animais imunodeficientes frente à infecção com *Trypanosoma cruzi*, grupos de camundongos C.B-17 scid/scid foram analisados inoculando-se diferentes doses (10⁵ - 10⁰) de tripomastigota de cultura (Tc) e tripomastigota sangüícola (Ts) (Fig. 2). O nível de parasitemia, nesses animais, aumentou logaritmicamente na fase inicial da infecção, apresentando picos irrelevantes. Não houve uma diferença significativa no nível de parasitemia com os dois estoques do parasita (Fig. 2A e 2B); a diferença esteve presente durante o período pré-patente. Todas as doses

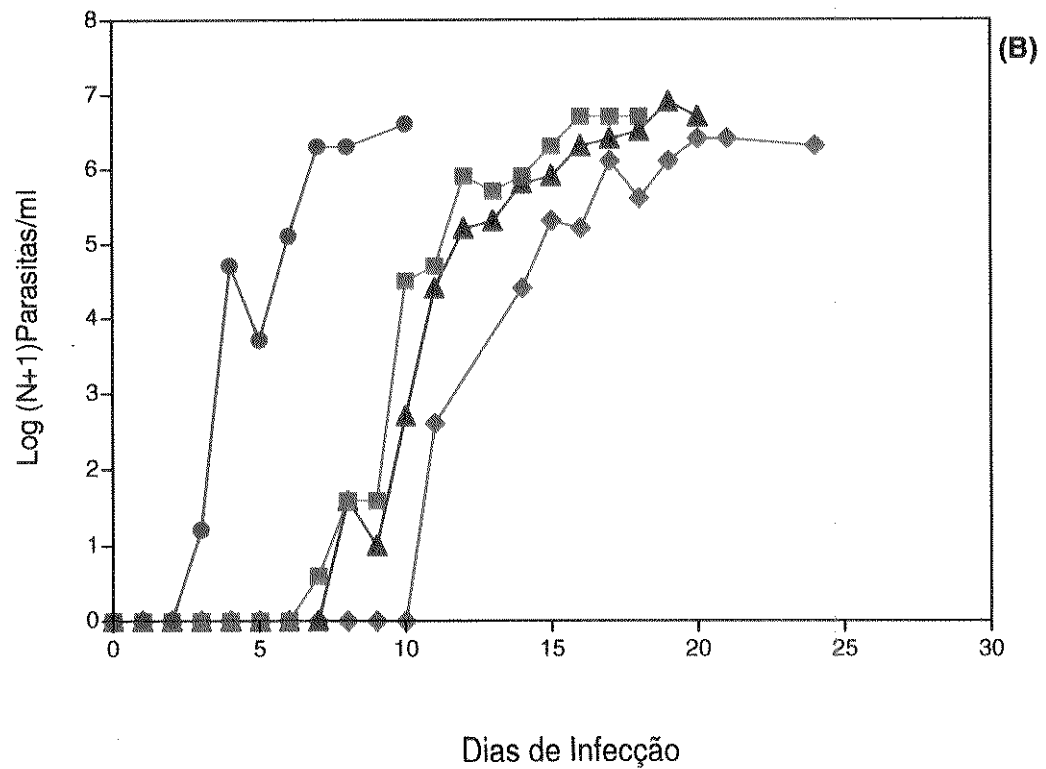
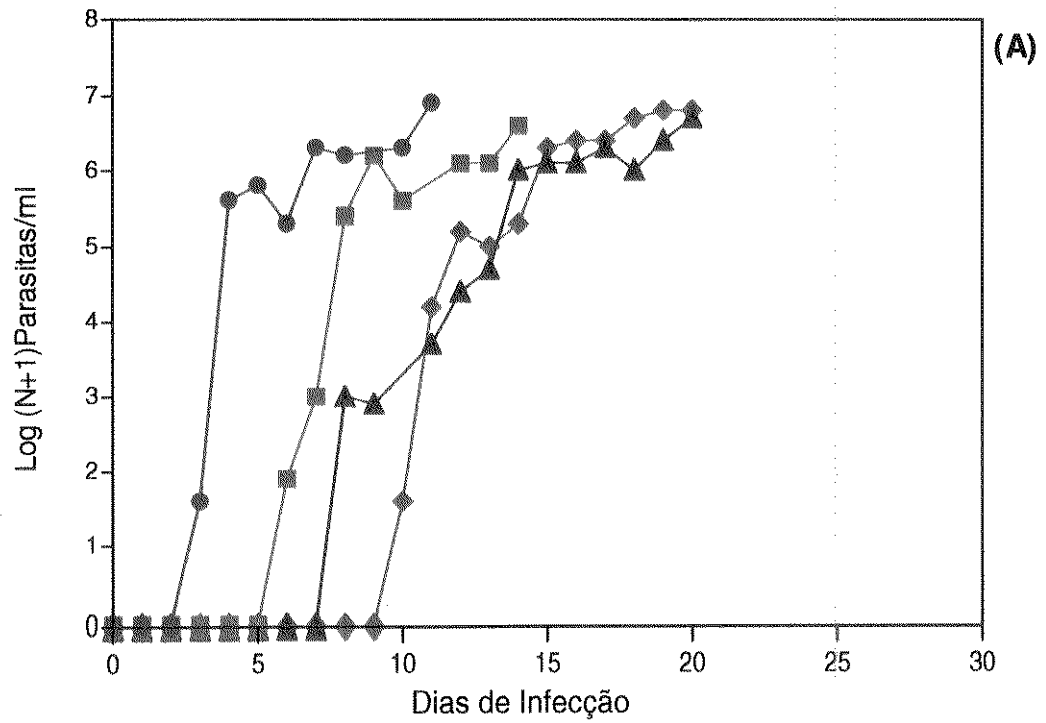


Fig. 2: Perfil de parasitemia em camundongos C.B-17 scid/scid inoculados com os estoques Tc e Ts da cepa Y de *T. cruzi*. (●) 10⁵, (■) 10³, (▲) 10², (◆) 10⁰ Ts; **(A)**. (●) 10⁵, (■) 10³, (▲) 10², (◆) 10⁰ Tc **(B)**.

e estoques do parasita mataram o camundongo SCID, exceto nos grupos de animais inoculados com 1 forma de parasita de ambos os estoques, ressaltando que somente 60-70% dos animais apresentam parasitas circulantes com essa dose, devido à concentração do parasita nos inóculos.

Na tabela II, apresentamos a taxa de mortalidade dos animais inoculados com diferentes doses do parasita, e o dia médio da mortalidade. Pode-se verificar que quanto maior o número de parasitas inoculados, menor é o dia médio de vida dos animais.

Tabela II- Taxa de mortalidade de camundongos C.B-17 scid/scid inoculados com diferentes doses do parasita dos estoques tripomastigota sangüícola (Ts) e tripomastigota de cultura (Tc).

| Linhagem | Estoque | Dose | d.m.m. | % mortalidade |
|-----------------|---------|-----------------|----------|---------------|
| C.B-17scid/scid | Ts | 10 ⁵ | 11,0±0,5 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Ts | 10 ⁴ | 13,0±2,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Ts | 10 ³ | 16,0±1,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Ts | 10 ² | 21,0±2,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Ts | 10 ⁰ | 23,0±1,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Tc | 10 ⁵ | 12,0±1,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Tc | 10 ⁴ | 12,0±1,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Tc | 10 ³ | 18,0±2,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Tc | 10 ² | 22,0±2,0 | 100% |
| C.B-17scid/scid | Tc | 10 ⁰ | 23,0±0,2 | 100% |

III - O efeito das células esplênicas no curso da infecção em camundongo C.B-17 scid/scid.

Com o objetivo de verificar o efeito das células esplênicas na infecção de camundongos SCID, células de baço de camundongos BALB/c normais foram transferidas para camundongos SCID e desafiados com o parasita.

Uma vez fixados alguns parâmetros como número de células por animal, dose de parasitas e o tempo de desafio entre a inoculação das células e do parasita, quatro grupos de camundongos SCID foram repopulados com 0,1ml de 2×10^7 células esplênicas/animal, por via retroorbital e desafiados com a dose de 10^5 Tc por via intraperitoneal, após o período de 1 hora, 24 horas, 5 e 24 dias.

Como pode ser visto na Fig. 3A os animais repopulados e após 1 hora desafiados apresentaram uma diminuição no nível de parasitemia quando comparados com animais controle. No desafio de 24 horas após a repopulação houve uma redução no nível de parasitemia e o deslocamento de 3 dias no período pré-patente.

Os resultados apresentados na Fig. 3 mostram que as células esplênicas exercem uma influência no controle da parasitemia, modificando a evolução da infecção. Esse fenômeno está correlacionado com o período de tempo entre o inóculo das células e o desafio com o parasita. No desafio, a partir de 24 horas após a repopulação a alteração no perfil torna-se característica, apresentando uma redução no nível de parasitemia e o deslocamento de 3 dias no período

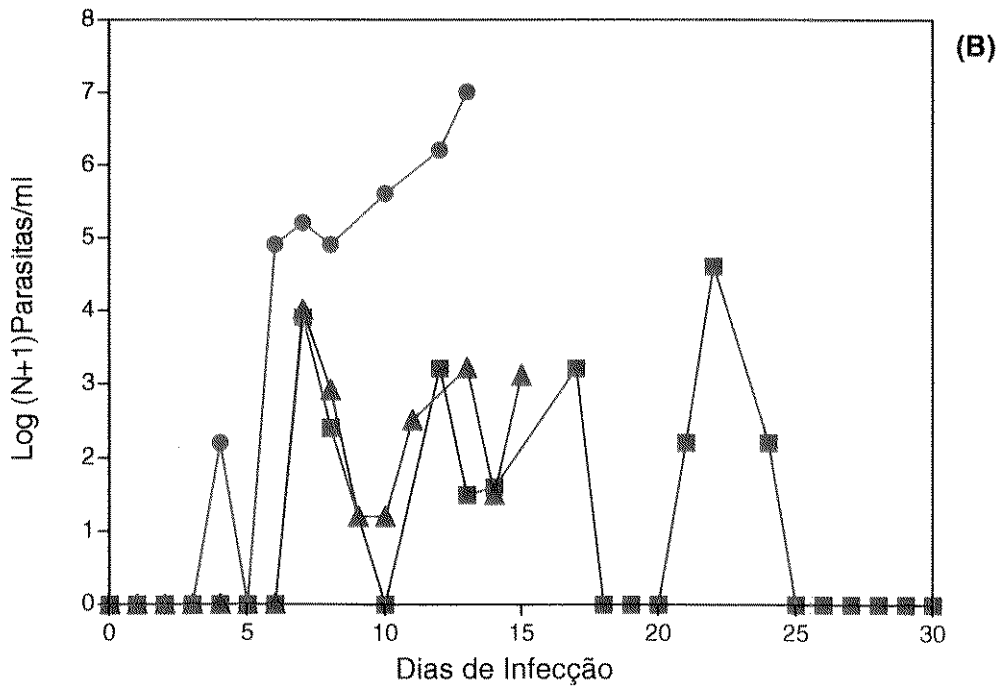
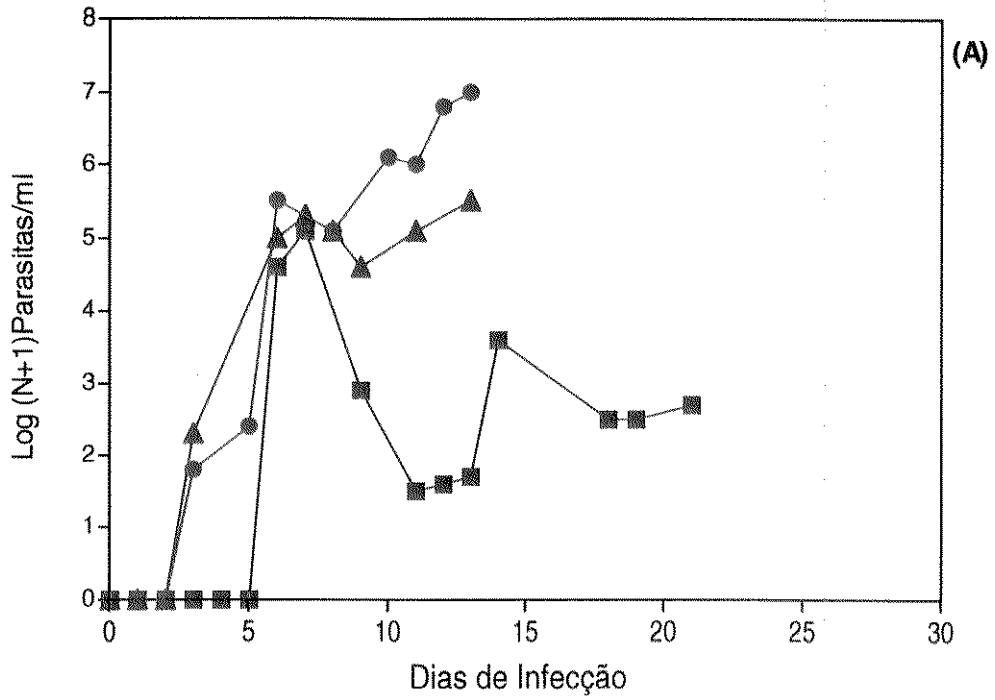


Fig. 3: Perfil de parasitemia em camundongos C.B-17 scid/scid repopulados com 2×10^7 células esplênicas do camundongo BALB/c e desafiados em diferentes tempos com 10^5 formas de tripomastigota de cultura (●) controle, (▲) 1 hora, (■) 24 horas (A); (●) controle, (▲) 5 dias, (■) 24 dias (B).

pré-patente em relação ao grupo controle e àqueles desafiados após 1 hora (Fig. 3A). Os animais desafiados após 5 e 24 dias de repopulação apresentaram uma infecção irregular com um controle no nível de parasitemia (Fig. 3B).

A alteração na mortalidade foi observada apenas no grupo de animais de 24 dias de repopulação, conforme os resultados apresentados na tabela III.

Tabela III - Taxa de mortalidade de camundongos C.B-17 scid/scid repopulados com células esplênicas do camundongo BALB/c e desafiados com o estoque Tc

| Grupo | Células recebidas (2×10^7 cel/animal) | Tempo de desafio | Dose | d.m.m. | % mortalidade |
|-------|--|------------------|-----------|--------------|---------------|
| I | Células esplênicas | 1 hora | 10^5 Tc | $13 \pm 1,3$ | 100% |
| II | Células esplênicas | 24 horas | 10^5 Tc | $15 \pm 4,0$ | 100% |
| III | Células esplênicas | 05 dias | 10^5 Tc | $14 \pm 3,0$ | 100% |
| IV | Células esplênicas | 24 dias | 10^5 Tc | $14 \pm 4,7$ | 40% |
| V | meio RPMI | 1 hora | 10^5 Tc | $13 \pm 0,5$ | 100% |

O segundo experimento foi realizado utilizando-se um período de 72 horas entre a repopulação das células e o desafio com as doses de 10^3 e 10^2 formas de tripomastigota de cultura. Nesse experimento, foram preparados grupos de animais repopulados com 2×10^7 células esplênicas ou células timícas (Fig. 4).

Os resultados apresentados na Fig. 4 mostram uma correlação direta entre a dose do parasita e o efeito das células esplênicas ou timócitos do doador no controle da parasitemia com as doses de 10^3 (A) ou 10^2 (B) formas do parasita. Mostram também que as células do baço são mais eficientes do que as do timo no controle da parasitemia.

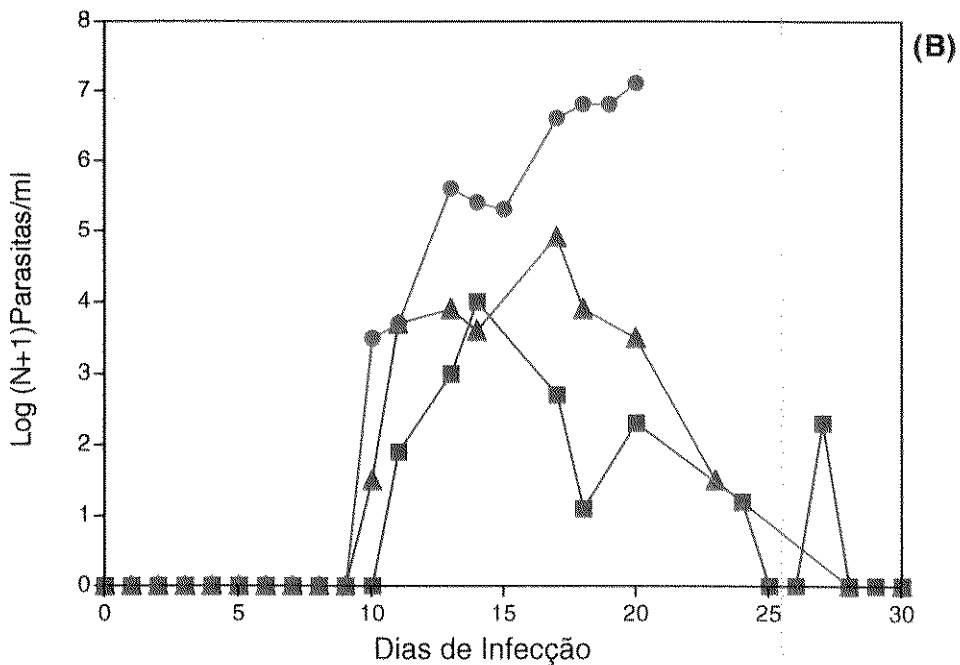
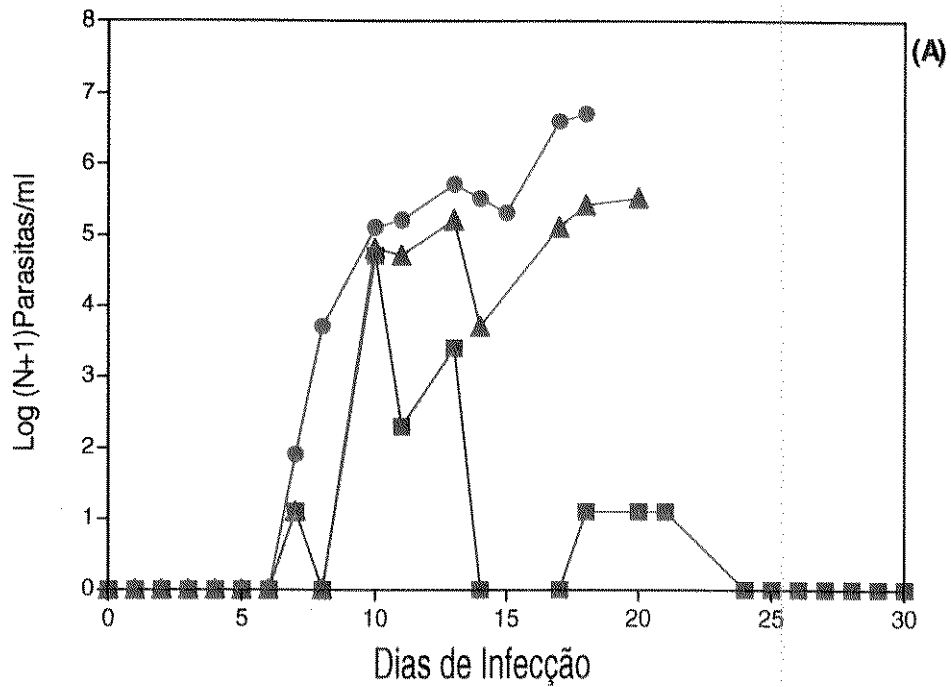


Fig.4: Perfil de parasitemia em camundongos C.B-17 scid/scid repopulados com 2×10^7 células esplênicas ou tímicas do camundongo BALB/c e desafiados após 72 horas com tripomastigota de cultura. (●) controle, (▲) repopulados com células tímicas e desafiados com 10^3 Tc, (■) repopulados com células esplênicas e desafiados com 10^3 Tc (A); (●) controle, (▲) repopulados com células tímicas e desafiados com 10^2 Tc (■) repopulados com células esplênicas e desafiados com 10^2 Tc (B).

As células esplênicas foram capazes de controlar tanto o nível de parasita circulante como a mortalidade; enquanto que os timócitos reconstituíram apenas a capacidade de controlar o nível de parasitemia com as duas doses de parasitas, mostrando apenas um ligeiro deslocamento no dia médio de mortalidade (tabela IV) com 10^2 Tc.

Tabela IV - Taxa de mortalidade de camundongos C.B-17 scid/scid repopulados com células esplênicas de camundongos BALB/c e desafiados após 72 horas com o estoque Tc.

| Grupo | Células recebidas (2×10^7 cel/animal) | Tempo de desafio | Dose | d.m.m. | %mortalidade |
|-------|--|------------------|-----------|--------------|--------------|
| I | Células esplênicas | 72 horas | 10^3 Tc | ≥ 30 | 0% |
| II | Células tímicas | 72 horas | 10^3 Tc | $20 \pm 1,0$ | 100% |
| III | meio RPMI | 72 horas | 10^3 Tc | $18 \pm 1,0$ | 100% |
| IV | Células esplênicas | 72 horas | 10^2 Tc | ≥ 30 | 0% |
| V | Células tímicas | 72 horas | 10^2 Tc | $22 \pm 2,0$ | 80% |
| VI | meio RPMI | 72 horas | 10^2 Tc | $20 \pm 1,0$ | 100% |

IV - Curso da infecção de camundongos C.B-17 scid/scid repopulados e desafiados com os estoques *tripomastigota* sangüícola e de cultura.

A evolução da infecção nos camundongos SCID apresentou uma resposta semelhante para os dois estoques de *T. cruzi*, mostrando que os animais não são capazes de discriminar o estoque virulento do estoque avirulento. Como o resultado anterior mostrou que 2×10^7 células

esplênicas/animal restitui a competência do animal em controlar a infecção com 10^2 Tc, procurou-se verificar quais as condições ideais para o estoque sangüícola.

Grupos de 10 camundongos SCID foram inoculados com 2×10^7 esplenócitos e 72 horas após divididos em 2 grupos: o primeiro grupo, desafiado com 10^2 Ts (Fig. 5A) e o segundo grupo, desafiado com 10^2 Tc (Fig. 5B).

Os resultados da evolução da infecção de animais repopulados e desafiados com Tc (Fig. 5B) mostram a eficiência das células esplênicas no controle do nível de parasitemia e no controle da infecção. Os camundongos SCID repopulados comportaram-se como BALB/c, não havendo diferença significativa no nível de parasitemia nessas 2 linhagens. Nos animais repopulados com células esplênicas e desafiados com Ts (Fig. 5A), a parasitemia manteve-se num "plateau" durante o período de infecção, houve um ligeiro controle da parasitemia e um prolongamento no dia médio de mortalidade (Tabela V) em relação aos animais controle não repopulados. No entanto, 100% dos animais repopulados morrem antes de 30 dias após inoculação de Ts.

Tabela V - Taxa de mortalidade em camundongos SCID repopulados com células esplênicas e desafiados após 72 horas com os estoques Tc e Ts.

| Grupo | Céls recebidas (2×10^7 céls/animal) | Tempo de desafio | Dose | d.m.m | %mortalidade |
|--------------|--|-----------------------------|-------------|--------------|---------------------|
| SCID | meio RPMI | 72 horas | 10^2 Ts | 19±1,0 | 100% |
| BALB/c | meio RPMI | 72 horas | 10^2 Ts | > 30 | 0% |
| SCID | Células esplênicas | 72 horas | 10^2 Ts | 23±4,0 | 80% |
| SCID | meio RPMI | 72 horas | 10^2 Tc | 19±1,0 | 100% |
| BALB/c | meio RPMI | 72 horas | 10^2 Tc | > 30 | 0% |
| SCID | Células esplênicas | 72 horas | 10^2 Tc | 24±2,0 | 20% |

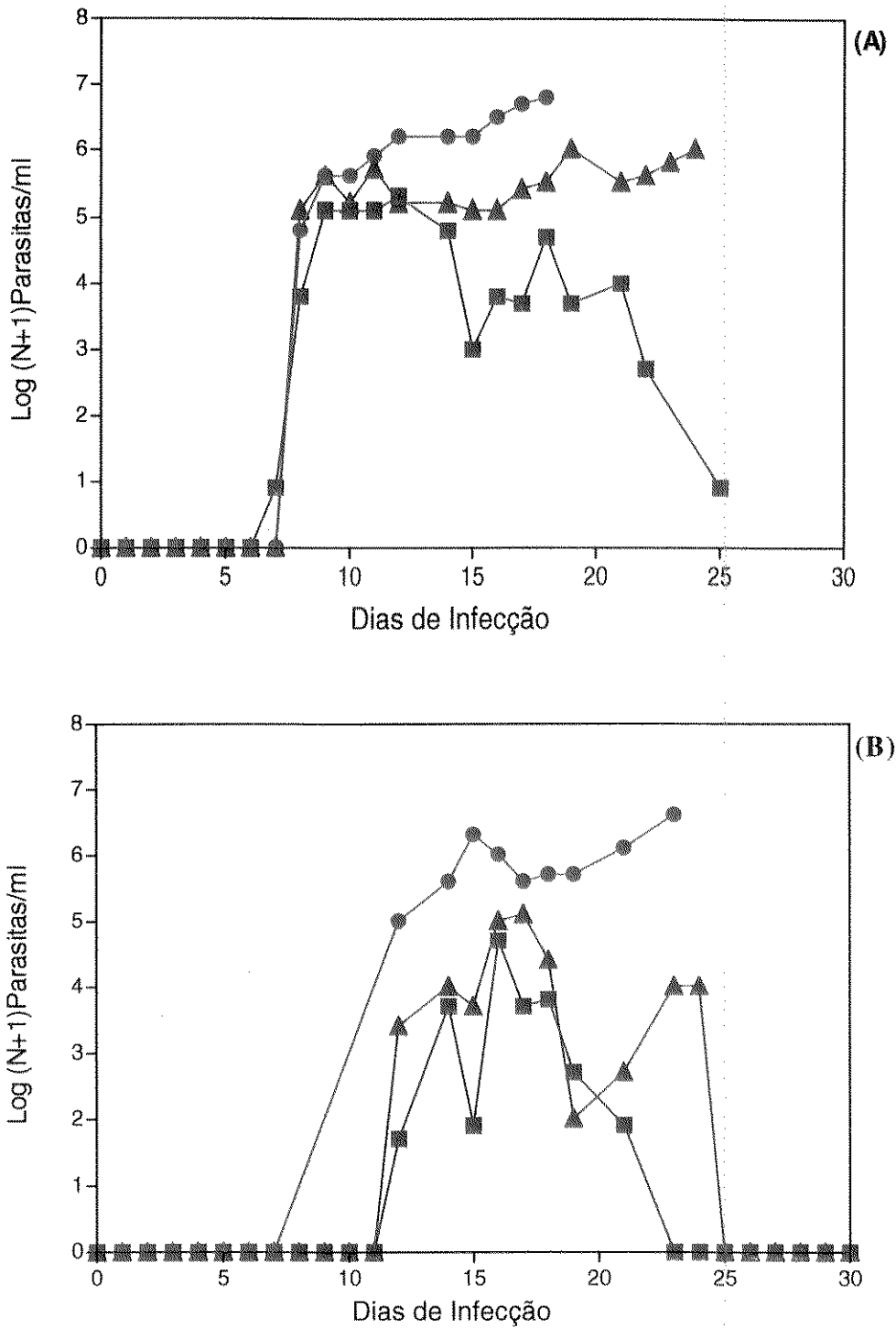


Fig. 5: Perfil de parasitemia em camundongos C.B-17 scid/scid repopulados com 2×10^7 células esplênicas do camundongo BALB/c e após 72 horas desafiados com os estoques Tc e Ts de *T.cruzi*; (*) controle SCID, (■) controle BALB/c, (▲) SCID repopulados com células esplênicas e desafiados com 10^2 Ts **(A)**; (*) controle SCID, (■) controle BALB/c, (▲) SCID repopulados e desafiados com 10^2 Tc **(B)**.

V - O efeito dos anticorpos anti-*T. cruzi* em camundongos C.B-17 scid/scid infectados com o estoque virulento tripomastigota sangüícola.

O efeito dos anticorpos anti-*T.cruzi* na evolução da infecção em camundongos SCID foi estudado utilizando-se dois grupos de experimentos: no primeiro experimento, os animais receberam 0,2 ml de soro anti-*T.cruzi* e foram desafiados após 1 hora com 10^2 Ts. O segundo grupo de animais recebeu a mesma dose do parasita previamente tratada com o mesmo anticorpo.

Os resultados apresentados na fig. 6A mostram que os animais que receberam anticorpos passivamente, ou parasita previamente tratado com o anticorpo, foram capazes de deslocar o período de pré-patência da infecção em 5 dias, em relação ao grupo controle, independentemente da forma de apresentação do anticorpo ao parasita. A evolução da infecção foi similar ao grupo controle com altos níveis de parasitas circulantes.

O segundo experimento de transferência passiva de anticorpo foi realizado com o sentido de verificar se doses adicionais de anticorpos teriam capacidade de alterar a evolução da infecção. Para tal fim, 3 grupos de animais foram utilizados. O primeiro grupo recebeu o soro no mesmo dia em que foram infectados; o 2º grupo recebeu uma dose no mesmo dia e a segunda dose 7 dias após a infecção; e o 3º grupo recebeu as mesmas doses dos grupos anteriores e mais uma dose adicional no 14º dia após a infecção com 10^2 Ts (Fig. 6B). Os resultados mostram que os animais que receberam 1 única dose

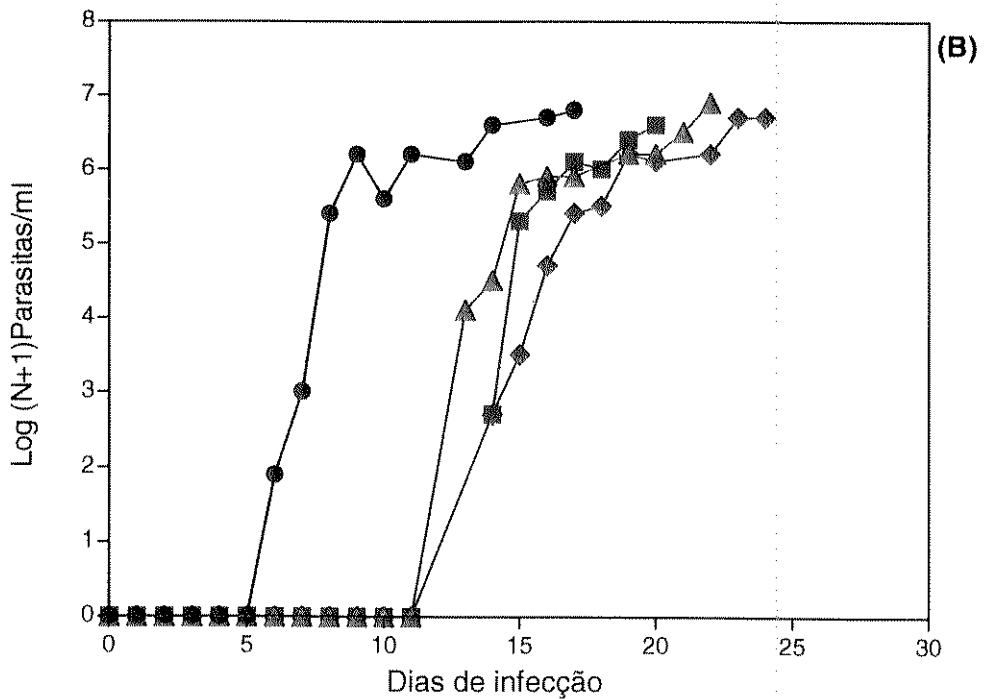
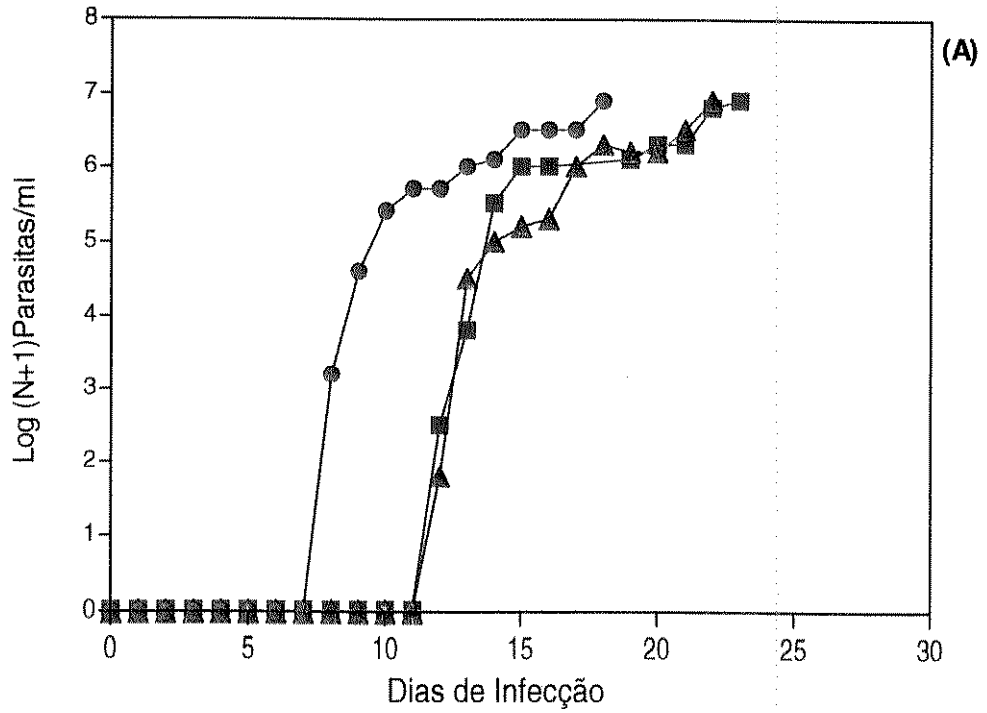


Fig. 6: Efeito do anticorpo anti-*T.cruzi* na evolução da infecção do camundongo C.B-17 scid/scid desafiado com 10^2 tripomastigota sangüícola; (●) controle inoculado com soro normal, (■) parasita opsonizado, (▲) imunização passiva com 1 dose de anticorpos (A). Imunização com várias doses de anticorpos; (●) controle inoculado com soro normal, (▲) 1 dose, (■) 2 doses, (◆) 3 doses (B).

de anticorpo tiveram um deslocamento no período pré-patente de 7 dias, sendo que entre os animais que receberam doses adicionais de anticorpo passivamente não houve um deslocamento no período de pré-patência, em relação ao grupo de animais que recebeu uma única dose de anticorpo. Todos os grupos apresentaram 100% de mortalidade e a diferença esteve presente no dia médio de mortalidade ($23\pm 2,0$ dias) quando comparados com o grupo controle ($16\pm 1,0$ dias Tabela VI).

Tabela VI - Taxa de mortalidade em camundongos C.B-17 scid/scid imunizados passivamente com soro anti-*T. cruzi* e desafiados com o estoque Ts de *T. cruzi*.

| Grupo | Dias de imunização | Desafio | d.m.m. | % mortalidade |
|-------|---------------------------------|-----------|-------------|---------------|
| I | Controle - SN | 10^2 Ts | $16\pm 1,0$ | 100% |
| II | anticorpo anti- <i>T. cruzi</i> | 10^2 Ts | $23\pm 2,0$ | 100% |
| III | Parasita opsonizado | 10^2 Ts | $21\pm 1,0$ | 100% |
| IV | controle - SN | 10^2 Ts | $19\pm 2,0$ | 100% |
| V | anticorpo anti- <i>T. cruzi</i> | 10^2 Ts | $21\pm 1,0$ | 100% |
| VI | 0, 7 | 10^2 Ts | $23\pm 1,0$ | 100% |
| VII | 0, 7, 14 | 10^2 Ts | $23\pm 3,0$ | 100% |

Discussão

O objetivo principal deste trabalho foi verificar o papel das células esplênicas de camundongos na resposta imune ao *T. cruzi*. Para atingir tal objetivo, utilizamos dois estoques da cepa Y de *T. cruzi*: o estoque Tc, de baixa virulência, e o estoque Ts, de maior virulência.

Além disso, utilizamos camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, e camundongos SCID deficientes em células T e B congênitos de BALB/c.

Os camundongos BALB/c, inoculados com as diferentes doses do estoque Ts, mostraram que a forma virulenta induz altos níveis de parasitemia e mortalidade (Fig. 1A, Tab. I), e que entre os animais inoculados com o estoque de virulência atenuada ocorre um controle no nível de parasitemia e mortalidade (Fig. 1B, Tab. I), com uma sobrevivência de 100%, independente da dose. Esses resultados mostram que a resolução da infecção, no camundongo BALB/c, está na dependência da virulência da cepa do parasita, uma vez que o cultivo em meios de cultura induz uma atenuação da virulência, selecionando formas mais aptas a se desenvolverem em meios artificiais (Goldberg et alii, 1983).

Resultados anteriores obtidos por Camargo et alii (1989) demonstraram que os camundongos CBA apresentaram um comportamento similar frente ao estoque Tc da cepa Y. Observaram, ainda, que os animais inoculados com este estoque possuíam maior atividade fagocítica de carbono coloidal em relação àqueles inoculados com o estoque Ts. Essa diferença na capacidade dos dois estoques de parasitas da cepa Y em infectar macrófago foi descrita por Nogueira et alii (1981).

Camargo et alli (1991), observaram que na inoculação de diferentes formas evolutivas de *T. cruzi*, como epimastigota, tripomastigota e amastigota, 24-72 horas anteriores ao desafio com 10^5 Ts, apenas a forma tripomastigota induzia um aumento na resistência, sendo que esta estava diretamente correlacionada à capacidade da forma tripomastigota viva de induzir estimulação das células do hospedeiro com capacidade de resistir a infecção.

Os resultados aqui apresentados mostram que o parasita da mesma cepa com variação antigênica pode ser usado como um modelo de estudo da interação parasita-hospedeiro utilizando uma mesma linhagem de camundongo, visto que um dos aspectos que têm dificultado a análise da evolução da doença de Chagas é a utilização de várias cepas de parasita e associações na indução de resistência utilizando parasitas de cepas diferentes e várias linhagens de camundongos (Trischmann, 1978; Tarleton, 1991; Rowland & Ritter, 1984).

Após a caracterização da linhagem BALB/c, infectada com os dois estoques do parasita da cepa Y de *T. cruzi*, o mesmo processo foi realizado em camundongos C.B-17 scid/scid. Essa linhagem é congênita de BALB/c, diferindo no haplótipo de cadeia pesada (H) das imunoglobulinas, além da ausência de linfócitos T e B funcionais, e com uma população normal de monócitos granulócitos e células NK. Os resultados dessa infecção mostraram que ambos os estoques foram capazes de induzir à infecção com altos níveis de parasita circulante e mortalidade, quando comparados com camundongos BALB/c (Fig. 2A, 2B).

O fenômeno da exacerbação da infecção tem sido descrito por Kierszenbaum & Pienkowschi (1979) em animais imunodeficientes nu/nu, inoculados com a cepa Tulahuén; por Trischmann et alli (1978), com a cepa Brazil em animais nu/nu com "background" genético de animais resistentes e susceptíveis, e por Russo et alli (1989), com a cepa Colombian e CL de *T. cruzi*, mostrando a participação das células T no controle do nível de parasitemia e na regulação da infecção.

Na infecção com *Listeria monocytogenes*, utilizando camundongos SCID, Bancroft et alli (1986) observaram que os animais desenvolvem uma infecção crônica com ausência da formação de granulomas em relação ao camundongo C.B-17 +/+, e com macrófagos expressando moléculas Ia em ambas as linhagens. Bancroft et alli (1989) demonstraram que o mecanismo de ativação dos macrófagos, no camundongo SCID infectado com *L. monocytogenes*, era dependente de IFN- γ . Assim, conduziram os experimentos com a depleção "in vivo" de IFN- γ em camundongos BALB/c, e observaram uma exacerbação na concentração da bactéria no baço e fígado. Posteriormente, esclareceu-se que, na infecção por *L. monocytogenes*, o mecanismo de produção de IFN- γ pelas células NK é dependente da interação bactéria e macrófago, através de cofatores que eram capazes de estimular as células NK (Bancroft et alli, 1991).

Entretanto, os nossos dados mostraram que na infecção de camundongos SCID com a cepa Y de *T. cruzi* houve uma exacerbação da infecção com letalidade, mesmo quando esses animais foram inoculados com

baixas doses do parasita, mostrando que, se o mecanismo regulatório envolvendo parasita, macrófago, células NK e produção de IFN- γ foi estimulado, aparentemente não induziu uma alteração significativa na evolução da doença, sugerindo a importância de populações linfocitárias na regulação da infecção.

A regulação da infecção chagásica experimental tem sido atribuída à presença de linfócitos T, por possuírem a capacidade de amplificar ou suprimir a resposta imune para o controle da multiplicação do parasita (Trischmann, 1984; Tarleton, 1991b e 1995; Rodrigues et alli, 1991).

Os resultados deste trabalho mostram que os experimentos de proteção realizados com a repopulação do camundongo SCID, com células esplênicas totais do camundongo BALB/c e desafio em períodos diferentes com 10^5 Tc, que todos os grupos de animais possuíam a capacidade de controlar o nível de parasitas circulantes, sendo que, com uma maior eficiência nos animais com 5 e 24 dias de repopulação (Fig. 3B) e com mortalidade parcial nos animais de 24 dias de repopulação (Tab. III) onde podemos observar que o camundongo SCID reconstituído por um longo período adquiri características de um animal imunocompetente (Bosma, 1993; Sprent 1991). Não existe uma correlação direta entre o mecanismo de controle de parasitas circulantes e morte dos animais, conforme descrito por Wrightsman et alli (1982) e Minoprio (1987). Com relação ao controle da parasitemia, encontra-se respaldo nas observações de Kierszenbaum & Pienkowschi (1979) e Trischmann (1983) de que o controle da parasitemia é regulado por linfócitos T na fase aguda da infecção.

Nos estudos da dinâmica da reconstituição celular, Sprent et alli (1991) demonstraram que, no período de 4-24 horas após a inoculação de células, 40-60% das células do doador podem ser encontradas no baço e linfonodo com a restauração de ambas as imunidades humoral e celular. Entretanto, a implantação efetiva das células linfóides ocorre em um período de 8 semanas, de reconstituição, com predominância de linfócitos T CD3⁺ (15-20%) e, quando repopulados com timócitos 5×10^7 céls/animal, estabelecia 80-95% de populações de células TCD4⁺ (Rudolphi et alli, 1991).

Com base nessas informações, podemos inferir que os nossos resultados mostraram dois fenômenos distintos: o primeiro é correlacionado com o controle de parasitas circulantes demonstrado pela diferença no nível de parasitemia após um curto período de repopulação celular e desafio com o parasita e o segundo fenômeno o controle da mortalidade, requerendo um período maior de reconstituição anterior ao desafio, ou a implantação das populações linfocitárias nos órgãos linfóides secundário.

Com o estabelecimento da repopulação com 2×10^7 células do doador, procurou-se verificar a influência da dose do parasita na regulação da infecção. Os resultados mostraram que o efeito das células esplênicas ou timócitos, frente ao desafio com as duas doses do parasita 10^3 ou 10^2 formas de Tc mostraram um controle efetivo da infecção, quando os animais receberam as células esplênicas, ao passo que, com os timócitos, as condições foram apenas

capazes de regular o nível de parasitas circulantes (Fig. 4) devido ao fato da diferença existente na concentração de timócitos imaturos no timo.

A diferença nas populações linfocitárias, além da presença de linfócitos B nas células esplênicas, está na concentração de linfócitos T maduros. Segundo Lopes et alli (1995), as células esplênicas de camundongos BALB/c normais apresentam 30% de células CD4⁺ e 13% de células CD8⁺, e os timócitos, segundo Godfraind et alli (1995), apresenta 14% de células CD4⁺ e 2% de células CD8⁺, com a predominância de células CD4CD8 duplo positiva. Com os resultados obtidos com os timócitos, podemos inferir que os linfócitos CD4⁺ regulam os parasitas circulantes conforme descrito por Minóprio et alli (1987).

O desafio com 10² formas do estoque virulento (Ts) da cepa Y em animais repopulados com as células esplênicas (Fig. 5A) não mostrou efeito significativo na regulação da infecção quando comparado com os animais desafiados com o estoque de virulência atenuada (Tc) que foi eficiente em controlar o nível de parasitemia e mortalidade, devido as diferenças antigênicas existentes entre os estoques.

Essa incapacidade na regulação da infecção causada pelo Ts pode ser devida ao fato de que o parasita provoca uma estimulação diferenciada do macrófago (Camargo et alli, 1989; Nogueira et alli, 1981), além disso, os trabalhos recentes de Rottemberg et alli (1995) mostram que animais CD8⁻ morrem, quando inoculados com a cepa virulenta, e sobrevivem, com a cepa de

baixa virulência; nos animais $CD4^+$, há um aumento na susceptibilidade à infecção com ambas as cepas de parasita, mostrando a importância dos linfócitos T na fase inicial da infecção, e mostrando também que o “background” genético do parasita influencia ou seleciona na estimulação de linfócitos T, com capacidade de regular a infecção pelo *T. cruzi*.

Os estudos realizados em camundongos SCID, repopulados com células esplênicas de BALB/c e desafiados com *L. major* (Varkila et alii, 1993), mostraram a influência do número de células inoculadas na evolução da infecção, onde com a dose de 5×10^6 células esplênicas, o animal sobrevive, e, acima da concentração de 7×10^7 , os animais morrem.

O conjunto de informações nos permite sugerir que, nos animais imunodeficientes repopulados ou deficientes em uma subpopulação de linfócito T, o papel dos linfócitos T $CD4^+$ é de importância crucial no controle da infecção com o estoque avirulento de parasitas, onde aparentemente os linfócitos T $CD8^+$ seriam menos efetivos. No caso do estoque virulento de parasitas há a necessidade de uma interação $CD4^+$, $CD8^+$, onde os linfócitos T $CD4^+$ teriam uma função efetora na fase inicial na regulação dos linfócitos T $CD8^+$.

Os experimentos de proteção com a transferência passiva de anticorpo anti-*T. cruzi* foram realizados com soro de F1(C57BL/10 x CBA/J), previamente caracterizado por Brito (1988) com alta concentração de anticorpos anti-*T. cruzi* da subclasse IgG2a e com 100% de eficiência protetora quando injetados em camundongos CBA. A inoculação de parasitas opsonizados ou transferência

passiva de anticorpos em camundongos SCID não afetou a sobrevivência nem refletiu no nível de parasitemia se comparada ao controle. A diferença foi observada no deslocamento da pré-patência de 4 dias após o início da infecção do grupo controle (Fig. 6A) e com um perfil de infecção semelhante ao camundongo SCID inoculado com 1 forma do parasita.

Em vista do deslocamento do período de pré-patência, o efeito adicional de doses de anticorpo, a cada 7 dias, na evolução da infecção observou-se que os anticorpos atuam eficientemente apenas no período de pré-patência e as doses adicionais dos anticorpos não alteraram a infecção. É possível que esses efeitos sejam pela presença de parasitas antigênicamente distintos, ou pela velocidade do catabolismo do anticorpo inoculado passivamente (Fig. 6B).

O efeito do anticorpo anti-*T. cruzi*, em camundongos nu/nu, foi estudado por Kierszenbaum (1980), a partir de um tratamento diário com os anticorpos observando o controle da parasitemia durante o período de tratamento. Segundo o autor, não foi observado nenhuma diferença entre a inoculação dos anticorpos realizada 1 dia antes ou após a infecção. Com a suspensão do tratamento havia o aparecimento do parasita circulante.

Ao compararmos o perfil da evolução da infecção em animais imunocompetentes (CBA), que receberam passivamente o anticorpo, não se observa desvio no período de pré-patência, e o dia do pico permanece o mesmo porém, há uma diminuição no nível de parasita circulante (Gavino, 1985).

Estes fatos mostram que tanto no scid/scid como no nu/nu com sistema fagocitário normal, apesar de o anticorpo aumentar a eficiência da internalização do parasita, o macrófago pode modular sua multiplicação ativando a síntese de NO, o que indica que os macrófagos e as células NK não foram eficientes na modulação da infecção mostrando a necessidade dos linfócitos T ou citocinas secretadas.

Os trabalhos que têm demonstrado a importância da resposta imune humoral ao *T. cruzi*, sugerem que esses anticorpos possuem diferentes funções.

A atividade protetora dos soros segundo Brener 1980 estaria restrita à fase crônica da infecção chagásica, com restrição ao isotipo IgG2 (Takehara et alii 1981) e com atividade lítica, demonstrado pela capacidade dos anticorpos de ligarem a determinantes antigênicos presentes na forma sanguícola, induzindo a lise na presença de complemento (Kretzli & Brener 1982). Com base nessas informações Martins et alii 1985 demonstraram que somente os anticorpos líticos ligados ao tripomastigota foram capazes de mediar a ADCC.

Outra função imune importante foi observada por Scott e Moyes (1982), através do inóculo de parasitas opsonizados em animais normais onde foi verificada uma diminuição da infectividade observado pelo aumento da fagocitose por macrófagos do baço e fígado.

Umekita et alii (1988) demonstraram que o "clearance" imune de parasitas é devido a opsonização seguida pela remoção da circulação através da fagocitose e sugere que o "clearance" pode ser mediado pela aderência do

parasita opsonizado a macrófago através da porção Fc. Em 1989, a autora observou que há uma agregação de plaquetas em parasitas opsonizados, ocasionando a lise pela secreção de enzimas proteolíticas, mostrando a dependência desse fenômeno da presença de receptores para o componente 3 do sistema complemento.

Diferentes células não linfóides estão envolvidas nesse fenômeno. O camundongo SCID, particularmente, possui este mecanismo de defesa, que tem sido importante para mediar proteção em algumas infecções. Assim sendo, os resultados apresentados mostraram que o anticorpo, na ausência da resposta celular, não foi suficiente para conferir proteção.

O conjunto de resultados obtidos neste trabalho mostrou que somente animais que receberam células esplênicas totais do camundongo BALB/c, foram capazes de obter proteção sugerindo que uma resposta imune protetora para infecção com *T. cruzi* requer a combinação de vários mecanismos, incluindo linfócitos T e B, células NK, células não linfóides como macrófagos, e células polimorfonucleares (Trischmann, 1978, 1983, 1984; Tarleton, 1991).

Conclusões

1- Os camundongos BALB/c apresentaram 100% de sobrevivência quando inoculados com as diferentes doses e estoques do *T. cruzi*, sendo considerado resistentes ao parasita. Nos camundongos C.B-17 scid/scid, a infecção experimental foi fatal, com elevados níveis de parasitemia, independente da dose e estoque do parasita, sendo considerados susceptíveis a infecção.

2- O perfil de parasitemia dos camundongos C.B-17 scid/scid, desafiados 1 e 24 horas, 5 e 24 dias após a repopulação com células esplênicas de camundongos BALB/c, era diferente do perfil dos animais controle, não repopulados, sugerindo que o conjunto de células que formam os órgãos linfóides contribuem para o controle da infecção.

3- A repopulação de camundongos C.B-scid/scid com células tímicas mostrou-se eficiente no controle do nível de parasitemia.

4- O camundongos C.B-17 scid/scid comportaram-se como um animal imunocompetente após 72 hs de repopulação com as células esplênicas e desafio com 10^2 formas do estoque avirulento Tc, mostrando-se capazes de controlar o nível de parasitemia e mortalidade

5- O controle da parasitemia e/ou mortalidade está na dependência do tempo entre o inóculo das células e desafio com o parasita.

6- Os camundongos C.B-17 scid/scid tratados com soro anti-*T. cruzi* apresentaram um deslocamento no período de pré-patência, mas não foi suficiente para controlar o nível de parasitemia e, conseqüentemente, a infecção.

Summary

In order to investigate the experimental Chagas disease, normal BALB/c mice and deficient C.B-17 scid/scid in functional T and B lymphocytes were inoculated with different doses of Tc and Ts storages of the Y strain of *Trypanosoma cruzi*. The results obtained showed a lethal infection only in SCID mice.

This profile was changed significantly after the repopulation of SCID mice with 2×10^7 splenic cells of BALB/c mice and challenges with the Tc storage at different intervals, showing a deviation of the parasitemia levels and the mortality control.

In the animals repopulated with thymic cells a change was observed in the parasitemia level.

To verify the role of the antibody in the absence of cellular immunity, SCID mice were immunized passively with various doses of anti-*T.cruzi* serum obtained from infected animals.

A dislocation was then observed, in the pre-patent period only in the animals that received a unique dose of antibodies.

The group of results indicated that the splenic cells were effective in the control of the parasitemia and mortality level, while the thymic cells were effective in the control of parasitemia level, stressing the importance of cellular and humoral immunity in the development of a protecting response during the period of infection.

Referências Bibliográficas

- ADAMS, L. B., HIBBS, J. B., TAINTOR, R. R., AND KRAHEENBUHL, J. L. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*: role for synthesis of inorganic nitrogen from L-arginine. **J. Immunol.** **144**: 2725-29, 1990.
- ALIBERTI, J. C. S., CARDOSO, M. A. G., MARTINS, G. A., GAZZINELLI, R. T., VIEIRA, L. Q., SILVA, J. S. Interleukin 12 mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.** **64**: 1961-67, 1996.
- AMIRI, P., LOCKSLEY, R. M., PARSLOW, T. G., SADICK, M., RECTOR, E., RITTER, D., MCKERROW, J. H. Tumour necrosis factor alpha restores granulomas and induces parasite egg-laying in schistosome-infected scid mice. **Nature** **356**: 604-7, 1992.
- ARAUJO-JORGE, T. C. The biology of *T. cruzi* macrophage interaction. **Memb. Inst. Osw. Cruz** **84**: 441-62, 1989.
- BANCROFT, G. J. AND UNANUE, E. R. Natural immunity: A T-cell-independent pathway of macrophage activation defined in the scid mouse. **Immunol. Res.** **124**: 5-24, 1991.
- BANCROFT, G. J., BOSMA, M. J., BOSMA, G. WAZZU C. AND UNANUE, E. R. Regulation of macrophage Ia expression in mice with severe combined immunodeficiency: induction of Ia expression by a T cell-independent mechanism. **J. Immunol.** **137**: 4-9, 1986.
- BANCROFT, G. J., SHEEHAN K. C., SCHREIBER, R. D. AND UNANUE, E. R. Tumor necrosis factor is involved in the T cell-independent pathway of macrophage activation in scid mice. **J. Immunol.** **143**: 127-30, 1989.
- BEN-YOUNÈS-CHENNOUFI, A., SAID, G., EISEN, H., DURAND, A. AND JOSKOWICZ-HONTEBEYRIE, M. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells (CD4⁺). **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.** **82**: 84-89, 1988.
- BOSMA, G. C., CUSTER, R., AND BOSMA, M. J. A severe combined immunodeficiency mutation in the mouse. **Nature**, **301**: 527-30, 1983.

- CAMARGO, J. B. I., SAKURADA, J. K., ZUCATO, M. R., ARAUJO, M. F. AND RANGEL, H. A. The early phase of the immune response of CBA mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immun. Lett.** **20**: 213-16, 1989.
- CAMARGO, M. E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of american trypanosomiasis: Technical modification employing preserved culture forms of *Trypanosoma cruzi* in slide test. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo.** **8**: 227-34, 1966.
- CARDILLO, F., VOLTARELLI, J. C., REED, S. G. AND SILVA, J. S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: role of NK cells. **Infect. Immun.** **64**: 128-34, 1996.
- CIESLAK, P. R., VIRGIN IV, H. W. AND STANLEY, S. LA severe combined immunodeficient (SCID) mouse model for infection with *Entamoeba histolytica*. **J. Exp. Med.** **176**: 1605-09, 1992.
- COFFMAN, R. L., SEYMOUR, B. W., LEBMAN, D. A., HIRAKI, D. D. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol. Rev.** **102**: 5-28, 1988.
- CUSTER R., BOSMA, G. C. AND BOSMA M. J. Severe combined immunodeficiency (SCID) in the mouse: pathology, reconstitution, neoplasms. **Am. J. Pathol.** **120**: 464-76, 1985.
- CZITRON A. A., EDWARDS, S., PHILLIPS, R. A., BOSMA, M. J., MARRACHK, AND KAPPLER, J. W. The function of antigen-presenting cells in mice with severe combined immunodeficiency. **Res. Immunol.** **134**: 2276-80, 1985.
- DeSOUZA, W. Cell biology of *Trypanosoma cruzi*. **Int. Rev. Cytol.** **86**: 197-283, 1984.
- DING, A. H., NATHAN, C. F. AND STUEHR, D. S. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparison of activating cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.** **141**: 2407-12, 1988.

- DORSHKIND, K., KELLER, G. M., PHILLIPS, R. A., MILLER, R. G., BOSMA, G. C., O'TOOLE, M. AND BOSMA, M. J. Functional status of cells from lymphoid and myeloid tissues in mice with severe combined immunodeficiency disease. **J. Immunol.** **132**: 1804-08, 1984.
- GAVINO, V. A. Doença de Chagas: Atividade protetora dos soros de camundongos infectados com formas tripomastigotas sanguíneas ou de cultura de tecido. **Tese de Mestrado**, 1985.
- GAZZINELLI, R. T., OSWALD, I. P., HIENY, S., JAMES, S. L. AND SHER, A. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . **Eur. J. Immunol.** **22**: 2501-06, 1992.
- GODFRAIND, C., HOLMES, V. K. AND COUTELIER, J. P. Thymus involution induced by mouse hepatitis virus A59 in BALB/c mice. **J. Virol.** **69**: 6541-47, 1995.
- GOLDBERG, S. S. & PEREIRA, A. A. S. Enzyme variation among clones of *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.** **69**: 91-96, 1983.
- GORDON, B. E., DURFEE, W. J., BENNETT, M., AND PAKER, S. P. Differential white blood cell counts as a preliminary screen for severe combined immunodeficient congenic mice. **Lab. animal science.** **41**: 255-257, 1991.
- GOTTSTEIN, B., MESARINA, B., TANNER, I., AMMAN, R. W., WILSON, J. F., ECKERT, J. AND LANIER, A. Specific cellular and humoral immune responses in patients with different long-term courses of alveolar echinococcosis (infection with *Echinococcus multilocularis*). **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **45**: 734-42, 1991.
- HARP, J. A., CHEN, W., HARMSEN A. G. AND HAVELL E. A. Importance of gamma interferon in resistance of severe combined immunodeficient (SCID) mice to infection with *Cryptosporidium parvum*. **Infect. Immun.** **60**: 3509-12, 1992.
- HATCHER, F. M. & KUHN, R. E. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural Killer cells. **Science** **218**: 295-96, 1982.

- HOFF, R. Killing in vitro of *Trypanosoma cruzi* by macrophages from mice immunized with *T. cruzi* or BCG, and absence of cross-immunity on challenge in vivo. **J. Exp. Med.** **142**: 299-311, 1975.
- HOLADAY, B. J., SADICK, M. D., WANG, Z. E., REINER, S. L., HEINZEL, T. G., PARSLow, T. G. AND LOCKSLEY, R. M. Reconstitution of *Leishmania* immunity in severe combined immunodeficient mice using Th1 and Th2 like cell lines. **J. Immunol.** **147**: 1653-58, 1991.
- HUNTER, C. A., SLIFER, T. AND ARAUJO, F. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.** **64**: 2381-86, 1996.
- JAMES, S., KIPNIS, T., SHER, A. AND HOFF, R. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. **Infect. Immun.** **35**: 588-93, 1982.
- JOHNSON, L. L. A protective role for endogenous tumor necrosis factor in *Toxoplasma gondii* infection. **Infect. Immun.** **60**: 1979-83, 1992.
- JOSKOWICZ, M. J. AND MINOPRIO, P. Chagas'disease: *Trypanosoma cruzi* vs. the host immune system. **Res. Immunol.** **142**: 125-29, 1991.
- JURI, M. A., FERREIRA, A., RAMOS, A. AND HOECKER, G. Non-lytic antibodies in H-2 controlled resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **Bras. J. Med. Biol. Res.** **23**: 685-95, 1990.
- KIERSZENBAUM F. AND HOWARD, J. G. Mechanisms of resistance against experimental *Trypanosoma cruzi* infection: the importance of antibody and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. **J. Immunol.** **116**: 1208-11, 1976.
- KIERSZENBAUM, F. AND PIENKOWSHI, M. M. Thymus-dependent control of host defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. **Inf. Immun.** **24**: 117-20, 1979.

- KIERSZENBAUM, F. KNEDIT, E., BUDZKO, D. B. AND PIZZIMENT, M. C. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **112**: 1839-44, 1974.
- KIERSZENBAUM, F. Protection of congenitally athymic mice against *Trypanosoma cruzi* infection by passive antibody transfer. **J. Parasitol.** **66**: 673-75, 1980.
- KRETTLI, A. U. AND BRENER Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.** **116**: 755-60, 1976.
- KRETTLI, A. U. AND BRENER, Z. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti-living trypomastigote antibodies. **J. Immunol.** **128**: 2009-12, 1982.
- KRETTLI, A. U., WEISZ-CARPINGTON, AND NUSSENZWEIG, R. S. Membrane-bound antibodies to bloodstream *Trypanosoma cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. **Clin. Exp. Immunol.** **37**: 416-23, 1986.
- KRETTLI, A.U. Exacerbation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection in mice by concomitant malaria. **J. Protozool.** **24**: 514-18, 1977.
- LIEW, F. Y AND COX, F. . E. G. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. **Immunoparasitol. Today** **7**: A17-A21, 1991.
- LOPES, M. F., VEIGA, V. F., SANTOS, A. R., FONSECA, M. E. F. AND DosREIS, G. A. Activation-induced CD4⁺T cell death by apoptosis in experimental Chagas'disease. **J. Immunol.** **154**: 744-52, 1995.
- MANCINI, G., CARBONARA, A. O. & HEREMANS, J. F. Immunochemical quantitation of antigens by single radial immunodiffusion. **Immunochemistry** **2**: 235-41, 1965.
- MARTINS, M. V. C. L., SANCHEZ, G. P., KRETTLI, A. U. AND BRENER, Z. Antibody-dependent cell cytotoxicity (ADCC) against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunol.** **7**: 367-76, 1985.

- MACCABE, R. E. AND MULLINS, B. T. Failure to *Trypanosoma cruzi* to trigger the respiratory burst of activated macrophages mechanism for imune evasion and importance of oxigen-independent killing. **J. Immunol.** **144**: 2384-88, 1990.
- MACCABE, R. E., MAGLER, S. G. AND MULLINS, B. T. Endogenous interferon gamma, macrophage ativation and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Infect. Dis.** **163**: 912-15, 1991.
- MCDONALD, V., DEER, R., UNI, S., ISEKI, M. AND BANCROFT, G. J. Immune responses to *Cryptosporidium muris* and *Cryptosporidium parvum* in adult immunocompetent or immunocompromised (nude and scid) mice. **Infect. Immun.** **60**: 3325-31, 1992.
- MEAD, J. R., ARROWOOD, M. J., DISWELL, R. S. AND HEALEY, M. C. Chronic infections in congenitally immunodeficient scid and nude mice. **J. Infect. Dis.** **163**: 1297-1303, 1992.
- MINOPRIO, P. Chagas' disease: CD5 B-cell-dependent Th2 pathology? **Res. Immunol.** **142**: 137-40, 1991.
- MINOPRIO, P. M., EISEN, H., FORNI, L., D'IMPERIO LIMA, M. R., JOSKWICZ, M. AND COUTINHO, A. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. **Scand. J. Immunol.** **24**: 661-68, 1986.
- MINOPRIO, P., CHEIKH, M. C. E., MURPHY, E., HONTEBEYRIE-JOSCKOWICZ, M., COFFMAN, R., COUTINHO, A. AND O'GARRA, A. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN- γ dependent. **J. Immunol.** **151**: 4200-08, 1993.
- MINOPRIO, P., EISEN, H., JOSKOWICZ, M., PEREIRA, P. AND COUTINHO, A. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* -infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. **J. Immunol.** **139**: 545-49, 1987.
- MOSMANN, T. R. AND MOORE, K. W. The role os IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Parasitol. Today.** **7**: A49-A53, 1991.

- NATHAN, C., NOGUEIRA, N., JUANGBHANICH, C., ELLIS, J. AND COHN, Z. Activation of macrophages in vivo and in vitro. Correlation between hydrogen peroxide release and killing of *Trypanosoma cruzi*. **J. Exp. Med.** **149**: 1056-68, 1979.
- NELSON, F. K., GREINER, D. L., SHULTZ, L. D. AND RAJAN, T. V. The immunodeficient scid mouse as a model for human lymphatic filariasis. **J. Exp. Med.** **173**: 659-65, 1991.
- NOGUEIRA, N. AND COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. **J. Exp. Med.** **148**: 288-300, 1978.
- NOGUEIRA, N., ELLIS, J., CHAPLAN, S. AND COHN, Z. *Trypanosoma cruzi*: In vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** **51**: 325-34, 1981.
- OKABE, K., KIPNIS, T. L., GALICH, L. G. AND SILVA, D. Cell-mediated cytotoxicity to *Trypanosoma cruzi*. I- Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypomastigote bloodstream forms. **Clin. Immunol. Immunopathol.** **16**: 344-53, 1980.
- POWELL, M. R. AND WASSOM, D. L. Host genetic and resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Parasite Immunol** **15**: 215-21, 1993.
- REED, G. S., BROWNELL, C. E., RUSSO, D. M., SILVA, J. S., GRABSTEIN, K. H. AND MORRISSEY, J. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** **153**: 3135-40, 1994.
- REED, S. G. Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocytes enriched spleen cells. **Infect. Immun.** **28**: 404-10, 1980.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R., PIRMEZ, C., SAVINO, W. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. **Res. Immunol.** **142**: 134-36, 1991.
- ROBERSON, E. L., CHAPMAN JR. W. L. AND HANSON, W. L. The effects of total body X-irradiation on *Trypanosoma cruzi* infection (Chagas'disease) in mice and rats. **Z. Parasitenkd.** **41**: 84-94, 1973a.

- ROBERSON, E. L., HANSON, W.L. & CHAPMAN, W. L. *Trypanosoma cruzi*: effects of anti-thymocytes serum in mice and neonatal thymectomy in rats. **Exp. Parasitol.** **34**: 168-73, 1973b.
- RODRIGUEZ, A. M., SANTORO, F., AFCHAIN, D., BAZIN, H. AND CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi* infection in B-cell-deficient rats. **Infect. Immun.** **31**: 524-29, 1981.
- RODRIGUEZ, A. M., AFCHAIN, D., SANTORO, F., BAZIN, H. & CAPRON, A. Parasitological and immunological aspects of *Trypanosoma cruzi* infection in nude rats. **Z. Parasitenkd.** **69**: 141-46, 1983.
- RODRIGUES-de-CUNHA, C., KIERSZENBAUM, F., WIRTH, J. J. Binding of the specific ligand to Fc receptors on *Trypanosoma cruzi* increases the infective capacity of the parasite. **Immunology** **72**: 114-20, 1991.
- ROTTEMBERG, M. E., SPORRONG, L., PERSON, I., WIGZELL, H., ORN, A. Cytokine gene expression during infection of mice lacking CD4 and/or CD8 with *Trypanosoma cruzi*. **Scand. J. Immunol.** **41**: 164-70, 1995.
- ROTTEMBERG, M. E., CARDONI, R., ANDERSSON, R., SEGURA, E., AND ORN, A. Resistance to *Trypanosoma cruzi* requires T helper inducer cells as well as natural killer cells. **Scand. J. Immunol.** **28**: 573-82, 1988.
- ROWLAND, E. C. AND RITTER, D. M. Corpus Christi strain-induced protection to *Trypanosoma cruzi* infection in C3H (He) mice: transfer of resistance to Brazil strain challenge with lymphocytes. **J. Parasitol.** **70**: 760-66, 1984.
- RUDOLPHI, A. SPIEB, S., CONRADT, P., CLAËSSON, M. H. AND REIMANN, J. CD3⁺ T cells, but not CD8⁺ T cells in severe combined immunodeficiency (scid) mice. I- Transferred purified CD4⁺ T cells are engrafted in the spleen of congenic scid mice. **Eur. J. Immunol.** **21**: 523-33, 1991.
- RUSSO, M. AND STAROBINAS, N. Macrophage activation and resistance to *Trypanosoma cruzi* infection. **Res. Immunol.** **142**: 144-45, 1991.

- RUSSO, M., STAROBINAS, N., RIBEIRO-DOS-SANTOS, R., MINOPRIO, P., EISEN, H. AND HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** **11**: 385-95, 1989.
- SACCI, J. B., SCHREIFER, M. E., RESAU, J. H., WIRTZ, R. A., DE TOLLA, L. S., MARKHAM, R. B. AND AZAD, A. F. Mouse model for exoerythrocytic stages of *Plasmodium falciparum* malaria parasite. **Proc. Nat. Acad. Sci.** **89**: 3701-05, 1992.
- SCHMÜNIS, G. A., GONZALEZ-CAPPA, S. M., TRAVERSA, O. C. AND YANOUSKY, J. F. The effects of immunodepression due to neonatal thymectomy in infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** **65**: 89-94, 1971.
- SCOTT, M. T., MOYES, L. ⁷⁵Se-methionine labelled *Trypanosoma cruzi* blood trypomastigotes: opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. **Clin. Exp. Immunol.** **48**: 754-57, 1982.
- SILVA, J. S., MORRISSEY, P. J., GRABSTEIN, K. H., MOLLER, K. M., ANDERSON, D. AND REED, S. G. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** **175**: 169-74, 1992.
- SOONG, L. AND TARLETON, R. L. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2, c-myc, and c-fos gene expression. **J. Immunol.** **149**: 2095-2102, 1992.
- SPRENT, J. SCHAEFER, M., HURD, M., SURCH, C. D. AND RON Y. Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. **J. Exp. Med.** **174**: 717-28, 1991.
- SUN, J. AND TARLETON, R. L. Predominance of CD8⁺T lymphocytes in the inflammatory lesions of mice with acute *Trypanosoma cruzi* infection. **The Am. J. Trop. Med. Hyg.** **48**: 161-69, 1993.
- TAKEHARA, H. A., DA SILVA, A. M. M., BRODSKYN, C. I. AND MOTA, I. A comparative study of anti-*Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection mice. **Immunol. Lett.** **23**: 81-86, 1989.

- TAKEHARA, H. A. PERINE, A., SILVA, M. H. AND MOTA I. *Trypanosoma cruzi*: Role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. **Exp. Parasitol.** **52**: 137-46, 1981.
- TARLETON, R. L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **144**: 717-24, 1990.
- TARLETON, R. L. Regulation of immunity in *Trypanosoma cruzi* infection. **Exp. Parasitol.** **73**: 106-109, 1991.
- TARLETON, R. L. The role of T-cells in *Trypanosoma cruzi* infections. **Parasitol. Today** **11**: 7-9, 1995.
- TARLETON, R. L., KOLLER, B. H., LATOUR, A. & POSTAN, M. - Susceptibility of β_2 -microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature** **356**: 338-340, 1992.
- TARLETON, R. L. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas'disease. **Res. Immunol.** **142**: 130-33, 1991.
- TAYLOR-ROBINSON, A. W. AND PHILLIPS, R. S. Th1 and Th2 CD4⁺ T cell clones specific for *Plasmodium chabaudi* but not for an unrelated antigens protect against blood stage chabaudi infection. **Eur. J. Immunol.** **24**: 158-64, 1994.
- TRISCHMANN T. M. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Parasite Immunol.** **6**: 561-70, 1984.
- TRISCHMANN T. M. AND BLOOM B. R. Genetics of murine resistance to *Trypanosoma cruzi* **Infect. Immun.** **35**: 546-51, 1982.
- TRISCHMANN, T. M. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas'disease. **J. Immunol.** **130**: 1953-57, 1983.

- TRISCHMANN, T., TANOWITZ, H., WITTNER, M. AND BLOOM, B. *Trypanosoma cruzi*: Role of the immune response in the natural resistance of inbred strain of mice. **Exp. Parasitol.** **45**: 160-68, 1978.
- UMEKITA, L. F., TAKEHARA, H. A. AND MOTA I. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Lett.** **17**: 85-89, 1988.
- UMEKITA L. F. AND MOTA I. In-vitro lysis of sensitized *Trypanosoma cruzi* by platelets: role of C3b receptors. **Parasite Immunol.** **11**: 561-66, 1989.
- VARKILA, R. CHATELAIN, R., LEAL, L. M. C. C. AND COFFMAN, R. L. Reconstitution of C.B-17 scid mice with BALB/c T cells initiates a T helper-type-1 response and renders them capable of healing *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.** **23**: 262-68, 1993.
- VESPA, G. N. R., CUNHA, F. Q. AND SILVA, J. S. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.** **62**: 5177-82, 1994.
- VICENDEAU, P. AND DAULAUÉDE, S. Macrophage cytostatic effect on *Trypanosoma musculli* involves an L-arginine dependent mechanism. **J. Immunol.** **146**: 4338-43, 1991.
- WRIGHTSMAN, R., KRASSNER, S. AND WATSON, J. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. **Infect. Immun.** **36**: 637-44, 1982.
- YOSHIDA N. *Trypanosoma cruzi*: Recognition of trypomastigote surface antigens by lytic antisera from mice resistant to acute infection. **Exp. Parasitol.** **61**: 184-91, 1986.