



COORDENAÇÃO DOS CURSOS DE PÓS-GRADUAÇÃO

UNICAMP

AUTORIZAÇÃO PARA QUE A UNICAMP POSSA FORNECER, A PRE-
ÇO DE CUSTO, CÓPIAS DA TESE A INTERESSADOS

Nome do Aluno: REGINA DE FÁTIMA DOS SANTOS BRÁZ

Nº de Identificação: 785320

Endereço para Correspondência: Av: Ponta Negra nº 8852 - Natal - RN

Curso: IMUNOLOGIA

59.000

Nome do Orientador: Dr: ANTONIO CARLOS CORSINI

Título da Dissertação ou Tese: Resistencia na infecção pelo T.cruzi; I
A importância da resposta humoral no período pré-patente da infecção
experimental em camundongos.

Data proposta para a Defesa: 22/06/81

(O Aluno deverá assinar um dos 3 itens abaixo)

1) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas a partir des
ta data, a fornecer, a preço de custo, cópias de minha Dissertação ou
Tese a interessados.

29/5/81

Data

Regina de Fátima S. Bráz
assinatura do aluno

2) Autorizo a Universidade Estadual de Campinas, a fornecer, a
partir de dois anos após esta data, a preço de custo, cópias de minha
Dissertação ou Tese a interessados.

1/1
Data

assinatura do aluno

3) Solicito que a Universidade Estadual de Campinas me consul
te, dois anos após esta data, quanto à minha autorização para o forne
cimento de cópias de minha Dissertação ou Tese, a preço de custo, a in
teressados.

1/1
Data

[Assinatura]
assinatura do aluno

REGINA DE FÁTIMA DOS SANTOS BRAZ

RESISTÊNCIA NA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909):
I. A IMPORTÂNCIA DA RESPOSTA HUMORAL NO PERÍODO PRÉ-PATENTE 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).

Orientador:

Prof. Dr. Antonio Carlos Corsini

Departamento de Microbiologia e Imunologia

Instituto de Biologia

Universidade Estadual de Campinas, UNICAMP

Campinas, São Paulo

1981

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

À Lázara e Manoel, meus pais (in Memorian);
à Claudete (in Memorian), Antonio, Tereza e
Elizabeth, meus irmãos; ao Otom, meu marido,
e ao Uazir.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof.Dr. Antonio Carlos Corsini, pela confiança, apoio, estímulo e orientação científica constantes.

Aos Professores Dr. Humberto de Araújo Rangel, Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro e Dr. Luís Candido de Souza Dias, pela discussão do trabalho e valiosas sugestões.

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 aos colegas de laboratório, pela amizade e colaboração.

Ao pessoal técnico do Departamento de Microbiologia e Imunologia, em especial à Sra. Ismalia Menegon Doné, pelos cuidados com o biotério.

Ao Prof.Dr. Walter August Hadler e ao pessoal técnico do Departamento de Histologia por permitir e colaborar na execução da parte histológica deste trabalho.

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

Às instituições abaixo relacionadas, agradecemos os recursos fornecidos ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia:

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

CONSELHO NACIONAL DE PESQUISA

COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO SUPERIOR

Durante o desenvolvimento deste trabalho a autora foi bolsista da CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento do Pessoal de Ensino Superior).

ÍNDICE

PÁGINA

1 - INTRODUÇÃO	1
2 - MATERIAL E MÉTODOS	8
2.1 - Animais	8
2.2 - Cepa de tripanosoma	8
2.3 - Infecção e reinfecção dos grupos experimentais	9
2.4 - Tratamento dos camundongos com drogas imunossu pressoras	9
2.4.1 - Ciclofosfamida	9
2.4.2 - Hidrocortisona	10
2.5 - Parasitemia	10
2.6 - Esplenectomia	10
2.7 - Imunofluorescência	11
2.7.1 - Preparo das lâminas	11
2.7.2 - Reação	11
2.8 - Histologia	12
3 - RESULTADOS	14
3.1 - Infecção com a cepa CY de <i>T. cruzi</i> em camundon gos (CBAXC ₅₇ ^{B1/10})F ₁ e em Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores	14
3.2 - Reinfecção com a cepa Y de <i>T. cruzi</i> em camundon gos (CBAXC ₅₇ ^{B1/10})F ₁	19
3.3 - Infecção em camundongos (CBAXC ₅₇ ^{B1/10})F ₁ esple nectomizados	22
3.4 - Imunossupressão na fase aguda da infecção . .	23
3.4.1 - Imunossupressão com CY em camundongos (CBAXC ₅₇ ^{B1/10})F ₁	24

3.4.2 - Imunossupressão com HY em camundongos (CBaxC ₅₇ B1/10)F ₁	28
3.4.3 - Imunossupressão com CY em camundongos Biozzi "Bons" respondedores	29
3.4.4 - Imunossupressão com HY em camundongos Biozzi "Bons" respondedores	32
3.5 - Imunossupressão em camundongos (CBaxC ₅₇ B1/10)F ₁ na fase crônica da infecção	32
3.5.1 - Imunossupressão com CY	33
3.5.2 - Imunossupressão com HY	35
4 - DISCUSSÃO	38
5 - RESUMO E CONCLUSÕES	47
6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	49

1 - INTRODUÇÃO

A Tripanosomíase Americana, causada pelo *Trypanosoma* (*Schizotrypanum*) *crusi* (CHAGAS, 1909) é uma entidade mórbida que ocasiona sérios problemas de saúde pública nas Américas. Na América do Sul, de 35 milhões de pessoas vivendo em áreas endêmicas, pelo menos 12 milhões estão atualmente infectadas (WHO, 1977), a maioria dos quais abaixo de 20 anos de idade (CAMARGO, comunicação pessoal).

O parasita é mantido nas áreas endêmicas através do ciclo vetor-hospedeiro. O vetor pertence a Subfamília *Triatominae* e mantém o parasita no intestino, sendo a forma metacíclica eliminada juntamente com as fezes quando o inseto alimenta-se no hospedeiro (BARRETTO, 1968b). Além do homem, várias espécies de mamíferos domésticos e silvestres são encontrados como reservatórios naturais (BARRETTO, 1968a). Além da transmissão da doença pelo vetor, como descrito acima, ainda esta pode se dar congenitamente através da placenta, por transfusão sanguínea e por infecções acidentais em laboratórios (TEIXEIRA, 1977).

A doença de Chagas manifesta-se clinicamente em 3 fases (TEIXEIRA, 1977). A fase aguda caracteriza-se pela presença de tripomastigotas no sangue periférico. Esta fase geralmente é percebida em crianças. Aproximadamente 10% dos indivíduos com a fase aguda da doença morrem de miocardite, meningoencefalite ou infecções intercorrentes. A fase latente manifesta-se após a fase aguda, assim também como em pessoas sem história de fase aguda. Nesta fase, ocorre diminuição da parasitemia e detecta-se anticorpos contra o *T. cruzi* através de vários testes sorológicos. Esta fase acomete 50% dos indivíduos infectados (MACEDO, 1980). Na fase crônica não se observa microscopicamente, parasitas no sangue periférico. Geralmente pessoas

assintomáticas até então, diagnosticadas sorologicamente como tendo doença de Chagas, apresentam anormalidades eletrocardiográficas. O exame microscópio pós-mortem revela miocardite sem parasitas na fibra cardíaca. Podem ocorrer também megaesôfago e megacolon (KÖBERLE, 1968).

É conhecida ainda a existência de diferentes formas clínicas da doença conforme a região geográfica. No entanto, pouco se conhece sobre a influência de fatores genéticos do hospedeiro, sobre a relação entre diferentes cepas e diferentes manifestações clínicas, isto é, sobre as alterações parasita-hospedeiro responsáveis por tais diferenças. Portanto, os estudos padronizados de cepas isoladas de diferentes hospedeiros, em diferentes regiões, se fazem necessários (WHO, 1977). Assim sendo, ANDRADE & ANDRADE (1968) observaram variações quanto aos órgãos afetados por diferentes cepas, relacionando estas observações a diferentes manifestações clínicas da doença nas diferentes áreas geográficas.

Os problemas de ordem prática no controle da doença de Chagas são: a impossibilidade de controle dos reservatórios, o alto custo em oferecer melhores moradias à população, as consequências da ação residual de inseticidas e a grande dificuldade de melhoria das condições sócio-econômicas (WHO, 1977).

Além destes aspectos clínicos, sócio-econômicos e políticos da doença de Chagas, a patogenia desta tripanosomíase é ainda controvertida. TEIXEIRA (1975) propõe a existência de hipersensibilidade do tipo retardada mediada por linfócitos citotóxicos dirigidos contra a fibra cardíaca do hospedeiro em decorrência da auto-sensibilização a antígenos do coração. KÖBERLE (1968) propõe a teoria neurotóxica, segundo a qual a desintegração de amastigotas liberaria uma neurotoxina que lesaria os neurônios do sistema nervoso central e/ou periférico. Esta destruição de células nervosas ocorreria principal-

mente ou exclusivamente na fase aguda da doença concluindo assim que: "o destino do chagásico decide-se na fase aguda da doença".

Além dessas possíveis explicações para a patogenia da doença, tem-se apontado a presença de auto-anticorpos contra componentes de fibra cardíaca como outro possível mecanismo patogênico. COSSIO et al (1974, 1977) demonstraram a existência de anticorpos denominados EVI contra a membrana plasmática das células musculares e triadas e células endoteliais do coração, assim como KHOURY et al (1979) demonstraram a existência de anticorpos anti-neurônios do sistema nervoso autônomo e somático.

Embora alguns aspectos da resposta imune na doença de Chagas ainda permaneçam obscuros, tem sido observada a participação tanto humoral quanto celular da resposta imune nesta triponosomíase.

Assim sendo, a inibição da migração de macrófagos e transformação linfocitária na presença de antígenos de *T. cruzi* bem como a diminuição da resistência à infecção por timectomia e soro anti-timócito tem comprovado a importância da resposta imune mediada por células na infecção chagásica (HANSON, 1976). YANOVSKY & ALBADO (1972) demonstraram que leucócitos de indivíduos chagásicos mostraram marcado grau de inibição da migração na presença de antígenos de *T. cruzi*. Além disso, a resistência à infecção tem sido transferida de animais infectados para recipientes normais por células linfóides (TEIXEIRA, 1977). Da mesma maneira, BURGESS & HANSON (1979) obtiveram certo grau de proteção dos camundongos transferidos com macrófagos peritoniais, linfócitos esplênicos e de linfonodos de doadores imunizados.

CORSINI & STELINI JR. demonstraram que camundongos timectomizados, irradiados e reconstituídos com células de fígado fetal, foram extremamente susceptíveis à infecção, tornando-se resis-

tentes quando reconstituídos com células T de animal imune. Estes autores observaram também que o soro imune protegeu os animais recons-
tituídos com células T normais, mas foi ineficaz em relação aos ani-
mais não reconstituídos. KIERSZENBAUM & PIENKOWSKI (1979) verifica-
ram que camundongos atímicos nu/nu foram mais susceptíveis à infec-
ção que os controles normais, porém quando transplantados com timo
de animais isogênicos recuperaram o nível de resistência.

Por outro lado, o papel dos anticorpos na doença de Chagas tem sido estudado tanto "in vivo" quanto "in vitro". Assim sendo, tem sido observado "in vitro" que o soro imune de vários mamí-
feros lisam epimastigotas mantidos em cultura (GOBLE, 1970; TEIXEIRA, 1977). TEIXEIRA & SANTOS-BUCH (1974) verificaram que tripomastigotas obtidos em cultura, incubados com soro imune de coelho e de pacientes na fase crônica, transformaram-se em amastigotas em 24 a 48 horas e em epimastigotas em 48 a 72 horas. A adição de complemento de cobaia não lisou os tripomastigotas.

No entanto, KRETTLI & EISEN (1980) observaram que dos tripomastigotas das cepas Y e CL que apresentavam imunoglobulinas em sua membrana, apenas os da cepa Y foram lisados quando na presença de complemento. Do mesmo modo, KRETTLI & BRENER (1976) demonstraram "in vivo" que as cepas CL e Y comportam-se de maneira diferente dian-
te do soro imune. Assim sendo, os tripomastigotas da cepa Y foram aglutinados por soro imune de camundongos e a infectividade dos para-
sitais aglutinados foi reduzida, quando inoculados em camundongos nor-
mais. Porém, os tripomastigotas da cepa CL não foram aglutinados, nem tiveram a infectividade diminuída após a incubação com soro imune.

Contudo, o soro imune coletado de animais que se recu-
peraram da fase aguda da doença, protegeu animais normais quando transferido em determinado momento da infecção. Assim sendo, KAGAN

& NORMAN (1962) observaram que camundongos infectados tratados com soro imune tiveram maior tempo de sobrevivência que os não tratados. CULBERTSON et al (1938) verificaram que o soro imune quando administrado em doses profiláticas, ou seja, nos primeiros dias da infecção, protegeu mais que em doses terapêuticas, isto é, aquelas administradas próximas ao pico parasitêmico. Do mesmo modo, KIERSZENBAUM & HOWARD (1976) obtiveram proteção dos camundongos da raça Biozzi "Maus" respondedores através da transferência passiva de soro imune a partir do 2º dia de infecção.

Portanto, estes fatos indicam a importância do soro imune, ou seja, dos anticorpos em determinado momento da infecção, visto que após o estabelecimento patente da mesma, a administração do soro imune se mostrou ineficaz.

Por outro lado, a resistência à reinfecções por *T. cruzi* tem sido descrita desde há muito tempo (BRUMPT, 1913). Trabalhos experimentais foram feitos em diferentes hospedeiros com raças de *T. cruzi* naturalmente avirulentas, raças virulentas atenuadas por drogas ou por passagens seriadas em meio de cultura ou em animais e ainda por infecção com pequenos inóculos (BRENER, 1962, 1967; BRENER & CHIARI, 1963; NORMAN & KAGAN, 1960; CORSINI & OLIVEIRA, dados não publicados).

NORMAN & KAGAN (1960) observaram que camundongos inicialmente infectados com cepas avirulentas de *T. cruzi* isoladas de animais silvestres, ficaram protegidos contra uma reinfecção com cepa virulenta Tulahuen. No entanto, os parasitas permaneceram no sangue sendo capazes de produzir infecções letais quando transferidos para camundongos normais, sugerindo então que os parasitas da cepa Tulahuen permaneceram no sangue sem perder a virulência (KAGAN & NORMAN, 1962).

Além disso, NUSSENZWEIG et al (1963) infectaram camundongos com cepas de *T. cruzi* pertencentes a dois grupos imunologicamente distintos, conferindo assim proteção à reinfeção com a cepa letal Y, demonstrando que o mecanismo de defesa na fase aguda não depende dos determinantes antigênicos responsáveis pela soro tipagem de *T. cruzi*. Dados semelhantes foram obtidos por GONZÁLEZ-CAPPA et al (1974) utilizando antígenos de epimastigotas de diferentes cepas de *T. cruzi* imunologicamente diferentes.

No entanto, apesar do grande número de trabalhos experimentais realizados em Doença de Chagas com uma variedade de animais, ainda nos falta um modelo experimental adequado. Como consequência, importantes fatores da relação parasita-hospedeiro permanecem obscuros. Camundongos e ratos são provavelmente os modelos animais mais convenientes para o estudo da patologia da fase aguda. Coelho, cães, cobaias e macacos tem sido usados como modelos para a fase crônica da doença (WHO, 1977).

Assim sendo, este trabalho foi baseado nos dados anteriores sobre graus variáveis de resistência em diferentes raças de camundongos (TRISCHMANN et al, 1978) e nos dados de CORSINI et al (1980a, 1980b) nos quais a raça (CBaxC₅₇Bl/10)F₁ foi proposta como modelo experimental para a Doença de Chagas, uma vez que nestes animais, tanto a fase aguda como a fase crônica da infecção estão bem caracterizadas. O trabalho foi baseado ainda na importância da resposta humoral na resistência adquirida nesta infecção (KAGAN & NORMAN, 1961; KRETTLI & BRENER, 1976), em que os anticorpos protetores foram demonstrados nas subclasses IgG_{2a} e IgG_{2b} (TAKEHARA & MOTA, 1979).

Deste modo, nosso objetivo foi comparar a resistência dos camundongos F₁ aos Biozzi "Bons" (BH) e "Maus" (BL) respondendo-

res, uma vez que estes últimos diferem quanto a sua resistência à infecção pelo *T. cruzi* (KIERSZENBAUM & HOWARD, 1976) e quanto à capacidade de produção de anticorpos (BIOZZI et al, 1975).

Para confirmarmos a importância da resposta humoral do tipo IgG na resistência, tanto na primoinfecção quanto na reinfecção, à qual o animal é resistente (BRUMPT, 1913; BRENER, 1962; KAGAN & NORMAN, 1961; NUSSENZWEIG et al, 1963), decidimos imunodeprimi-los através da utilização da ciclofosfamida e hidrocortisona (COHEN & CLAMAN, 1971a; DRACOTT & SMITH, 1979b; SHAND & LIEW, 1980). Também procedeu-se à esplenectomia, dada a importância do baço na resposta imune (GOBLE, 1970).

Assim sendo, verificamos: a parasitemia; a taxa de mortalidade (expressa em porcentagem de mortalidade), o título de anticorpos através da reação de imunofluorescência e o estudo histológico de coração, fígado e baço nos seguintes grupos experimentais: F_1 e Biozzi (BH e BL) primoinfectados e reinfectedados, F_1 esplenectomizados na infecção e reinfecção, F_1 e Biozzi BH tratados com drogas imunossupressoras durante a infecção e reinfecção com *T. cruzi*.

2 - MATERIAL E MÉTODOS

2.1 - ANIMAIS

Camundongos (CBAXC₅₇BL/10)F₁ e Biozzi "Bons" (BH) e "Maus" (BL) respondedores, de ambos os sexos, criados e mantidos no biotério do Depto. de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia - Unicamp, foram utilizados com 3 meses de idade. Os camundongos Biozzi, cuja colonia inicial nos foi cedida pelo Dr. Oswaldo Santana (Instituto Biológico - São Paulo) foram selecionados geneticamente a partir de camundongos Swiss, através da formação máxima ou mínima de anticorpos contra antígeno flagelar de *Salmonella typhimurium* e *Salmonella oranienburg* (SIQUEIRA et al, 1976).

2.2 - CEPA DE TRIPANOSOMA

Foi utilizada a cepa Y (PEREIRA DA SILVA & NUSSENZWEIG, 1953) do *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* cedida pelo Dr. Zigman Brener (Belo Horizonte).

A cepa Y foi mantida em camundongos Swiss 55, machos ou fêmeas pesando aproximadamente 20 gramas, segundo instruções de BRENER (1968). Os animais foram anestesiados com éter, sangrados pelo plexo braquial no 7º dia de infecção, correspondendo ao pico parasitêmico, sendo o sangue coletado com pipeta Pasteur e colocado em citrato de sódio em concentração final de 0,38%. Fez-se uma diluição prévia em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MME) pH 7,2; para proceder-se a contagem de tripomastigotas em câmara de Neubauer. O repique foi sempre feito com 120.000 tripomastigotas diluido em MME pH 7,2: sem soro fetal bovino.

2.3 - INFECCÃO E REINFECCÃO DOS GRUPOS EXPERIMENTAIS

Para procedermos a infecção e reinfecção dos diferentes grupos experimentais, coletou-se o sangue de camundongos Swiss 55 infectados com a cepa Y de *T. cruzi*, conforme descrito no item anterior. As diluições foram feitas em MME pH 7.2, sem soro fetal bovino.

Os camundongos foram infectados intraperitonealmente (i.p.), conforme instruções (CORSINI et al, 1980b) utilizando-se inóculos de 10^1 , 10^2 , 10^3 , 10^4 e 10^5 parasitas.

As reinfecções foram feitas i.p. com inóculos de 10^5 parasitas, em camundongos F_1 previamente infectados com 10^2 parasitas da mesma cepa, em diferentes intervalos de tempo entre a infecção e a reinfecção. Utilizou-se como infecção com 10^2 parasitas, pois camundongos F_1 foram resistentes a este inóculo (CORSINI et al, 1980a).

2.4 - TRATAMENTO DOS CAMUNDONGOS COM DROGAS IMUNOSSUPRESSORAS

2.4.1 - Ciclofosfamida

Os camundongos F_1 infectados ou reinfectedados com a cepa Y foram tratados com ciclofosfamida = CY (Enduxan, Laboratório Pravaz-Recordati) nas doses de 1,5 mg/dia; 3,0 mg/dia e 5,0 mg/dia em animais pesando em média 30 gramas. A droga foi previamente diluída em água destilada estéril e administrada por via intra-muscular (i.m.) na musculatura da coxa, durante 3 dias, antes ou após a infecção ou reinfecção pela cepa Y.

2.4.2 - Hidrocortisona

O tratamento com hidrocortisona = HY (Flebocortid, Laboratório Richter) foi feito em grupos experimentalmente infectados ou reinfectedos com a cepa Y, de maneira semelhante a anterior empregando-se diferentes doses (2,5 mg/dia; 5,0 mg/dia e 10 mg/dia em animais pesando em média 30 gramas) administradas durante 10 dias em diferentes tempos com relação à infecção ou reinfecção.

2.5 - PARASITEMIA

A parasitemia foi determinada diariamente, segundo o método descrito por BRENER (1968). Resumidamente: coletou-se uma alíquota de 5 mm³ de sangue periférico através da veia da cauda, utilizando-se para isso pipeta de hemoglobina previamente lavada em solução de citrato de sódio 3,8%, sendo em seguida a amostra de sangue depositada entre lâmina e lamínula (22x22 mm).

Procedeu-se a contagem do número de tripomastigotas em microscópio Zeiss binocular, com aumento de 500x, contando-se 100 campos, como descrito anteriormente (CORSINI et al, 1980b). O resultado foi expresso em parasitas/mm³ de sangue.

2.6 - ESPLENECTOMIA

Camundongos F₁ de 2 meses de idade foram esplenectomizados sob anestesia com éter, através de uma pequena incisão na região lombar previamente depilada. O fechamento da incisão foi feito mediante a utilização de "agrafes de Michel". Os animais foram utilizados um mês após a esplenectomia.

2.7 - IMUNOFLUORESCÊNCIA

As reações foram executadas de acordo com a técnica descrita por CAMARGO (1966).

2.7.1 - Preparo das lâminas

Epimastigotas de *T. cruzi*, mantidos por rapiques serializados em meio LIT (FERNANDES & CASTELLANI, 1968) foram coletados no 7º dia de cultura e lavados 3 vezes com NaCl 0.15M por centrifugação a 755 g por 15 minutos.

Coletou-se uma amostra do sedimento em salina tamponada pH 7,2, a qual foi filtrada em algodão. Procedeu-se a diluição (1:10) em solução salina formolada (formol neutro) e contagem em câmara de Neubauer. Preparou-se uma suspensão contendo 3×10^6 epimastigotas/ml.

Alíquotas de 10 μ l foram colocadas nos espaços da lâmina para imunofluorescência, retirando-se o excesso com seringa hipodérmica e deixando-se secar a temperatura ambiente. Por este método tínhamos aproximadamente 20 epimastigotas por campo (ao microscópio Zeiss binocular com objetiva 40x e ocular 12,5x). As lâminas foram conservadas a -20°C .

2.7.2 - Reação

Os soros imunes separados de sangue coletado através do plexo axilar e estocados em "pools" para cada grupo, a -20°C , foram diluídos em solução salina tamponada pH 7,2. Foram utilizados alíquotas de 10 μ l do soro imune. Os controles foram: um soro positiu

vo de camundongos F_1 com 30 dias de infecção por *T. cruzi* de título 1:32 e um soro negativo de camundongos F_1 normais.

As lâminas com soro imune foram mantidas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos, a seguir foram lavadas 2x em solução salina tamponada e 1x em água destilada, sendo de 5 minutos cada lavagem. As lâminas foram secadas com secador de ar quente.

Foram utilizadas alíquotas de 10 μl do soro conjugado IgG de coelho anti-IgG de camundongo marcado com fluoresceína (Cappel Laboratories-Cochranville-USA) de título 1:200, conforme determinação prévia por titulações em bloco com soro de camundongo com 30 dias de infecção. As diluições do conjugado foram feitas em tampão apropriado: 9,8 ml de solução salina tamponada pH 7,2; 0,2 ml de Tween 80; 0,1 ml de azul de Evans a 1:500.

As lâminas com o conjugado foram incubadas em câmara úmida a 37°C por 30 minutos. Em seguida foram lavadas como anteriormente. Uma vez secas, montou-se as lamínulas com glicerina tamponada (9 partes de glicerina: 1 parte de solução salina tamponada).

As lâminas foram observadas em microscópio de fluorescência Zeiss modelo Standard RA equipado com lâmpada HBO W/4 e filtro excitador BG 12, com objetiva 40x e ocular 12,5x.

O título dos soros foi considerado como o inverso da maior diluição capaz de produzir reação positiva, expresso em $\log_{10}$. Os controles não apresentaram reação positiva, observando-se apenas uma sombra tênue nos epimastigotas.

2.8 - HISTOLOGIA

Os fragmentos de coração, baço e fígado coletados de 3 animais em cada experimento, no 5º, 10º, 15º e 20º dias de infecção,

foram fixados em formol-cálcio. As amostras foram em seguida preparadas e montadas em lâminas de acordo com as descrições de BURKE et al (1972).

3 - RESULTADOS

3.1 - INFECCÃO COM A CEPA Y DE *T. cruzi* EM CAMUNDONGOS

(CBAxC₅₇BL/10)F₁ E EM BIOZZI "BONS" E "MAUS" RESPONDE-
DORES.

Com a finalidade de se comparar a infecção com a cepa Y de *T. cruzi* em camundongos F₁, BH e BL, os animais foram infectados com diferentes inóculos de tripomastigotas determinando-se a seguir a parasitemia, a taxa de mortalidade, o título de anticorpos e estudando-se a histologia do coração, baço e fígado dos animais infectados e respectivos controles.

Os camundongos F₁ infectados com 10² parasitas apresentaram um período pré-patente de geralmente 7 dias, durante o qual não foram detectados parasitas no sangue periférico. O pico parasitêmico ocorreu entre 10º e 12º dias (350 parasitas/mm³) sendo a parasitemia controlada a partir do dia seguinte ao pico e não detectando-se mais parasitas a partir do 25º dia de infecção (Fig. 1). A taxa de mortalidade nestes animais foi 3,7% no 20º dia, e não aumentou até o 60º dia de infecção (Tab. 1).

Quando inóculos maiores (10³, 10⁴, 10⁵) foram utilizados, os camundongos F₁ apresentaram período pré-patente menor (4 dias) e pico parasitêmico ao redor do 9º dia, não havendo no pico um aumento do número de parasitas correspondente ao inóculo. No entanto, a taxa de mortalidade no 20º dia de infecção foi crescente: 6,6% com 10³, 50% com 10⁴ e 100% com 10⁵ parasitas (Tab. 1).

Os camundongos BH infectados com 10² parasitas apresentaram o período pré-patente, o número de tripomastigotas no pico parasitêmico e o controle do número de parasitas no sangue periférico

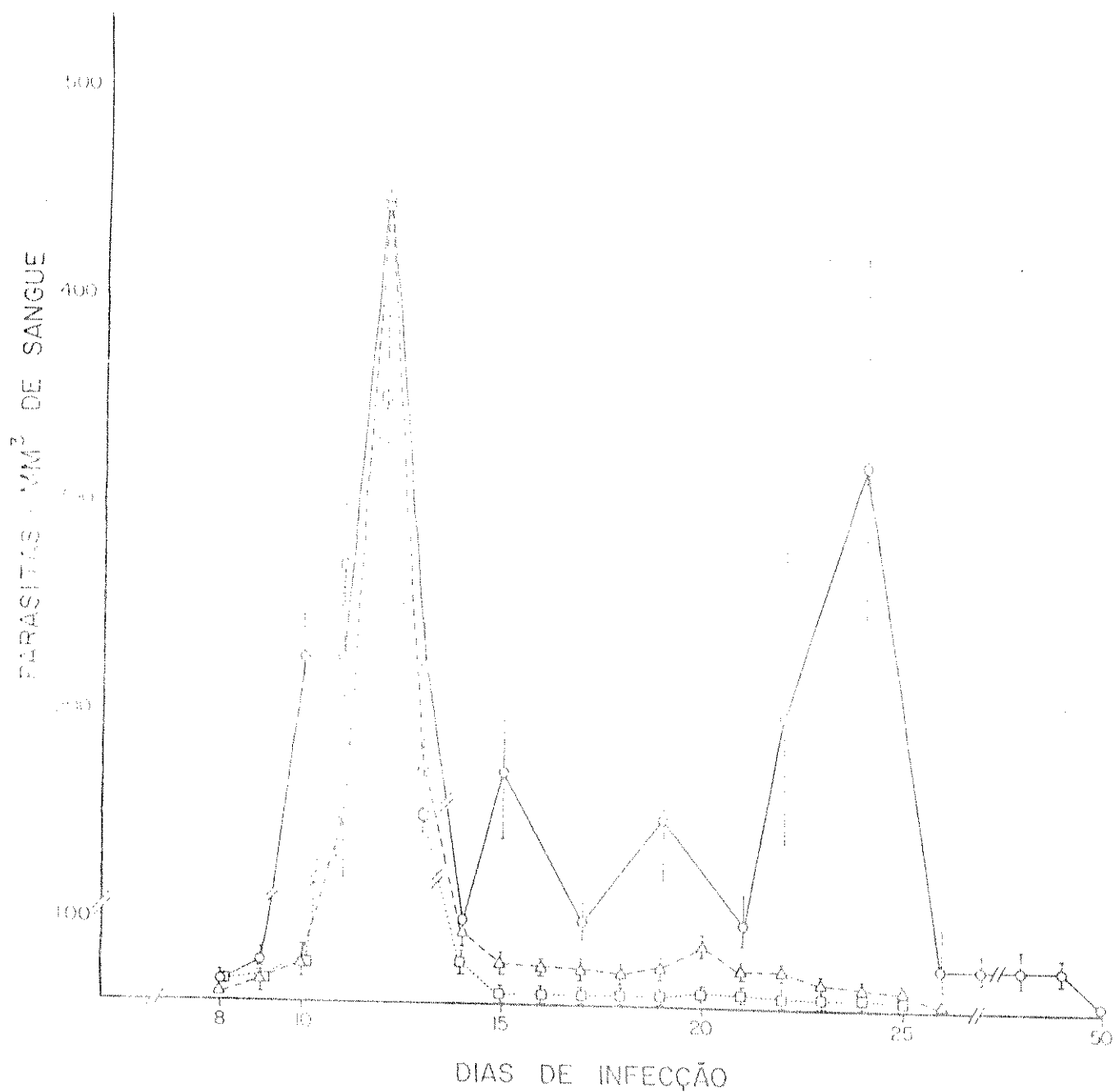


FIGURA 1: PARASITEMIA EM CAMUNDONGOS (CBAXC₅₇Bl/10)F₁, BIOZZI "BOM" E "MAU" RESPONDEDOR INFECTADOS COM *T. cruzi*.

Camundongos foram infectados i.p. com 100 parasitas.

Δ-----Δ Biozzi "Bom", O—O Biozzi "Mau" responder, □.....□ (CBAXC₅₇Bl/10)F₁.

Cada ponto representa a média geométrica $\bar{x}$ DP até o 20º dia de infecção. Os dados posteriores foram obtidos com os sobreviventes.

após o pico parasitêmico semelhantes aos F_1 (Fig. 1). A infecção dos BH com 10^3 parasitas provocou um período pré-patente menor (6 dias) e com inóculos de 10^4 e 10^5 este foi ainda menor (4 dias). A taxa de mortalidade nos BH infectados com 10^3 parasitas foi de 17% no 20º dia e 45% no 60º dia de infecção, e com 10^4 e 10^5 foi de 100% já no 20º dia (Tab. 1).

TABELA 1: TAXA DE MORTALIDADE EM CAMUNDONGOS (CBaxC₅₇BL/10) F_1 , BIOZZI "BONS" E "MAUS" RESPONDEDORES INFECTADOS COM *T. cruzi*.

RAÇAS	INÓCULOS ^a	TAXA DE MORTALIDADE	
		20 dias	60 dias
F_1^C	10^2	4/109	4/109
"	10^{2b}	2/20	2/20
"	10^3	1/15	1/15
"	10^4	10/20	16/20
"	10^5	10/10	
BH	10^2	0/20	6/20
"	10^3	3/18	8/18
"	10^4	15/15	
"	10^5	17/17	
BL	10^1	1/10	7/10
"	10^2	0/20	10/20
"	10^3	2/10	10/10

a - Camundongos infectados i.p.

b - Camundongos F_1 esplenectomizados 30 dias antes da infecção.

c - Os dados sobre camundongos F_1 foram coletados do trabalho de CORSINI et al (1980b).

Nos camundongos BL infectados com 10^1 , 10^2 e 10^3 parasitas o período pré-patente e o número de parasitas no pico parasitêmico foram semelhantes aos BH e aos F_1 (Fig. 1). Porém, o controle

da parasitemia após o pico foi diferente destes, verificando-se um segundo pico no 23º dia e somente no 50º dia não se detectou parasitas no sangue periférico. A taxa de mortalidade foi 70% em animais infectados com inóculos tão pequenos como 10 parasitas, 50% e 100% respectivamente, naqueles infectados com 10^2 e 10^3 parasitas, após 60 dias de infecção (Tab. 1).

Portanto, observou-se através da taxa de mortalidade que os camundongos BL são mais susceptíveis à infecção pela cepa Y de *T. cruzi* que os BH e estes mais susceptíveis que os F_1 .

A resposta humoral dos camundongos F_1 infectados com 10^2 tripomastigotas, foi medida através de reações de imunofluorescência até um ano após a infecção. Observou-se um aumento gradual do título de anticorpos, atingindo o máximo na décima semana (log 3,00) permanecendo então em torno de log 2,40, um ano após a infecção (dados não mostrados).

Os camundongos BL não apresentaram uma resposta humoral detectável no 5º dia de infecção ao contrário dos BH (log 1,20), diferença esta existente nos outros dias estudados. Os camundongos BH apresentaram títulos de anticorpos maiores que os F_1 já no 5º dia de infecção, respectivamente log 1,20 e log 0,60 (Tab. 2).

Os camundongos F_1 infectados com 10^2 parasitas apresentaram o fígado e o coração, no 15º dia de infecção, com moderado infiltrado linfo-plasmocitário e os ninhos de amastigotas somente foram observados no coração em pequeno número. No baço, além de moderada congestão de polpa vermelha e desestruturação da polpa branca, observou-se também a presença de células grandes, multinucleadas, com citoplasma basófilo e localizadas principalmente na cortical do órgão, denominadas de células "reticulares ativadas" (LOPES DE FARIA-comunicação pessoal).

TABELA 2: RESPOSTA HUMORAL NO PERÍODO PRÉ-PATENTE DA INFECÇÃO POR *T. cruzi* NAS RAÇAS (CBaxC₅₇BL/10)F₁, BIOZZI "BONS" E "MAUS" RESPONDEDORES.

RAÇAS ^a	TÍTULO DE ANTICORPOS ^b	INCLINAÇÃO DA RETA ^c
	5º dia de infecção	
F ₁	0,60	30,96
BH	1,20	50,19
BL	0,00	0,0

a - Raças F₁, BH e BL foram infectadas i.p. com 10² parasitas.

b - Medido através de imunofluorescências e expresso em log₁₀.

c - Valores obtidos calculando-se $\text{tg } \alpha^{-1}$, onde α , é o ângulo obtido com o título de anticorpos (log₁₀) no 5º dia de infecção.

Estas observações histológicas feitas em camundongos F₁ intensificaram-se nos Biozzi (tanto BH como BL) infectados com 10² parasitas. O fígado e o coração apresentaram infiltrado linfoplasmocitário mais intenso, detectável já no 10º dia de infecção, aumentando no 15º dia e diminuindo em seguida. O baço mostrou congestão de polpa vermelha e número de células "reticulares ativadas" maior que nos F₁. A presença de ninhos de amastigotas também foi maior em camundongos Biozzi e somente foram observados a partir do 15º dia de infecção, não sendo encontrados no 20º dia de infecção. No entanto, as diferenças histológicas entre camundongos BH e BL não foram claras.

Portanto, estes dados indicam mais uma vez que camundongos F₁ foram mais resistentes que os Biozzi.

3.2 - REINFECÇÃO COM A CEPA Y DE *T. cruzi* EM CAMUNDONGOS

$$\frac{(CBA \times C_{57}^{Bl/10}) F_1}{1}$$

Considerando que os camundongos F_1 são mais resistentes que os BH e além disso possuem um padrão de infecção mais regular e reprodutível em diferentes experimentos, estes camundongos foram escolhidos para se estudar os efeitos da reinfecção com a dose letal de tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi* em diferentes períodos após a primoinfecção com 10^2 parasitas da mesma cepa.

Como foi observado, os camundongos F_1 infectados com 10^2 parasitas apresentaram o pico parasitêmico geralmente no 11º dia, controlando em seguida a parasitemia. Esta fase inicial da infecção designada fase aguda se prolonga geralmente até o 30º dia de infecção. Após este período os parasitas não foram detectados no sangue periférico pelo método visual, sendo então esta fase chamada de fase crônica (CORSINI et al, 1980b).

Nos camundongos F_1 reinfectedados com 10^2 , 10^3 , 10^4 , 10^5 e 10^6 parasitas 30 dias após a primoinfecção com 10^2 tripomastigotas da mesma cepa, raramente detectou-se a presença de parasitas no sangue periférico.

Como os animais resistiram à reinfecção com grandes inóculos após 30 dias de infecção, procedeu-se então à reinfecção com 10^5 parasitas, em animais com menor tempo de infecção, isto é: 3, 7 e 14 dias após a primoinfecção.

O número de parasitas no pico parasitêmico foi mais baixo nos F_1 reinfectedados 7 dias após a primoinfecção (100 parasitas/ mm^3) em comparação aos F_1 infectados com 10^2 (350 parasitas/ mm^3) e com 10^5 parasitas (1400 parasitas/ mm^3). Portanto, 7 dias após a infecção, os animais já eram altamente resistentes à reinfecção com a

dose letal de 10^5 tripomastigotas. Entretanto, já decorridos 3 dias de infecção, foi observada resistência à reinfecção, visto que a taxa de mortalidade foi de apenas 22%, em contraste a 100% de mortalidade em animais infectados com 10^5 tripomastigotas (Tab. 3).

TABELA 3: TAXA DE MORTALIDADE EM CAMUNDONGOS (CBaxC₅₇Bl/10)F₁ REINFEECTADOS COM *T. cruzi*.

INÓCULOS ^a	DIAS DE INFECÇÃO ^b	TAXA DE MORTALIDADE	
		20 dias	60 dias
10^5	—	10/10	
10^2+10^5	3	2/9	2/9
"	7	0/10	0/10
"	14	2/10	2/10
"	30	0/10	0/10

a - Camundongos F₁ infectados com 10^2 e reinfectedados com 10^5 parasitas.

b - Dia após a infecção, no qual procedeu-se a reinfecção.

Quanto à resposta humoral dos animais reinfectedados, esta foi uma típica resposta secundária. Assim sendo, a reinfecção 7 dias após a primoinfecção foi suficiente para aumentar o título de anticorpos para log 2,10 (log 1,50 nos animais controles). Este aumento de anticorpos acentuou-se no grupo reinfectedado 30 dias após a primoinfecção verificando-se títulos de log 3,00 (log 1,80 nos controles não reinfectedados) (Tab. 4).

TABELA 4: RESPOSTA HUMORAL PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA AO *T. cruzi*.

GRUPOS	INÓCULOS	TÍTULO DE ANTICORPOS ^a							
		5º ^e	10º	15º	20º	30º	35º	40º	55º
<u>RESPOSTA PRIMÁRIA</u>									
F ₁	10 ²	0,60	0,90	1,50	1,80	1,80	1,80	2,10	2,40
F ₁	10 ² b	0,30	0,60	1,20	1,80	ND	ND	ND	ND ^d
BH	10 ²	1,20	1,80	2,10	2,70	ND	ND	ND	ND
BL	10 ²	0,00	0,60	1,20	1,80	ND	ND	ND	ND
<u>RESPOSTA SECUNDÁRIA^c</u>									
F ₁	10 ² +10 ⁵ §	0,60	1,20	2,10	2,40	ND	ND	ND	ND
F ₁	" §§	0,60	0,90	2,10	2,40	ND	ND	ND	ND
F ₁	" §§§	0,60	0,90	1,50	1,80	1,80	2,70	3,00	3,00

a - Título de anticorpos expresso em log₁₀.

b - F₁ esplenectomizado 30 dias antes da infecção com 10² parasitas.

c - Infecção com 10² e reinfecção com 10⁵ parasitas, em diferentes intervalos de tempo: § = 7 dias; §§ = 14 dias; §§§ = 30 dias.

d - ND: não determinado.

e - Dias de infecção.

As observações feitas através do estudo histológico quanto à resistência à reinfecção, estão de acordo com os dados de mortalidade, parasitemia e resposta humoral. Assim sendo, foi observado que os F_1 reinfectedados 7 ou 14 dias após a primoinfecção apresentaram o fígado e o coração com um infiltrado linfo-plasmocitário menor que aquele dos animais controles. No baço, verificou-se a congestão da polpa vermelha e presença de células "reticulares ativadas", em menor número que nos controles. Ninhos de amastigotas não foram observados nos animais reinfectedados.

Nos camundongos reinfectedados 30 dias após a primoinfecção, a diferença na histologia dos órgãos não foi tão acentuada em relação aos animais infectados, pois que na fase crônica da infecção o infiltrado celular e o número de ninhos de amastigotas foram praticamente inexistentes.

Através dos dados de parasitemia, taxa de mortalidade, resposta humoral e histologia dos órgãos concluiu-se que primoinfecção com inóculos pequenos (10^2 parasitas) da cepa Y, propiciou o desenvolvimento de resistência à reinfecção com inóculos letais da mesma cepa de *T. cruzi* logo após a primeira semana de infecção.

3.3 - INFECCÃO EM CAMUNDONGOS (CBAXC₅₇B1/10)F₁ ESPLENECTOMIZADOS

Com a finalidade de verificarmos a importância do baço na infecção pelo *T. cruzi* os camundongos F_1 foram esplenectomizados antes ou após a infecção e também antes da reinfecção na fase crônica, observando-se a parasitemia, a taxa de mortalidade, o título de anticorpos e a histologia do coração e do fígado.

A esplenectomia 30 dias antes da infecção diminuiu a

parasitemia (130 parasitas/mm³ no 10º dia) em relação aos controles e a taxa de mortalidade foi de apenas 10% em 60 dias (Tab. 1). Por sua vez, a esplenectomia 30 dias após a infecção ou antes da reinfecção não alterou a fase crônica, visto que não foram encontrados parasitas no sangue periférico e não houve alteração da taxa de mortalidade.

A resposta humoral também não foi alterada pela esplenectomia pois tanto no grupo infectado, como no esplenectomizado observamos títulos de anticorpos de log 1,80 no 20º dia de infecção (Tab. 4).

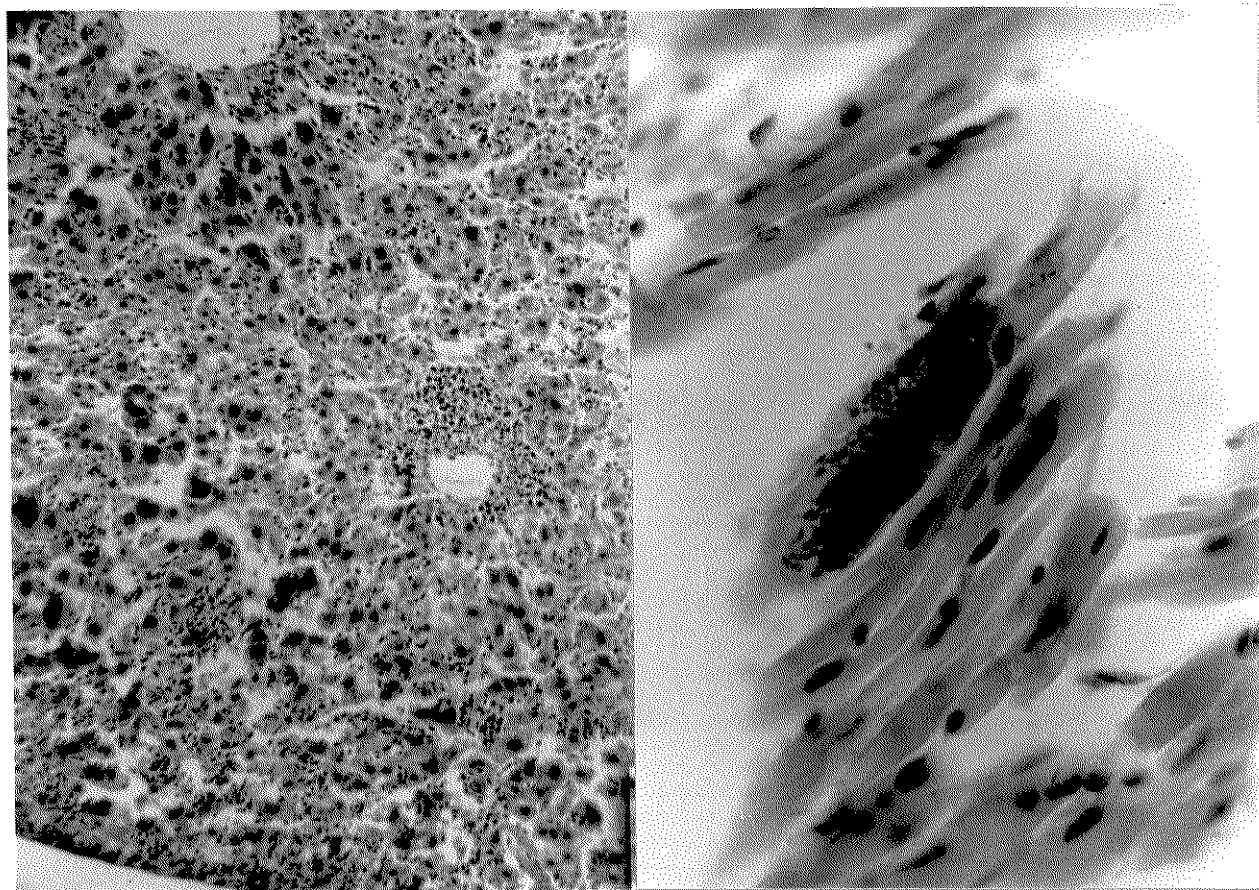
A histologia do fígado e do coração revelou um intenso infiltrado linfo-plasmocitário principalmente após 15 dias de infecção, sendo que no fígado este foi maior em comparação aos animais controles apenas infectados (Fig. 2). Foram encontrados ninhos de amastigotas no coração com 15 dias de infecção, ao passo que estes não foram observados nos camundongos F₁ controles. Portanto, os dados acima indicam que a esplenectomia não causou maiores danos aos animais infectados com *T. cruzi* apesar do maior infiltrado inflamatório observado no fígado e no coração.

3.4 - IMUNOSSUPRESSÃO NA FASE AGUDA DA INFECÇÃO

Com a finalidade de verificarmos o papel de drogas imunossupressores na infecção pelo *T. cruzi*, camundongos F₁ e Biozzi "Bons" respondedores foram tratados com ciclofosfamida (CY) e hidrocortisona (HY) em diversos esquemas de tratamento e em diferentes fases da infecção.

3.4.1 - Imunossupressão na fase aguda da infecção
com CY em camundongos (CBAXC₅₇B1/10)F₁

O tratamento com ciclofosfamida em diferentes doses, foi feito durante 3 dias antes ou após a infecção, ou então a partir do 10º dia de infecção.



A

B

FIGURA 2: CORTES HISTOLÓGICOS DE ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS (CBAXC₅₇B1/10)F₁ ESPLENECTOMIZADOS E INFECTADOS PELO *T. cruzi*.

- A - Fígado no 15º dia de infecção. As setas indicam o intenso infiltrado inflamatório. Aumento de 125x.
B - Coração mostrando ninho de amastigotas (indicado pela seta) no 15º dia de infecção. Aumento de 500x.

O tratamento com CY na dose de 1,5 mg/dia/3 dias administradas antes da infecção não alterou a mortalidade nem a parasitemia (360 parasitas/mm³ no pico parasitêmico) em relação aos F₁ controles infectados e não tratados. Ao contrário, o tratamento 3 dias após a infecção, causou um pequeno aumento da parasitemia (670 parasitas/mm³) e apenas 20% de mortalidade.

No entanto, a administração de CY na dose de 3,0 mg/dia/3 dias não foi tóxica para F₁ controles (não infectado), uma vez que estes sobreviveram. Porém, a administração de tal dose em camundongos F₁ infectados durante 3 dias antes ou após a infecção, elevou a parasitemia para 2.000 e 5.600 parasitas/mm³ respectivamente (Fig. 3). O tratamento 3 dias após a infecção causou 100% de mortalidade com 20 dias de infecção comparando a 40% de mortalidade nos animais tratados 3 dias antes da infecção (Tab. 5).

Os animais tratados com 3,0 mg/dia/3 dias a partir do 10º dia de infecção aumentaram a parasitemia a partir do 13º dia, com 10.000 parasitas/mm³ no 16º dia e 100% de mortalidade no 20º dia de infecção.

Portanto, a dose de 3,0 mg/dia/3 dias foi a mais efetiva, causando imunossupressão relevante principalmente quando administrada imediatamente após a infecção ou perto do pico parasitêmico. A administração de apenas uma dose de CY (3,0 mg) não alterou o curso da infecção em camundongos F₁ infectados com *T. cruzi*.

Os dados de imunofluorescência corroboram aqueles encontrados através da determinação da parasitemia e taxa de mortalidade, relativos à imunossupressão ocorrida com o tratamento com CY imediatamente após a infecção ou próximo do pico parasitêmico.

No tratamento com 3,0 mg/dia/3 dias antes da infecção não foram detectados anticorpos no 5º dia de infecção, porém no 10º

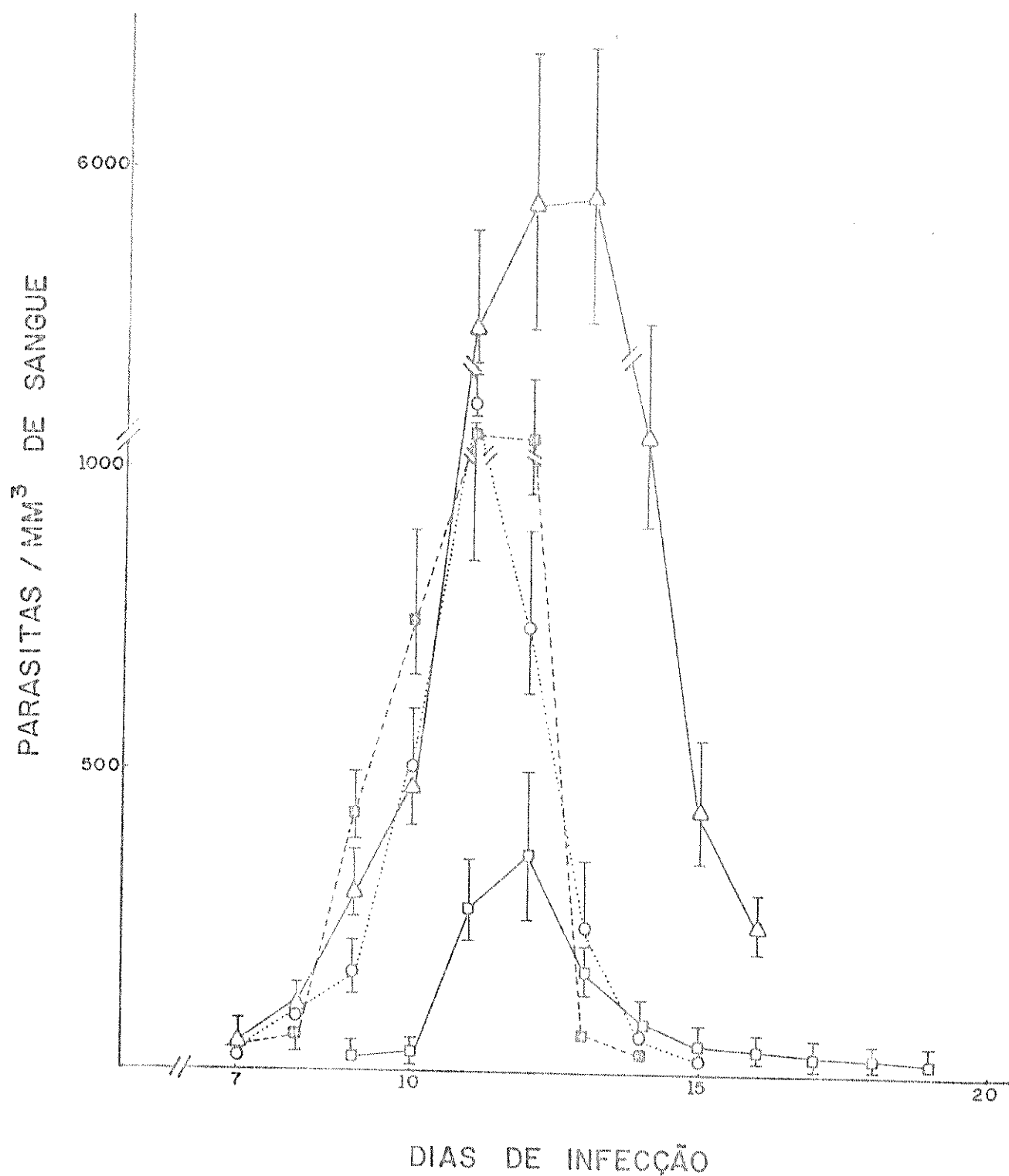


FIGURA 3: PARASITEMIA EM CAMUNDONGOS (CBAxC₅₇B1/10)F₁ INFECTADOS COM *T. cruzi* E TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA OU HIDROCORTISONA. □—□ Controle infectado; ○····○ tratados com CY (3 mg/dia/3 dias) antes da infecção; Δ—Δ tratados com CY (3 mg/dia/3 dias) após a infecção; ■----■ tratados com HY (10 mg/dia/10 dias). Cada ponto representa a média geométrica $\bar{x}$ DP.

TABELA 5: IMUNOSSUPRESSÃO PELA CY E HY EM CAMUNDONGOS (CBAXC₅₇B1/10)F₁ E BIOZZI "BOM" RESPONDEDOR, INFECTADOS COM *T. cruzi*.

RAÇAS ^a	DROGA	TAXA DE MORTALIDADE		5q ^f	TÍTULO DE ANTICORPOS ^e		
		20 dias	40 dias		10q	15q	20q
F ₁	—	4/109	4/109	0,60	0,90	1,50	1,80
F ₁	CY ^b	4/10	10/10	0,00	0,60	0,90	1,50
F ₁	CY ^c	10/10		0,00	0,00	0,30 ⁺	
F ₁	HY ^d	10/10		0,00	0,00	1,50 ⁺	
BH	—	0/20	6/20	1,20	1,80	2,10	2,70
BH	CY ^c	10/10		0,30	0,30	1,50 ⁺	
BH	HY ^d	10/10		0,90	1,50 ⁺		

a - As diferentes raças foram infectadas i.p. com 10² parasitas.

b - Ciclofosfamida (CY): 3 mg/dia/3 dias antes da infecção. Vide texto.

c - Ciclofosfamida: 3 mg/dia/3 dias após a infecção. Vide texto.

d - Hidrocortisona (HY): 10 mg/dia/10 dias após a infecção. Vide texto.

e - Título de anticorpos expresso em log₁₀.

f - Dias de infecção.

+ - Todos os animais do experimento morreram.

dia o título foi de log 0,60 atingindo log 1,50 no 20º dia de infecção. Maior supressão ocorreu com o tratamento após a infecção, visto que os anticorpos não foram detectados até o 10º dia de infecção e no 15º dia o título foi de apenas log 0,30 (Tab. 5).

Nos animais infectados e tratados com CY observou-se no baço: congestão da polpa branca e vermelha, presença de maior número de células "reticulares ativadas" e maior número de ninhos de amastigotas que nos controles (Fig. 4). O coração e o fígado dos animais tratados antes da infecção apresentaram infiltrado linfo-plasmocitário diminuído, porém no 15º dia este foi praticamente igual ao controle. Ninhos de amastigotas foram observados apenas no 15º dia da infecção, em quantidade igual ao controle.

Porém, com o tratamento após a infecção, o infiltrado inflamatório diminuiu muito (inclusive no 15º dia de infecção) e o número de ninhos de amastigotas aumentou em relação aos controles (Fig. 4).

3.4.2 - Imunossupressão na fase aguda da infecção com HY em camundongos (CBAxC₅₇Bl/10)F₁

O tratamento de camundongos F₁ com HY foi feito em diferentes esquemas, sendo administradas doses diárias durante 10 dias. A HY foi tóxica para camundongos não infectados na dose de 20 mg/dia/10 dias, mas não o foi na dose de 10 mg/dia/10 dias.

Os animais infectados e tratados com HY (10 mg/dia/10 dias) a partir da infecção apresentaram aumento de parasitemia (1700 parasitas/mm³ no 11º dia) em relação aos controles (Fig. 3). A taxa de mortalidade de F₁ infectados e tratados com esta dose foi de 100% em 20 dias (Tab. 5). Contudo, a administração desta dose a partir do

10º dia de infecção causou apenas 10% de mortalidade. O tratamento com doses menores (5,0 mg/dia/10 dias) administradas a partir da infecção, provocou pequeno aumento da parasitemia (900 parasitas/mm³) com 38% de mortalidade em 60 dias. A mesma dose administrada 5 dias antes da infecção não alterou a parasitemia e apenas 10% dos camundongos morreram em 60 dias. Da mesma maneira, a administração de apenas 3 doses de 10 mg, também não alterou o curso da infecção.

Os anticorpos não foram detectados até o 10º dia de infecção, porém no 15º dia, o título foi identico (log 1,50) ao controle não infectado (Tab. 5).

O estudo histológico dos órgãos (baço, fígado e coração) de camundongos F₁ infectados e tratados com HY demonstrou diminuição da celularidade do baço e congestão de polpa vermelha do mesmo. No tecido hepático, observou-se pequeno infiltrado linfo-plasmocitário até o 10º dia de infecção, porém este foi mais intenso no 15º dia de infecção. O coração não apresentou infiltrado inflamatório, porém haviam ninhos de amastigotas, assim também como no fígado e no baço no 15º dia de infecção.

Portanto, a HY causou maior imunossupressão na dose de 10 mg/dia/10 dias e quando administrada simultaneamente com a infecção. Tal dose provocou de um modo geral uma diminuição de infiltrado inflamatório e aumento de ninhos de amastigotas nos órgãos. Este efeito foi semelhante ao tratamento com CY.

3.4.3 - Imunossupressão na fase aguda da infecção em camundongos Biozzi "Bons" respondedores com CY

Como foi verificado através de dados da parasitemia,

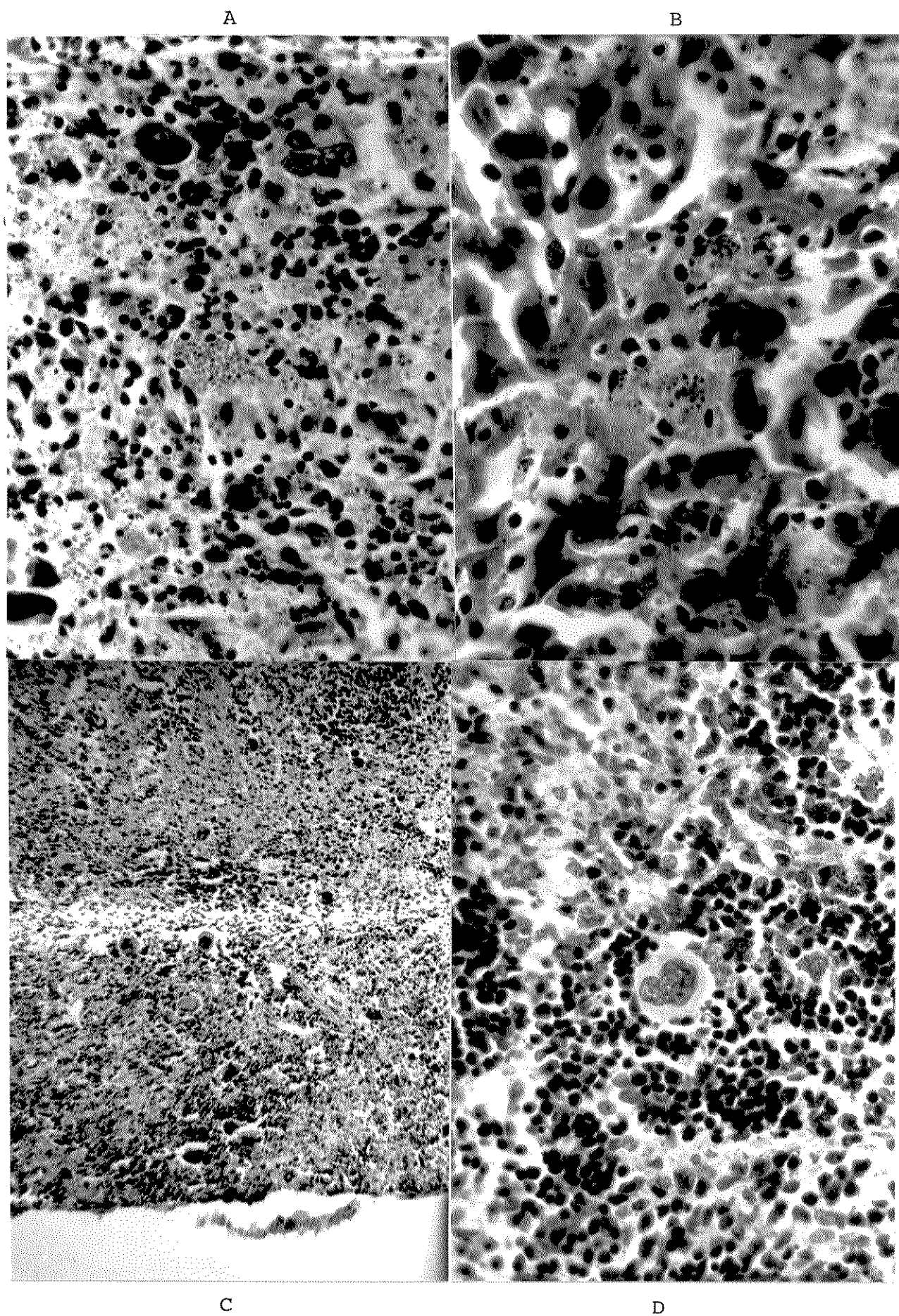


Figura 4

FIGURA 4: CORTES HISTOLÓGICOS DE ÓRGÃOS DE CAMUNDONGOS (CBAXC₅₇BL/10)F₁ INFECTADOS COM *T. cruzi* E TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA.

Os animais foram tratados com CY durante 3 dias após a infecção. Os cortes apresentados referem-se ao 15º dia de infecção. Os ninhos de amastigotas no baço (A) e fígado (B) estão indicados pelas setas. Em C estão as células "reticulares ativadas" do baço em grande número e em maior aumento em D (indicadas pelas setas). Notar a diminuição do infiltrado inflamatório e o aumento do número de ninhos de amastigotas em A e B. Em A, B e D o aumento foi de 500x; e em C de 125x.

taxa de mortalidade e título de anticorpos que os camundongos BH eram mais resistentes à infecção por *T. cruzi* que os BL, decidimos imunodeprimir os camundongos BH a fim de compará-los com os BL.

O tratamento de camundongos BH com CY (3,0 mg/dia/3 dias) após a infecção, aumentou a parasitemia para 10.000 parasitas/mm³ no pico parasitêmico (450 parasitas/mm³ nos controles infectados). A taxa de mortalidade também aumentou muito nos camundongos tratados com CY atingindo 100% no 20º dia de infecção (Tab. 5). Portanto, estes dados sugerem que o tratamento de camundongos BH com CY tornou-os mais susceptíveis ao *T. cruzi* que os BL.

Verificou-se também, que o título de anticorpos no 5º dia de infecção diminuiu nos animais tratados com CY (log 1,20 para log 0,30), tendo continuado mais baixo que os controles durante o período observado (15 dias). Portanto, o nível de anticorpos tornou-os semelhantes aos camundongos BL (Tab. 5).

As observações feitas através do estudo histológico nos camundongos BH tratados com CY, foram semelhantes às aquelas em F_1 . O baço apresentou celularidade diminuída no 5º e 10º dia de infecção, recuperando-se no 15º dia. O infiltrado inflamatório diminuiu e o número de ninhos de amastigotas no coração, baço e fígado foi maior no 15º dia de infecção que nos controles.

3.4.4 - Imunossupressão em camundongos Biozzi "Bons" respondedores com HY

No tratamento de camundongos BH infectados com HY (10 mg/dia/10 dias) verificou-se que apesar de não termos notado diferença no título de anticorpos em relação aos controles, a parasitemia no entanto, foi maior nos animais tratados (3.000 parasitas/mm³) em relação aos controles não tratados, assim também como a taxa de mortalidade aumentou para 100% (Tab. 5).

No estudo dos órgãos de camundongos BH tratados com HY observou-se a diminuição da celularidade de baço, porém com recuperação já no 10º dia de infecção. O coração e o fígado apresentaram pequeno infiltrado linfo-plasmocitário e muitos ninhos de amastigotas (encontrados somente no fígado no 10º dia de infecção) ao contrário dos animais controles.

3.5 - IMUNOSSUPRESSÃO EM CAMUNDONGOS (CBAXC₅₇B1/10)F₁ NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO.

Como demonstramos que animais infectados com pequenos inóculos (10^2 parasitas) de *T. cruzi* eram resistentes à reinfecção com inóculos letais (10^5), decidimos verificar o efeito da ciclofos

famida e da hidro cortisona na resposta imune à reinfecção, em camundongos F_1 com um mês de infecção (fase crônica).

3.5.1 - Imunossupressão em F_1 na fase crônica com ciclofosfamida

O tratamento com CY foi feito com 3 mg/dia/3 dias antes ou após a reinfecção com 10^5 parasitas. O grupo controle foi constituído de animais infectados há um mês, tratados e não reinfectedados, assim também como animais reinfectedados e não tratados.

Os animais na fase crônica da infecção que foram reinfectedados e tratados com CY, desenvolveram uma parasitemia maior (800 parasitas/mm³) no grupo tratado 3 dias antes da reinfecção, de que no grupo tratado 3 dias após a reinfecção (370 parasitas/mm³). Diferentemente, nos animais controles não foram observados parasitas no sangue periférico (Fig. 5). Estes dados corroboram aqueles obtidos com a mortalidade, visto que o tratamento com CY durante 3 dias antes ou após a reinfecção causou respectivamente, 80% e 90% de mortalidade em comparação a 60% de mortalidade nos controles tratados e não reinfectedados (Tab. 6).

Com relação a resposta humoral no grupo controle (tratado e não reinfectedado) não se verificou diminuição no título de anticorpos. No entanto, os animais tratados com CY e reinfectedados tiveram drástica redução no título de anticorpos: log 1,50 no grupo tratado 3 dias antes da reinfecção e log 1,80 com tratamento 3 dias após a reinfecção em comparação a log 2,70 nos controles reinfectedados e não tra-

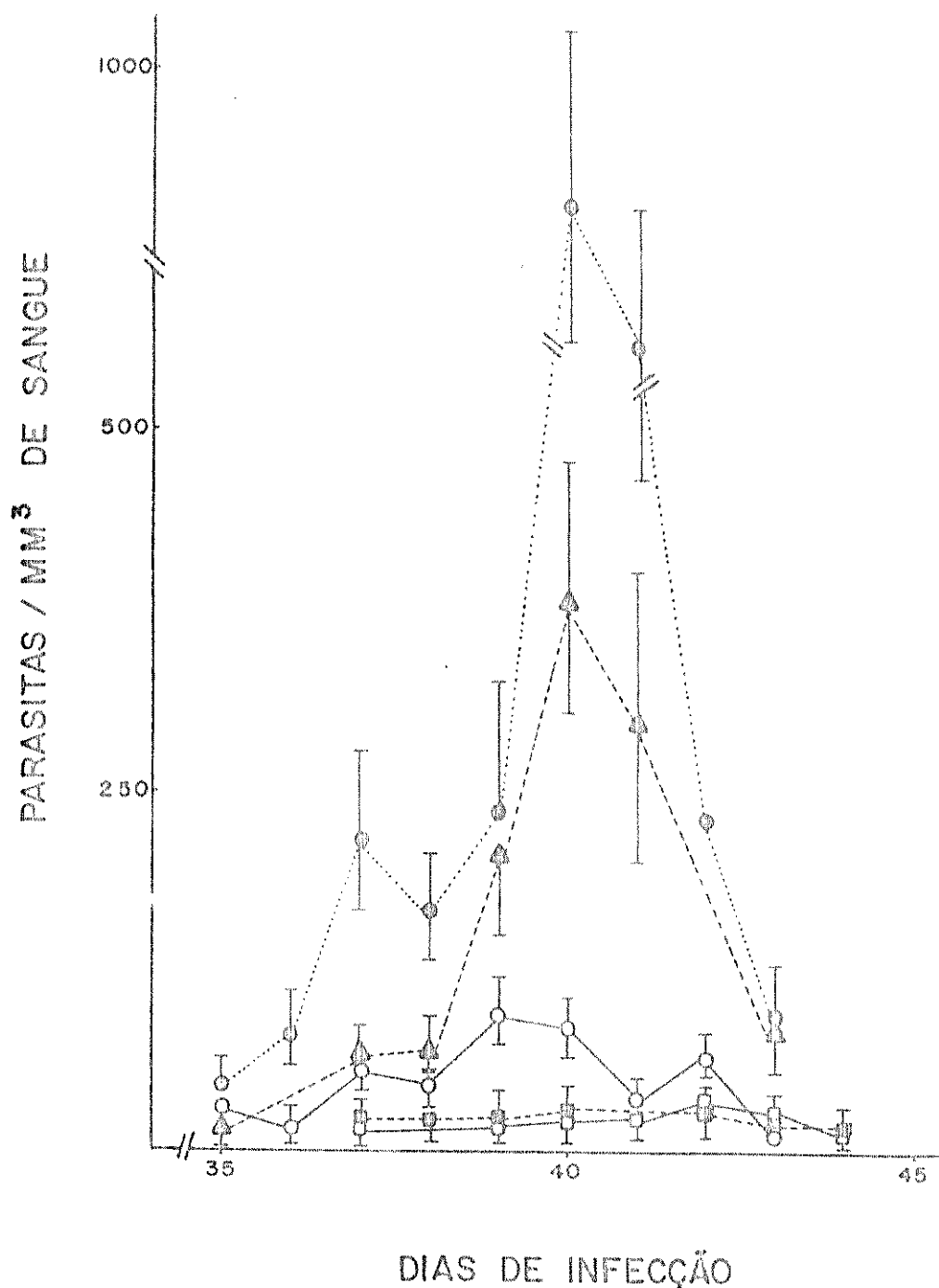


FIGURA 5: PARASITEMIA EM CAMUNDONGOS (CBA $\times$ C₅₇B1/10)F₁ REINFECTADOS NA FASE CRÔNICA E TRATADOS COM CICLOFOSFAMIDA E HIDROCOR_TISONA.

○—○ controle infectado e tratado com CY durante 3 dias;
 △---△ reinfectedados e tratados com CY por 3 dias após rein_{fecção};
 ●.....● reinfectedados e tratados com CY por 3 dias

antes da reinfecção; □——□ controle infectado e tratado com HY; ■----■ reinfectedos e tratados com HY por 10 dias após reinfecção.

Os animais infectados com 10^2 parasitas de *T. cruzi* i.p. foram reinfectedos 30 dias mais tarde com 10^5 parasitas. A CY foi utilizada em doses de 3.0 mg/dia/3 dias e a HY em doses de 10 mg/dia/10 dias. Cada ponto representa a média geométrica $\bar{x}$ DP.

tados. No 10º dia após a reinfecção o título de anticorpos em ambos os grupos tratados baixou para log 2,40 em relação log 3,00 no grupo controle (Tab. 6).

O estudo histológico dos órgãos de camundongos tratados com CY antes ou após a reinfecção mostrou a diminuição do infiltrado inflamatório, ausência de ninhos de amastigotas e células "reticulares ativadas" em número semelhante aos controles reinfectedos. Portanto, a CY administrada antes ou após a reinfecção diminuiu o infiltrado celular, sendo as demais características idênticas às dos animais reinfectedos e não tratados.

3.5.2 - Imunossupressão em F_1 na fase crônica com hidro cortisona

A hidro cortisona foi utilizada na dose de 10 mg/dia/10 dias imediatamente após a reinfecção com 10^5 parasitas, sendo que foram utilizados 2 grupos controles: um tratado com HY mas não reinfectedo, e outro reinfectedo mas não tratado com HY. Estes controles apresentaram baixa parasitemia e mortalidade nula, em contraste à mortalidade de 25% no 20º dia após a reinfecção nos animais reinfectedos e tratados com HY (Fig. 5 e Tab. 6).

TABELA 6: IMUNOSSUPRESSÃO PELA CY E HY EM CAMUNDONGOS (CBaxC₅₇Bl/10)F₁ REINFECTADOS NA FASE CRÔNICA DA INFECÇÃO COM *T. cruzi*.

REINFECÇÃO ^a	DROGA	TAXA DE MORTALIDADE		TÍTULO DE ANTICORPOS ^e		
		60 dias	35º	40º	45º ^f	
+		0/10	2,70	3,00	3,00	
-	CY	3/5	1,50	1,80	1,80	
+	CY ^b	8/10	1,50	2,40	2,40	
+	CY ^c	9/10	1,80	2,40	2,70	
-	HY	0/5	1,80	1,80	1,80	
+	HY ^d	2/8	2,70	3,00	3,00	

- a - Animais foram infectados i.p. com 10² parasitas e reinfectados i.p. com 10⁵ parasitas 30 dias após primoinfecção. Os grupos controles não reinfectados foram tratados com CY durante 3 dias ou com HY durante 10 dias.
- b - CY = ciclofosfamida: 3 mg/dia/3 dias antes da reinfecção. Vide texto.
- c - Idem b, após a reinfecção.
- d - HY = hidrocortisona: 10 mg/dia/10 dias a partir do dia da reinfecção. Vide texto.
- e - Título de anticorpos expresso em log₁₀.
- f - Dias de infecção.

O título de anticorpos não foi alterado pelo tratamento com HY no grupo controle (log 1,80) nem no grupo reinfestado (log 3,00).

A histologia dos órgãos demonstrou semelhanças entre o grupo controle e o grupo reinfestado e tratado com HY. O baço apresentou congestão de polpa vermelha, desestruturação de polpa branca e vermelha e o mesmo número de células "reticulares ativadas" que os controles. No fígado e no coração observou-se apenas pequeno infiltrado linfo-plasmocitário.

Portanto, observamos que camundongos F_1 reinfestados e tratados com HY não apresentaram muitas diferenças em relação aos controles, na parasitemia, resposta humoral e na histologia dos órgãos, embora a taxa de mortalidade tenha sido de 25% nos animais reinfestados e tratados, concluindo-se que a HY não causou imunossupressão relevante em camundongos F_1 reinfestados com grandes inóculos de parasitas na fase crônica da infecção.

4 - DISCUSSÃO

Sabe-se desde longa data (PIZZI et al, 1949) que camundongos de diferentes raças variam quanto a sua susceptibilidade ao *Trypanosoma cruzi*. Estes dados foram confirmados recentemente por TRISCHMANN et al (1978) que verificaram um "continuum" de resistência em camundongos isogênicos desde altamente susceptíveis (C_3 He/J) até os resistentes (BALB/c e C_{57} Bl/10), após a infecção com a cepa Brazil.

Da mesma maneira, KIERSZENBAUM & HOWARD (1976) demonstraram que camundongos Biozzi "Bons" (BH) e "Maus" (BL) responderam que, sabe-se, diferem quanto à capacidade de produção de anticorpos contra vários antígenos (BIOZZI et al, 1975), apresentaram respectivamente alta e baixa resistência à infecção a grandes inóculos das cepas Tulahuen e Y de *T. cruzi*. Estes dados foram também confirmados em nosso laboratório por CORSINI et al (1980b) que verificaram a existência de camundongos com alto grau de resistência [(CBAX C_{57} Bl/10) F_1], resistência moderada (C_{57} Bl/10) e alta susceptibilidade (C_3 He/J) à infecção pela cepa Y.

Porém, diferentemente daqueles autores, CORSINI et al (1980a) utilizaram pequenos inóculos (100 parasitas) para a infecção dos animais experimentais, visto que a infecção por pequeno número de parasitas estaria mais próxima da infecção natural.

Neste trabalho, confirmou-se a grande resistência dos camundongos (CBAX C_{57} Bl/10) F_1 e dos camundongos BH, em contraste com a alta susceptibilidade dos BL. Deste modo os camundongos das raças F_1 e BH infectados com 100 formas do parasita apresentaram um padrão parasitêmico semelhante, porém a taxa de mortalidade foi maior nos BH que nos F_1 . No entanto, o nível de anticorpos, paradoxalmente, foi

maior nos BH.

Por outro lado, diferentemente dos camundongos F_1 e BH, os camundongos BL foram mais susceptíveis à infecção, não controlando a parasitemia, apresentando uma maior taxa de mortalidade e menor nível de anticorpos durante a infecção (Fig. 1, Tab. 1 e Tab. 4).

Histologicamente, no entanto, as diferenças existentes entre as raças resistentes F_1 e BH, e a BL susceptível não foram claras, visto que a intensidade da reação inflamatória no fígado e coração, a congestão e presença de células "reticulares ativadas" no baço, foram praticamente idênticas em todas as raças, assim também como o número de ninhos de amastigotas.

Para explicar tal variação de susceptibilidade entre as raças de camundongos, TRISCHMANN et al (1978) sugerem que talvez esta resistência estaria relacionada a um simples ou múltiplos componentes genéticos, aliás indefinidos, independentes, no entanto, do locus de histocompatibilidade H_2 do camundongo visto que camundongos com o mesmo locus manifestaram diferentes susceptibilidades ao *T. cruzi*.

As discrepâncias verificadas entre a mortalidade e o nível de anticorpos nas raças F_1 e BH, sugerem o pouco que conhecemos sobre os fenômenos envolvidos na infecção pelo *T. cruzi* e sobre os fatores que a controlam. No entanto, a presença de uma resposta humoral do tipo IgG mais intensa exatamente nos animais que apresentaram maior taxa de mortalidade (BH), sugere que a resposta humoral IgG seria um fenômeno do tipo "tudo ou nada" que juntamente com outros mecanismos de defesa seriam deflagrados pelo hospedeiro, na tentativa de controlar a infecção pelo tripanosoma invasor.

Além dos graus variáveis de resistência à infecção pelo *T. cruzi*, vários autores tem demonstrado que os animais sobrevi-

ventes à primoinfecção são resistentes à reinfecção (BRENER, 1962; 1963; 1967; NORMAN & KAGAN, 1960; KAGAN & NORMAN, 1962; GONZÁLEZ-CAPPA et al, 1974).

Neste trabalho também verificamos, confirmando os dados anteriores, que os camundongos (CBAXC₅₇Bl/10)F₁ primoinfectados com 100 formas da cepa Y são também altamente resistentes às reinfecções com inóculos letais (Tab. 3). Intervalos tão pequenos como 3 dias entre infecção e reinfecção foram suficientes para proteger os animais contra uma dose letal (10^5) de parasitas. Fenômeno semelhante, foi verificado em coelhos injetados com uma suspensão morta de pneumococos, que ficaram protegidos, 5 horas mais tarde, contra a infecção por pneumococos virulentos. Sendo este intervalo de tempo pequeno para a produção de anticorpos, foi sugerido que algum mecanismo não-específico estaria agindo logo após a infecção (WILSON & MILES, 1964). Porém, a proteção maior foi obtida quando o intervalo decorrido entre infecção e reinfecção foi de 14 e 30 dias (Tab. 3), tendo estes animais sobrevivido além de 12 meses após a reinfecção, diferentemente de KAGAN & NORMAN (1961) que observaram um período médio de sobrevivência de 90 dias.

A proteção conferida pela primoinfecção foi também observada através do estudo histológico dos órgãos (coração, baço e fígado) dos animais reinfectedados, que apresentaram infiltrado inflamatório pequeno e ausência de ninhos de amastigotas em relação ao grupo controle. Do mesmo modo a resposta humoral observada nestes animais reinfectedados sugere que tal proteção poderia ser conferida por anticorpos, visto que o aumento verificado após a reinfecção traz uma típica resposta humoral secundária (Tab. 4).

Este grau de resistência verificado nos camundongos F₁ tanto na infecção como na reinfecção não foi alterado mesmo quando os

animais foram esplenectomizados, confirmando os resultados de TRISCHMANN et al (1978) e BRENER et al (1978). Assim sendo, através da parasitemia, da taxa de mortalidade e do nível de anticorpos (Tab. 1 e Tab. 4) não observamos um agravamento na infecção, embora através do estudo histológico tenha se verificado um aumento do infiltrado inflamatório e do número de ninhos de amastigotas no fígado e baço (Fig. 2).

Os dados acima nos indicam que além do papel das células T, aliás ainda não totalmente definido, na defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi* (CORSINI & STELINI JR., em publicação), os anticorpos também participariam em tal defesa. Assim sendo, o nível de anticorpos verificado nos animais da raça (CBAXC₅₇B1/10)F₁, a qual foi altamente resistente, aumentou gradativamente durante a infecção, atingiu um título máximo de log 3,00 na décima semana e conservou-se alto até um ano após a infecção. Além disso, como discutimos acima, animais que foram resistentes à reinfecção apresentaram um aumento do nível de anticorpos, típico de uma resposta humoral secundária. Estes dados demonstraram, portanto, a importância da resposta humoral do tipo IgG ao *T. cruzi* e o papel protetor destes anticorpos na infecção, dados estes que confirmam aqueles obtidos por TAKEHARA & MOTA (1979), que demonstraram o papel protetor dos anticorpos das subclasses IgG_{2a} e IgG_{2b}, porém não da classe IgM.

Além da importância da quantidade de anticorpos na defesa do hospedeiro contra o *T. cruzi* durante a infecção e em casos de reinfecção, provavelmente a rapidez com que o hospedeiro responde a este parasita produzindo níveis relativamente altos de anticorpos no início da infecção, pareceu-nos um fator determinante do curso da infecção em cada hospedeiro.

Assim sendo, verificou-se que os camundongos das raças F₁ e BH, que apresentaram menor taxa de mortalidade em relação à ra-

ça susceptível BL, tiveram um maior nível de anticorpos, no período pré-patente da infecção (até o 5º dia) quando os anticorpos não haviam sido ainda detectados na raça BL (Tab. 2).

Em consequência, os camundongos da raça BL apresentaram uma alta parasitemia e não controlaram a infecção, resultando portanto em alta taxa de mortalidade.

Assim sendo, sugerimos que a grande susceptibilidade dos camundongos à infecção por *T. cruzi* pode ser devido a um retardo na produção de anticorpos do tipo IgG e não uma ausência total de resposta humoral, uma vez que anticorpos são detectados mais tardiamente na infecção, embora em níveis mais baixos (Tab. 4).

Os trabalhos anteriores de CULBERTSON et al (1938) e KIERSZENBAUM & HOWARD (1976) apoiam tal idéia sobre a importância dos anticorpos no período pré-patente, pois ambos verificaram que proteção à infecção por *T. cruzi* poderia ser alcançada através da administração passiva de soro imune logo nos primeiros dias de infecção.

A importância dos anticorpos no início da infecção foi novamente verificado nos experimentos sobre imunossupressão com ciclofosfamida (CY) e hidrocortisona (HY), visto que os camundongos F₁ e BH tiveram um aumento da parasitemia e da taxa de mortalidade, bem como uma diminuição no título de anticorpos, quando foram tratados no início da infecção.

Assim, quando a CY foi administrada durante 3 dias imediatamente após a infecção, houve um aumento de parasitemia (Fig. 3), 100% de mortalidade em 20 dias e os anticorpos somente foram detectados no 15º dia e em níveis muito baixos (Tab. 5). Por outro lado, o tratamento durante 3 dias antes da infecção provocou supressão significativamente menor do título de anticorpos, com a consequente

diminuição da parasitemia e taxa de mortalidade.

Por outro lado, a administração de CY na fase crônica da infecção provocou pequeno aumento da parasitemia (Fig. 5) e 60% de mortalidade. Quando os animais na fase crônica da infecção foram reinfectedados e tratados com a droga durante 3 dias antes ou após a reinfecção, houve uma taxa de mortalidade de 90% e 80% respectivamente, em comparação com a mortalidade nula nos controles apenas reinfectedados. Além disso, observa-se que o grupo tratado com CY antes da reinfecção apresentou maior parasitemia em relação ao tratamento após a reinfecção (Fig. 5), diferentemente do que ocorreu na fase aguda, em que maior supressão foi verificada com o tratamento após a infecção (Fig. 3). Em outras palavras, o tratamento com CY previamente à reinfecção, atuaria a nível das células responsáveis pela manutenção do controle da infecção, bloqueando a sua proliferação determinando assim um maior aumento da parasitemia.

Da mesma maneira, nestes animais tratados com CY antes ou após a reinfecção foi observada uma diminuição no título de anticorpos para log 1,50 e log 1,80, respectivamente (Tab. 6), em relação a log 2,70 nos controles apenas reinfectedados. No entanto, embora tenhamos verificado alta mortalidade e supressão no título de anticorpos na fase crônica, não pudemos concluir sobre a sua significância, uma vez que utilizamos "pools" de soros e não soros individuais.

Da mesma maneira, BRENER & CHIARI (1971) observaram anteriormente que camundongos na fase crônica da infecção pela cepa CL de *T. cruzi*, quando tratados com agentes imunossupressores como radiação gama ou ciclofosfamida, reverteram à fase aguda apresentando alta parasitemia.

Os animais imunossuprimidos tanto com CY como com HY no início da infecção apresentaram no fígado e baço um aumento do nú

mero de ninhos de amastigotas e acentuada diminuição na reação inflamatória (Fig. 4), mostrando portanto, a ação dos imunossupressores sobre as células do infiltrado inflamatório. Possivelmente, estas células exerceriam um papel protetor, visto que parece haver uma relação inversa entre a intensidade do infiltrado celular e o número de ninhos de amastigotas.

Vários mecanismos tem sido discutidos sobre o efeito da CY nos tecidos linfóides e portanto na resposta imune (TURK et al, 1972; STOCKMAN et al, 1973; SHAND & LIEW, 1980). WILLIAMS & CHASE (1976) sugeriram que a CY bloquearia a replicação de DNA, que na resposta imune sabe-se ocorre na fase proliferativa, ou seja, nos primeiros dias após a administração do antígeno. Daí a imunossupressão pela CY ser mais eficaz quando a droga é administrada logo após a imunização.

Por outro lado, tem sido demonstrado uma importante ativação Policlonal do sistema linfóide logo após a infecção pelo *T. cruzi* (ORTIZ-ORTIZ, 1980; CORSINI & COSTA, 1981). Assim sendo, a administração de CY neste período de ativação policlonal impediria ou retardaria tal proliferação celular, inclusive de células produtoras de anticorpos específicos para o parasita, aumentando assim a gravidade da infecção.

Do mesmo modo, o tratamento de animais no início da fase aguda da infecção com a HY nas doses de 10 mg/dia/10 dias induziu um aumento de parasitemia, com 100% de mortalidade em 20 dias e uma supressão humoral semelhante à obtida pelo tratamento com CY após a infecção, qual seja, não detectou-se anticorpos até o 10º dia de infecção. Porém, no 15º dia após a infecção o título de anticorpos verificado nestes animais tratados com HY foi idêntico (log 1,50) aos controles infectados e não tratados (Tab. 5), mostrando portan-

to, que recuperação da resposta humoral ocorreu tão logo terminada a administração da droga.

Entretanto, quando o tratamento foi iniciado cinco dias antes ou dez dias após a infecção, não houve alteração na parasitemia e taxa de mortalidade, assim também como o tratamento com HY dos camundongos F_1 cronicamente infectados ou então reinfectedos com a dose letal de parasitas, não alterou a parasitemia (Fig. 5) e o título de anticorpos (Tab. 6).

Os possíveis mecanismos de ação dos corticóides e o tipo de célula em que agem, ainda permanecem complexos e controversos (DRACOTT & SMITH, 1979b; FERREIRA et al, 1973; BENNER & OUDENAREN, 1979; FAUCI, 1975; FAUVE, 1970). Assim, há autores (CLAMAN, 1972; COHEN & CLAMAN, 1971b; DRACOTT & SMITH, 1979a) que admitem a ação dos corticóides sobre as células B, em contraste com a resistência das células T, porém, LEVINE & CLAMAN (1970) verificaram que as células T esplênicas são sensíveis a ação de corticóides.

Uma vez que apenas as células não estimuladas pelo antígeno seriam corticóides sensíveis (CLAMAN, 1972), isto explicaria o efeito imunossupressor da HY apenas quando administrada no período pré-patente da infecção, da mesma maneira como DRACOTT & SMITH (1979a) verificaram maior supressão de resposta humoral a hemáceas de carneiro, quando os camundongos foram tratados com HY um dia antes da imunização com o antígeno.

A supressão pela CY e HY observada nos camundongos BH na fase aguda da infecção foi idêntica aquela verificada nos camundongos F_1 (Tab. 5).

Portanto, os nossos experimentos de imunossupressão pela CY e HY também sugerem a importância dos anticorpos do tipo IgG no período pré-patente, pois a administração destas drogas no início

da infecção provocou supressão da resposta humoral, resultando num retardo da produção de anticorpos, com aumento da parasitemia e mortalidade. Estes dados confirmam por outro lado aqueles de BRENER (1963) de que os corticóides não modificaram o curso da infecção na fase crônica.

Nossos experimentos indicam também que os camundongos infectados apresentaram uma resposta humoral normal ao *T. cruzi*, diferentemente do que acontece com antígenos heterólogos, cuja resposta humoral está suprimida (CLINTON et al, 1975; RAMOS et al, 1978; CORSINI et al, 1980c).

Concluindo, sugerimos que as diferentes capacidades dos hospedeiros em responder prontamente a este tripanosoma produzindo anticorpos do tipo IgG logo no início da infecção, seria determinante para o destino do hospedeiro.

As diferenças clínicas e/ou patológicas verificadas nos indivíduos chagásicos, poderiam assim ser explicadas pela diferente resposta humoral do tipo IgG com que os hospedeiros respondem ao parasita no período pré-patente da infecção.

No entanto, outros fatores tais como a presença de células T imunes (CORSINI & STELINI JR.), a base genética e nutricional do hospedeiro, são provavelmente determinantes do futuro do hospedeiro na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

5 - RESUMO E CONCLUSÕES

Neste trabalho verificamos a importância dos anticorpos do tipo IgG na resposta imune de camundongos de diferentes raças (CBAXC₅₇Bl/10)F₁, BH e BL, infectados experimentalmente com tripomastigotas da cepa Y do *Trypanosoma cruzi*. Para isto observamos:

- a resposta humoral nos animais de diferentes raças infectados pelo *T. cruzi*.
- a parasitemia, a taxa de mortalidade e a resposta humoral em animais das diferentes raças, cuja resposta imune foi suprimida por esplenectomia ou tratamento com drogas imunossupressoras (hidrocortisona e ciclofosfamida).

Nossos resultados nos permitem concluir que:

- 1 - Camundongos da raça (CBAXC₅₇Bl/10)F₁ apresentaram grande resistência à infecção por 10² tripomastigotas da cepa Y de *T. cruzi*.
- 2 - A primoinfecção com inóculos pequenos de parasitas (10²) confere proteção à reinfecção com doses letais do mesmo parasita, proteção esta observada através da diminuição da mortalidade, do aumento no título de anticorpos e do estudo histológico (ausência de infiltrado inflamatório e de ninhos de amastigotas nos órgãos).
- 3 - As drogas imunossupressoras (ciclofosfamida e hidrocortisona) provocaram supressão relevante no título de anticorpos, quando administradas no período pré-patente da infecção, ao passo que esplenectomia não alterou o curso da infecção.
- 4 - Quando as drogas foram administradas na fase crônica e próximas à reinfecção, a ciclofosfamida causou supressão importante, porém a hidrocortisona não alterou o curso da infecção crônica.
- 5 - A resposta humoral observada no início da infecção (período pré-patente) nas raças F₁ e Biozzi "Bons" e "Maus" respondedores,

é fator determinante do rumo de infecção nas diferentes raças de camundongos.

Portanto, estes dados sugerem que além da resposta imune celular, da base genética e nutricional do hospedeiro e das diferentes raças do parasita, o nível de anticorpos do tipo IgG no início da infecção é um importante fator no destino do hospedeiro infectado pelo *T. cruzi*.

6 - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Andrade, S.G. and Andrade, Z.A. - Patologia da Doença de Chagas experimental de longa duração. *Revta. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 10:180-7, 1968.
2. Barreto, M.P. Reservatórios do *Trypanosoma cruzi*. In: Cançado, J.R. ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte - Brasil, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968a, p. 163-88.
3. Barreto, M.P. Transmissores do *Trypanosoma cruzi*: os Triatomíneos. In: Cançado, J.R., ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte - Brasil, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968b, p. 189-224.
4. Benner, R. and Oudenaren, A. Corticosteroids and humoral immune response of mice. II. Enhancement of bone marrow antibody formation of lipopolysaccharide by high doses of corticosteroids. *Cell. Immunol.* 48:267--5, 1979.
5. Biozzi, G., Stiffel, C., Mouton, D. and Bouthillier, Y. Selection of lines of mice with high and low antibody responses to complex immunogens. In: Benacerraf, B., ed. *Immunogenetics and Immunodeficiency*. Lancaster - England, MTP, 1975. p. 179-227.
6. Brener, Z. Observações sobre a imunidade à superinfecção em camundongos experimentalmente inoculados com *T. cruzi* e submetidos a tratamento. *Revta. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 4:119-25, 1962.
7. Brener, Z. and Chiari, E. Observações sobre a fase crônica da Doença de Chagas experimental do camundongo. *Revta. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 5:128-32, 1963.

- 4019/BC
8. Brener, Z. Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com *T. cruzi*. *Revta. Inst. Med. Trop. S. Paulo*. 9:233-8, 1967.
 9. Brener, Z. Terapêutica experimental. In: Cançado, J.R., ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte - Brasil. Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p. 501-16.
 10. Brener, Z. and Chiari, E. The effects of some immunosuppressive agents in experimenral chronic Chagas' disease. *Trans. R. Soc. trop. Med. Hyg.* 65:629-36, 1971.
 11. Brener, Z., Krettli, A.U. and Alcantara, A. Role of the spleen in Chagas' disease. *The role of the spleen in the Immunology of parasitic diseases*. Tropical Diseases Resarch Series nº 1. Schwabe and Co. A.G., Basel, 1978. p. 121-35.
 12. Brumpt, E. Immunité partielle dans les infections à *Trypanosoma cruzi* transmission de ce trypanosome par *Cimex rotundus*. Rôle regulateur des hotes intermédiaires. Passage à travers la peau. *Bull. Soc. Path. exot.* 6:172-6, 1913.
 13. Burgess, D.E. and Hanson, W.L. Adoptive transfer of protection against *Trypanosoma cruzi* with lymphocytes and macrophages. *Inf. Immun.* 25:838-43, 1979.
 14. Burke, J.P., Weymouth, R.J. and Seibel, H.R. Histological methods. *Essentials of histology*. New York, Barron's Educational Series, Inc. 1972. p. 5-17.
 15. Camargo, M.E. Fluorescent antibody test for the serodiagnosis of American Trypanosomiais. Technical modification employing preserved culture forms of *T. cruzi* in a slide test. *Revta. Inst. Med. trop. S. Paulo*. 8:227-34, 1966.

16. 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 mórvida no homem. Mem. Inst. Oswaldo Cruz. 1:159-218, 1909.
17. Claman, H.N. Corticosteroids and lymphoid cells. New Engl. J. Med. 287:388, 1972.
18. Clinton, B.A., Ortiz-Ortiz, L., Garcia, W., Martinez, T. and Capin, R. *T. cruzi*: Early immune response in infected mice. Exp. Parasit. 37:417-25, 1975.
19. Cohen, J.J. and Claman, H.N. Hydrocortisone resistance of activated initiator cells in graft versus host reactions. Nature. 229:274-5. 1971a.
20. Cohen, J.J. and Claman, H.N. Thymus-marrow immunocompetence. V-Hydrocortisone resistant cells and process in the hemolytic antibody response of mice. J. Exp. Med. 133:1026-34, 1971b.
21. Corsini, A.C., Oliveira, O.L.P. and Costa, M.G. Unimpaired delayed type hypersensitivity reactions in mice infected with *T. cruzi* strain Y. Z. Parasitenkunde. 61:179-85, 1980a.
22. Corsini, A.C., Costa, M.G., Oliveira, O.L.P., Camargo, I.J.B. and Stelini Jr., A. Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. Revta. Inst. Med. trop. S. Paulo. 22:192-6, 1980b.
23. Corsini, A.C., Oliveira, O.L.P. and Costa, M.G. Humoral suppression in *Trypanosoma cruzi* infection in relation to the timing of antigen presentation. Z. Parasitenkunde. 64:85-95, 1980c.
24. Corsini, A.C. and Costa, M.G. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). 1-Evidence of polyclonal B cell activation in experimental infection mimicked by an

- extract prepared from circulating trypomastigotes. *Revta. Inst. Med. trop. S. Paulo*, 23:114-121, 1981.
25. Corsini, A.C. and Stelini Jr., A. Immune T cells control *Trypanosoma cruzi* infections. *Experientia*, no prelo.
 26. Cossio, P.M., Laguens, R.P., Diez, C., Szarfman, A., Segal, A. and Arana, R.M. Chagasic cardiopathy antibodies reacting with plasma membrane of striated muscle and endothelial cells. *Circulation*. 50:1252-9, 1974.
 27. Cossio, P.M., Laguens, R.P., Kreutzer, E., Diez, C., Segal, A. and Arana, R.M. Chagasic cardiopathy. Immunopathologic and morphologic studies in myocardial biopsies. *Amer. J. Pathol.* 86:533-9, 1977.
 28. Culbertson, J.T., Kolodny, M.H. and Maxwell, H. Acquired immunity in rats against *T. cruzi*. *J. Parasitol.* 24:83-90, 1938.
 29. Dracott, B.N. and Smith, C.E.T. Hydrocortisone and the antibody response in mice. I-Correlations between serum cortisol levels and cell numbers in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunol.* 38:429-35, 1979a.
 30. Dracott, B.N. and Smith, C.E.T. Hydrocortisone and the antibody response in mice. II-Correlations between serum antibody and PFC in thymus, spleen, marrow and lymph nodes. *Immunol.* 38:437-43, 1979b.
 31. Fauci, A.S. Mechanisms of corticosteroids action on lymphocyte subpopulations. I-Redistribution of circulating T and B lymphocytes to the bone marrow. *Immunol.* 28:669-80, 1975.
 32. Fauve, R.M. The effect of corticosteroids on some functions of macrophages. In: Furth, R., ed. *Mononuclear phagocytes*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1970. p. 265.

33. Fernandes, J.F. e Castellani, O. Nutrição e crescimento do *Trypanosoma cruzi*. In: Cançado, J.R. ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte - Brasil. Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. c. 4, p. 68-86.
34. Ferreira, A., Moreno, C. and Hoecker, G. Lack of correlation between the effects of cortisone on mouse spleen plaque forming cells and circulating anti-sheep red blood cell haemolysis. *Immunol.* 24:607-16, 1973.
35. Goble, F.C. South American Trypanosomiasis. In: Jackson, G.J., Herman, R. and Singer, I. *Immunity to parasitic animals*. New York, Appleton-Century-Croft, 1970. V. 2, p. 597-689.
36. González-Cappa, S.M., Pesce, U.J., Cantarella, A.I. and Schmuñiz, G.A. *T. cruzi*: protection of mice with epimastigotes antigens from immunological different parasite strains. *Exp. Parasitol.* 35:179-86, 1974.
37. Hanson, W.L. Immunology of American Trypanosomiasis. In: Cohen, S. and Sadum, E., ed. *Immunology of parasitic infections*. Oxford, Blackwell Scientific Publications, 1976. p. 222 -33.
38. Kagan, I.G. and Normam, L. Immunological studies on *Trypanosoma cruzi*. III-Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 108:213-7, 1961.
39. Kagan, I.G. and Norman, L. Immunological studies on *Trypanosoma cruzi*. IV-Serial transfer of organism from immune to non-immune mice. *J. Parasitol.* 48:584-8, 1962.
40. Khoury, E.L., Ritacco, V., Cossio, P.M., Laguens, R.P., Szarfman, A., Diez, C. and Arana, R.M. Circulating antibodies to peripheral nerve in American Trypanosomiasis (Chagas' disease). *Clin. Exp. Immunol.* 36:8, 1979.

41. Kierszenbaum, F. and Howard, J.G. Mechanisms against experimental *T. cruzi* infections: the importance of antibodies and antibody - forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. *J. Immunol.* 116:1208-11, 1976.
42. Kierszenbaum, F. and Pienkovski, M.M. Thymus-dependent control of defense mechanisms against *Trypanosoma cruzi* infection. *Inf. Immun.* 24:117-20, 1979.
43. Köberle, F. Patogenia da Moléstia de Chagas. In: Cançado, J.R., ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte - Brasil. Imprensa Oficial Estado de Minas Gerais, 1968, p. 238-60.
44. Krettli, A.U. and Brener, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 116:755-60, 1976.
45. Krettli, A.U. and Eisen, H. Fabulation in *T. cruzi*: a mechanism of escape from the host immune system. VII Reunião Anual sobre Pesquisa Básica em Doença de Chagas. Caxambu - M.G. - Brasil, 1980.
46. Levine, M.A. and Claman, H.N. Bone marrow and spleen: dissociation on immunologic properties by cortisone. *Science.* 167:1515-17, 1970.
47. Macedo, V. Forma indeterminada da Doença de Chagas. *J. Bras. Med.* 38:34, 1980.
48. Norman, L. and Kagan, I.G. Immunologic studies on *Trypanosoma cruzi*. II-Acquired immunity in mice infected with avirulent American strains of *T. cruzi*. *J. Infect. Dis.* 107:168-74, 1960.
49. Nussenzweig, V., Deane, L.M. and Kloetzel, J. Acquired immunity in mice infected with strains of immunological types A and B of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 14:233-9, 1963.

50. Ortiz-Ortiz, L., Parks, D.E., Rodriguez, M. and Weigle, W.O.
Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infections. *J. Immunol.* 124:121:6, 1980.
51. Pereira da Silva, L.H. and Nussenzweig, V. Sobre uma cepa de *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. São Paulo.* 20:191-201, 1953.
52. Pizzi, T., Agostin, M., Christen, R., Hoecker, G. and Negheme, A.
Estudios sobre imunobiologia de las enfermedades parasitarias: I-Influencia de la constitucion genetica de las lanchas a la infeccion experimental por *Trypanosoma cruzi*. *Boletín Informaciones Parasitarias Chilenas.* 4:48-9, 1949.
53. Ramos, C., Lamoyi, E., Feoli, M., Rodriguez, M., Perez, M. and Ortiz-Ortiz, L. *T. cruzi*: Immunosuppressed responses to different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.* 45:190-9, 1978.
54. Shand, F.L. and Liew, F.Y. Differential sensitivity to cyclophosphamide of helper T cells for humoral responses and suppressor T cells for delayed-type hipersensitivity. *Eur. J. Immunol.* 10:480-3, 1980.
55. Siqueira, M., Bandiari, A., Reis, M.S., Sant'Anna, O.A. and Biozzi, G. Selective breeding of mice for antibody responsiveness to flagellar and somatic antigens of *Salmonellae*. *Eur. J. Immunol.* 6:241, 1976.
56. Stockman, G.D., Hein, L.R., South, M.A. and Trentin, J.J.
Differential effects of cyclophosphamide on the B and T cells compartments of adult mice. *J. Immunol.* 110:277-82, 1973.
57. Takehara, H.A. and Mota, I. Role of different antibody classes in protection against *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *Congresso Internacional sobre Doença de Chagas.* Rio de Janeiro-

ro - Brasil, 1979.

58. Teixeira, A.R.L. and Santos-Buch, C.A. The immunology of experimental Chagas' disease. I-Preparation of *Trypanosoma cruzi* antigens and humoral antibody response to these antigens. *J. Immunol.* 113:859-69, 1974.
59. Teixeira, A.R.L. Autoimmune mechanisms in Chagas' Disease. *New Approaches in American Trypanosomiasis Research*, Proceedings of an International Symposium Belo Horizonte - M.G. - Brasil. Pan American Health Organization, 1975. p. 98-108.
60. Teixeira, A.R.L. Immunoprophylaxis against Chagas' Disease. In: Miller, L.H., Pino, J.A. and McKelvey, J.J., ed. *Immunity to blood parasites of animals and man*. New York, Plenum Press, 1977. p. 243-80.
61. Trischmann, T., Tanowitz, H., Wittner, M. and Bloom, B. *T. cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.* 45:160-8, 1978.
62. Turk, J.L, Parker, D. and Poulter, L.W. Functional aspects of the selective depletion of lymphoid tissue by cyclophosphamide. *Immunol.* 23:493-501, 1972.
63. Yanovsky, J.F. and Albado, E. Humoral and cellular response to *Trypanosoma cruzi* infection. 109:1159-61, 1972.
64. Willians, C.A. and Chase, M.W. Immunosuppression and induction of tolerance with chemical agents. In: Willians, C.A. and Chase, M.W., ed. *Immunology and Immunochemistry*. London, Academic Press, 1976. v. 5, p. 225-38.
65. Wilson, G.S. and Miles, A.A. Some non-specific mechanisms in general immunity. In: Wilson, G.S. and Miles, A.A., ed. *Principles of Bacteriology and Immunity*. London, Edward Arnold (Publishers) Ltd., 1964. v. 2, p. 1448-75.

66. World Health Organization. Report of meeting of the task force on chemotherapy of African Trypanosomiasis. Geneva. 5-9 May. 1975.
67. World Health Organization. Report of the first meeting of the scientific working group of Chagas' Disease. Buenos Aires-Argentina. 14-18 Nov. 1977.