

FILOMENA MARIA PERRELLA BALESTIERI

ESTUDO DAS POPULAÇÕES CELULARES DE GÂNGLIO POPLÍTEO
NA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Tese apresentada ao Instituto
de Biologia da Universidade
Estadual de Campinas para ob-
tenção do título de Mestre em
Biologia (Imunologia).

Orientador: Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo.

Campinas - S. Paulo.

1985

"Olhai para as aves do céu, que
nem semeiam, nem segam, nem
ajuntam em celeiros...
Olhai para os lírios do campo,
como eles crescem . . . "

(São Mateus, 26:26-8) .

Este exemplar corresponde a
redação final da tese defendida
pela aluna Filomena M. P.
Balestiere e aprovada pela
comissão julgadora

10/12/85



A

Maria Benedicta de L.P. Balestieri,
minha mãe

José Benedito Perrella Balestieri

e

José Antônio Perrella Balestieri,
meus irmãos e

Ruy Brasileiro Borges ,

que me ensinaram a amar a Vida
e a lutar por este amor.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de tese, acima de tudo, é um encontro do homem consigo mesmo e com seus semelhantes. Assim sendo, para mim, esta tese é algo em aberto, fruto do meu ser em crescimento diante da Vida. Um crescimento partilhado com pessoas que me ensinaram a maravilhosa diversidade e riqueza do ser humano, no tocante não só aos conhecimentos técnicos-científicos mas em relação ao próprio sentido do ser e estar aqui. Alguns de forma consciente, outros ainda não, fizeram-me caminhar, durante estes anos, por caminhos novos e amplos, dos quais a Imunologia é apenas um deles.

Agradecer a todas estas pessoas citando seus nomes, restringiria demais minha necessidade de comunicar a importância de cada uma delas, que viveram comigo e em mim, antes e durante a tese e neste momento agora.

Só posso agradecer a todos dizendo que esta tese não é obra somente minha mas também daqueles que caminharam comigo durante todo este tempo.

AGRADECIMENTO ESPECIAL

Agradecemos em especial à FAPESP ,da qual recebi bolsa de Mestrado, durante o período de 2 anos e meio, à FINEP e ao CNPq.

ÍNDICE

1. INTRODUÇÃO
2. MATERIAL E MÉTODOS.
 - 2.1. Animais.
 - 2.2. Trypanosoma cruzi.
 - 2.3. Infecção experimental por T. cruzi.
 - 2.4. Obtenção do complexo Peroxidase-Anti-Peroxidase (PAP) .
 - 2.4.1. Imunização dos coelhos com peroxidase.
 - 2.4.2. Determinação da zona de equivalência e titulação do antisoro.

- 2.4.3. Preparação do complexo Peroxidase - Anti-Peroxidase.
- 2.4.4. Determinação do título do complexo PAP.
- 2.5. Obtenção do soro de carneiro anti-IgG de coelho.
- 2.6. Obtenção do soro de coelho anti-linfócito T de camundongo.
 - 2.6.1. ~~Absorção do antisoro.~~
 - 2.6.2. Determinação do título do antisoro.
- 2.7. Obtenção do soro de coelho anti-IgG de camundongo.
 - 2.7.1. Purificação do soro de coelho anti - IgG de camundongo.
 - 2.7.2. Determinação do título do antisoro.
- 2.8. Parasitemia das linhagens isogênicas CBA/J , C57Bl/10 e F1 (C57Bl/10 X CBA/J).
- 2.9. Determinação do peso dos gânglios poplíteos normais e infectados.
- 2.10. Obtenção das suspensões celulares dos gânglios poplíteos.
- 2.11. Determinação do número de macrófagos.
- 2.12. Detecção citoenzimática de linfócitos T e B em camundongos inoculados com T. cruzi.
- 2.13. Análise estatística.

3. RESULTADOS.

3.1. Caracterização e especificidade dos soros utilizados.

3.1.1. Complexo Peroxidase-Anti-Peroxidase.

3.1.2. Soro de carneiro anti-IgG de coelho.

3.1.3. Soro de coelho anti-linfócito T de camundongo.

3.1.4. Soro de coelho anti-IgG de camundongo.

3.2. Resposta imune de camundongos F1(C57Bl/10 X CBA/J) , CBA/J e C57Bl/10 infectados com T. cruzi.

3.2.1. Infecção em camundongos isogênicos das três linhagens.

3.2.2. Peso dos gânglios poplíteos.

3.2.3. Número de células dos gânglios poplíteos.

3.2.4. Relação entre o peso e o número de células dos gânglios poplíteos.

3.2.5. Número total e porcentual de linfócitos T , B e macrófagos dos gânglios poplíteos.

4. DISCUSSÃO.

5. RESUMO E CONCLUSÕES.

6. BIBLIOGRAFIA.

INTRODUÇÃO

Do início do século XX (1909), num laboratório acondicionado num vagão, em terras mineiras, até os nossos dias, em modernos laboratórios distribuídos pelas Américas e Europa, a doença de Chagas tem sido objeto de intensa pesquisa.

Numa época em que o lema era "Face a um doente é preciso antes de tudo pensar sifiliticamente" (Chagas Filho, 1979) , o hemoflagelado Trypanosoma cruzi foi descrito por Carlos Chagas e correlacionado com uma "nova entidade mórbida do homem", a qual foi denominada tripanossomíase americana ou doença de Chagas como atualmente é mais conhecida.

Através de observações de campo e exames de sangue de pacientes, animais domésticos e selvagens, Carlos Chagas descreveu o agente etiológico da doença, sua patogenia, seu vetor e o processo de transmissão, abrindo o campo de estudo de uma das doenças tropicais de maior ocorrência na

América do Sul e Central.

Nestes 76 anos (1909- 1985), a tripanossomíase americana tem sido estudada através de dois diferentes aspectos: a tripanossomíase natural, incluindo infecção congênita (Bittencourt et al.1972; Szarfman et al.1975), acidental (Hanson,1974) ou pós -transfusional (Becker,1975;Teixeira , 1977) e a tripanossomíase experimental (rev. Brener,1980), utilizando modelos animais.

A tripanossomíase humana afeta atualmente entre 10 a 20 milhões de pessoas na América do Sul e Central (Bloom, 1979; Krettli,1982; Miles,1982), apresentando-se desde as formas de infecção inaparente até as formas mais graves e fatais, ocorrendo em diversos graus intermediários.

Este elevado número de chagásicos pode ser atribuído ao deslocamento do ciclo silvestre para zonas urbanas e às condições rudimentares de moradia que propiciam a domiciliação dos vetores. Paralelamente, contribuem para este fato a dificuldade de diagnóstico de fase aguda e a inexistência de métodos terapêuticos eficazes.

A infecção humana caracteriza-se pela existência de quatro fases: período de incubação, fase aguda, fase indeterminada e fase crônica (W.H.O.,1974).

O período de incubação, na maioria dos casos, pode ser assintomático e se segue à penetração de formas tripomastigota através da membrana mucosa, principalmente dos olhos. Estas formas infectantes encontram-se no intestino de insetos redutíveis hematófagos e são liberadas com as fezes. Após a penetração na mucosa, estas formas tripomastigota diferenci-

am-se em amastigota e proliferam por divisão binária, em células do sistema fagocítico mononuclear, células musculares ou outras.

A fase aguda é marcada pela diferenciação dos amastigota em tripomastigota, que rompem as células hospedeiras, caem na corrente sanguínea, reinfectando novas células. Esta fase, na maioria das vezes, não é percebida, exceto em crianças (Hoare, 1972), sendo caracterizada pelo quadro de miocardiopatia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia e parasitemia. (Köberle, 1968)

Após ocorrência de elevado número de parasitas no sangue, segue-se um período de parasitemia baixa ou negativa que caracteriza a fase indeterminada, assintomática que pode durar de 10 a 20 anos ou indefinidamente.

Os pacientes que superam a fase aguda e a fase indeterminada podem evoluir para a fase crônica quando o comprometimento do sistema digestivo ou circulatório é manifesto.

A evolução dos estágios da infecção e suas manifestações estão na dependência das características das cepas de T. cruzi envolvidas e dos processos imunes desenvolvidos pelo hospedeiro.

As características das cepas de T. cruzi tem sido determinadas mediante estudos morfológicos, bioquímicos e quimioterápicos e mais recentemente, por clonagem do parasita (Postan et al. 1983). Estes estudos evidenciam variações dentro de uma mesma cepa (Crane e Dvorak, 1982) e entre

cepas diferentes (rev. Brener,1980) determinando diferenças no tropismo celular, parasitemia, capacidade de desenvolver lesões (Brener,1979) e induzir produção de imunoglobulinas (Postan et al.1983).

Dentro de uma mesma cepa ,tem sido observadas variações na morfologia do parasita as quais são correlacionadas com diferenças térmicas em regiões do organismo hospedeiro (Trejos et al.1963) ou com graus diferentes de maturação das formas tripomastigota (Brener e Chiari,1963).Em algumas cepas ocorre um predomínio de formas delgadas durante todo o curso da infecção experimental, enquanto que em outras, estas formas são a maioria na fase inicial, sendo substituídas posteriormente por formas largas.(Brener e Chiari,1963)

Uma das diferenças entre as cepas é o tropismo celular demonstrado principalmente pela cepa Y, que parasita células macrofágicas e pela cepa Cl, que infecta células musculares lisas, estriadas ou cardíacas (Melo e Brener,1978).

Em relação à patogenia da doença, tem sido sugerido que enzimas proteolíticas ou toxinas são liberadas por algumas cepas do parasita e que estas poderiam atuar sobre fibras do miocárdio e neurônios (Köberle e Alcantara,1960 ; Tafuri,1974). O conhecimento acerca destas enzimas proteolíticas de T. cruzi ainda é restrito, tendo sido caracterizada recentemente uma proteinase que se apresenta sobre a superfície de formas epimastigota, tripomastigota e amastigota de diferentes linhagens deste parasita.(Rangel et al.1981) Além das enzimas proteolíticas, outros diferentes antígenos tem sido identificados em diferentes formas evolutivas do pa

rasita (Kloetzel et al.1975) seja de sua superfície celular (Alves e Colli,1974;Repka et al.1980;Tamashiro et al.1983) ou excretadas em fluidos orgânicos dos animais infectados. (Araújo,1976; Araújo et al.1978;Bongertz et al.1981)

Com a caracterização da membrana celular de T. cruzi, mecanismos de evasão e processos imunopatológicos correlacionados a estes antígenos tem sido sugeridos. Um dos mecanismos de evasão estudado é a aquisição de antígenos celulares pela superfície do parasita, como foi demonstrado "in vitro", recentemente por Chess et al.(1983). Por outro lado, a liberação de antígenos do parasita e a sua adsorção à células neuronais e musculares tem sido descritos como fatores desencadeantes das imunopatologias observadas em pacientes chagásicos humanos (Santos-Buch,1979). Neste sentido, alguns autores tem demonstrado que células do retículo sarcoplasmático da musculatura estriada (Sadigursky et al.1982), certos neurônios (Wood et al.1982) e a laminina da membrana basal (Szarfman et al.1982) apresentam determinantes antigênicos semelhantes aos antígenos parasitários.

Frente a este parasita complexo, que se apresenta como um mosaico antigênico, o hospedeiro tem o sistema imune estimulado e sua resposta é dependente da classe animal (Nery Guimarães e Lage,1972;Kierszenbaum et al.1981), de seu padrão genético (Pizzi et al.1949;Trischmann et al.1978; Trischmann e Bloom, 1982;Wrightsman et al.1982), idade (Kolodny, 1940), sexo (Chapman et al.1975), inóculo e cepas de T. cruzi (Brener,1969;Krettli e Brener,1976).

Em animais de classes inferiores, tais como os an

fíbios e as aves, existe uma imunidade natural ao T. cruzi, sendo esta, nas aves, dependente da ativação do complemento pela via alternativa. (Kierszenbaum et al. 1981).

Entre os mamíferos, a imunidade natural e adquirida tem sido estudada em pacientes e em animais infectados mas dada a complexidade de seus sistemas imunes, os mecanismos envolvidos nesta interação parasito-hospedeiro ainda não estão totalmente elucidados.

Nos pacientes humanos, os estudos desenvolvidos durante a infecção geralmente se restringem à fase crônica, quando a maioria dos casos são diagnosticados.

Diante desta dificuldade diversos modelos experimentais tem sido desenvolvidos utilizando coelhos (Teixeira et al. 1975), cães (Andrade et al. 1974), macacos (Seah et al. 1974; Marsden et al. 1970), ratos (Scorza e Scorza, 1972; Ravelli et al. 1980) e linhagens isogênicas de camundongos. (Trischmann et al. 1978; Corsini et al. 1980a).

Pela facilidade de reprodução e manutenção em condições de laboratório e pelos conhecimentos adquiridos em relação ao seu sistema imune e genético, os camundongos de linhagens isogênicas tem sido o modelo experimental mais utilizado nestes últimos anos. Dentro deste sistema experimental, selecionaram-se linhagens de diferentes susceptibilidades à infecção. O grau de resistência natural destas linhagens isogênicas vem sendo descrito desde 1949 por Pizzi e colaboradores e parece ser governado por fatores genéticos múltiplos, incluindo pelo menos um locus próximo ou dentro do complexo maior de histocompatibilidade (H-2) (Trischmann e Bloom, 1982)

O "continuum" de resistência observado entre camundongos altamente susceptíveis- C3H/He - e camundongos moderadamente resistentes -C57Bl/10-tem sido correlacionado a fatores da resposta que em linhagens resistentes induziria uma eliminação mais efetiva do parasita,minimizando a parasitemia. (Trischmann et al.1978).

No entanto,outros aspectos a serem considerados no tocante à resistência seriam a virulência da cepa(Goble , 1951;Phillips,1960;Brener,1965) e o número de parasitas inoculados (Nattan-LARRIER,1921).Isto foi comprovado em camun - dongos de linhagem C57Bl/10 que são resistentes à cepa Brazil mas que se tornam susceptíveis a esta cepa quando um maior número de parasitas é inoculado (Trischmann et al.1978).

Dentre estas linhagens isogênicas,consideram -se mais apropriados,modelos que reproduzem a infecção humana,de desevolvendo as fases aguda e crônica da doença de Chagas. Tal característica é encontrada em camundongos altamente susceptíveis à infecção,quando infectados com um pequeno número de parasitas,como é o caso de camundongos da linhagem CBA/J inoculados com 25 formas da cepa Tulahuen (Kierszenbaum,1981, Kierszenbaum e Budzko,1982).Camundongos da geração F1,origi- nados do cruzamento entre linhagens resistentes e susceptí - veis,quando inoculados com baixa dose de parasitas,também são capazes de reproduzir as duas fases da infecção e são mais resistentes que os parentais. (Corsini et al.1980a ; Wrightsman et al.1982; Trischmann e Bloom,1982).

Os diversos graus de resistência das linhagens isogênicas à infecção pelo T. cruzi tem sido correlacionados

à capacidade de desenvolver uma resposta imune adequada ao parasita.

Uma das primeiras populações celulares a entrar em contato com o T. cruzi, no hospedeiro vertebrado, são as células macrofágicas, as quais se distribuem em diversas subpopulações (Wirth e Kierszenbaum, 1984), integradas em funções que vão desde a eliminação do parasita até a sua disseminação. Estas duas funções não estão ainda claramente distinguidas "in vivo" no hospedeiro e a função exata do macrófago ainda não está bem elucidada. (rev. Brener, 1980).

Os macrófagos podem comportar-se como células hospedeiras, dependendo da cepa do T. cruzi, sendo sugerido que este tropismo possa estar relacionado a características de membrana destas células (Alcântara e Brener, 1978) ou do próprio parasita (Andrews e Colli, 1982).

Tem sido demonstrado que tanto formas epimastigota quanto tripomastigota são capazes de aderir à superfície de macrófagos, no entanto, somente estas últimas, depois de interiorizadas, são capazes de evoluir, sendo as formas epimastigota destruídas. (Nogueira et al. 1977; Zeniam e Kierszenbaum, 1983). Após a interiorização, o parasita pode escapar da ação do fagossoma, multiplicar-se e destruir a célula hospedeira (Nogueira e Cohn, 1976), propiciando assim uma rápida disseminação da infecção.

Por outro lado, tem sido descrita a destruição de formas do T. cruzi no interior de macrófagos (Kierszenbaum et al. 1974; Williams e Remington, 1977; Nogueira e Cohn, 1978) e a participação destas células na apresentação de antígenos

do parasita aos linfócitos ,levando a uma resposta imune protetora ,durante a fase crônica (Kierszenbaum,1981).

A expressão de Ia (Behbehani et al.1981; Wirth e Kierszenbaum,1984) e de receptores C3b e Fc, a produção de peroxidase e esterase não-específica e o aumento de habilidade fagocítica (Wirth e Kierszenbaum,1984) em macrófagos ativados pelo T. cruzi sugerem uma possível interação entre estas células e linfócitos T,na resposta ao parasita. Esta interação entre linfócitos T e macrófagos ativados,através de mediadores como as linfocinas,tem sido demonstrada "in vitro" pela indução da morte e digestão de formas tripomastigota dentro de fagossomas. (Nogueira e Cohn,1978).

O envolvimento de macrófagos conjuntamente com anticorpos também tem sido observada através de lise de formas tripomastigota na presença de macrófagos imunes pré-incubados com anticorpos (Reed et al.1982).

O papel dos linfócitos T na infecção chagásica é de extrema importância pelo grande número de funções que estes exercem no organismo tanto como efetores quanto como intermediários na interação entre as células.

As primeiras observações que sugeriram a atuação de linfócitos T na infecção pelo T. cruzi ,referem-se à ruptura de células infectadas,causando às células vizinhas não-infectadas degeneração,necrose ou lise (Viana,1911),sendo este tipo de reação sugerido como uma hipersensibilidade desencadeada por produtos do parasita. (Magarino Torres,1929 ; Chagas,1934). Além da cardiopatia chagásica,recentemente tem sido sugerido que o sinal de Romaña e o edema palpebral (

Teixeira et al. 1978) também são evidências de hipersensibilidade do tipo tardio (DTH) na doença de Chagas.

A participação de linfócitos T nestes eventos da infecção chagásica humana tem sido confirmada através de testes de inibição de espraiamento (Seah, 1970), migração de leucócitos (Yanovsky e Albado, 1972) e transformação linfoblástica (Tshudi et al. 1972), embora testes de hipersensibilidade tardia a antígenos de T. cruzi sejam controvertidos em pacientes humanos (rev. Brener, 1980).

Nos modelos experimentais utilizando camundongos, a hipersensibilidade ocorre espontaneamente em períodos tardios da infecção, sendo induzida em fases iniciais através de adjuvantes e vacinas (Abrahamsohn et al. 1983).

A participação de linfócitos T na proteção à infecção tem sido observada em camundongos nu/nu (Trischmann et al. 1978; Kierszenbaum et al. 1979) ou ratos nu/nu (Rodriguez et al. 1983) que apresentam níveis elevados de parasitemia e altas taxas de mortalidade durante a fase aguda. Esta susceptibilidade exacerbada é abolida através de transplante tímico neonatal. (Kierszenbaum e Pienkowsky, 1979).

Confirmando o papel de linfócitos T na infecção tem sido apresentado que células esplênicas, enriquecidas com este tipo celular, levam a um aumento de sobrevivência e diminuição da parasitemia, quando inoculadas em camundongos. (Reed et al. 1980). Por outro lado, em camundongos susceptíveis - C3H/He - foi observado que suspensões celulares de baço depletadas de linfócitos T, provenientes de animais previamente sensibilizados com formas epimastigota, são mais eficientes na proteção à infecção do que suspensões contendo somente linfócitos T

(Trischmann e Bloom,1980).

Evidenciada a importância destas células na infecção chagásica, tem sido estudada a integridade funcional dos linfócitos T, em pacientes humanos e nas linhagens resistentes e susceptíveis, através de sua ativação "in vitro" frente a mitógenos específicos, antígenos de formas evolutivas do parasita ou antígenos heterólogos.

Durante a fase aguda, a maioria dos trabalhos descrevem uma supressão da resposta linfoblástica para mitógenos tais como fitohemaglutinina (Rowland e Kuhn,1978 ; Kierszenbaum ,1980;Kierszenbaum e Budzko,1982), concanavalina A (Ramos et al.1979;Tanowitz et al.1981;Kierszenbaum e Budzko,1982) em camundongos resistentes e susceptíveis e em pacientes humanos (Tshudi et al.1972).

Frente a antígenos heterólogos tem sido observada supressão frente a oxazolone (Reed et al.1977,1978), adjuvante completo de Freund (Reed et al.1977) e hemácias de carneiro (Lima Pereira ,1978).

A supressão de resposta a antígenos do próprio parasita também tem sido observada, na fase aguda. Em camundongos CBA/J esta supressão ocorre concomitantemente a uma severa depleção do compartimento de células T do baço, sugerindo ausência ou redução de células T acessórias e /ou efectoras (Hayes e Kierszenbaum,1981;Kierszenbaum,1981).

Além da resposta mediada por células T , supressão na fase aguda ocorre na resposta humoral a antígenos heterólogos T-dependentes ou T-independentes, tais como hemácias de burro (Clinton et al.1975;Ramos et al.1978), gamaglobulina humana

(Ramos et al.1978), hemácias de carneiro (Cunningham et al. 1978; Tanowitz et al.1981; Corsini et al.1981), DNP-Ficolle e lipopolissacáride (Ramos et al.1978) e antígenos do próprio parasita (Rowland e Kuhn,1978; Teixeira et al.1978). Efeito supressivo na resposta humoral a antígenos heterólogos -hemácia de carneiro- também tem sido observado utilizando extratos provenientes tanto de formas epimastigota -FAd - (Corsini et al.1980b) como da forma amastigota (Corsini et al.1981). Frente a mitógenos de linfócitos B tais como lipopolissacáride (Ramos et al.1979; Hayes e Kierszenbaum,1981; Tanowitz et al.1981; Kierszenbaum e Budzko,1982; Maleckar e Kierszenbaum,1983) também tem sido observada supressão.

A supressão da resposta imune, durante a fase aguda da doença de Chagas, tem sido correlacionada à susceptibilidade mais exacerbada do hospedeiro ao parasita (Cunningham et al.1978), em desacordo com as observações de outros autores que não confirmaram esta correlação (Tanowitz et al.1981).

Uma série de mecanismos com o envolvimento de células supressoras (Ramos et al.1979) e fatores séricos supressores (Cunningham et al.1980a) tem sido relacionados à supressão de fase aguda. Além da participação destas células e fatores, há a sugestão de que a imunossupressão seja determinada pela ativação policlonal, principalmente de linfócitos B, seguida de uma depleção clonal (Ortiz-Ortiz,1980). A depleção de linfócitos T no baço de camundongos infectados com T. cruzi (Hayes e Kierszenbaum,1981) também tem sido colocada como indutora de supressão e trabalhos "in vitro" tem demonstrado a inibição de proliferação de linfócitos T frente a produtos de formas sanguíneas do parasita (Maleckar e

Kierszenbaum,1983).

Embora,na fase aguda,a supressão esteja nitidamente caracterizada,na fase crônica o aparecimento deste fenômeno é controvertido. Scott (1981a) observou que ,em ca mundongos ,ocorrem células supressoras específicas -radiore-sistentes e sensíveis ao soro anti-Thyl.2-que inibem respos-tas de hipersensibilidade a antígenos de T. cruzi mas não a antígenos não-relacionados.Por outro lado,alguns autores tem demonstrado ,em camundongos,uma resposta normal de lin-foproliferação frente a antígenos de T. cruzi e de ativação mitogênica induzida por concanavalina A,fitohemaglutinina e lipopolissacáride (Kierszenbaum,1980;Hayes e Kierszenbaum , 1981).

Estes autores tem correlacionado o reestabeleci-mento da resposta imune aos níveis normais,durante a fase crônica,ã concomitante redução dos níveis parasitêmicos no sangue.Neste sentido,a produção de anticorpos específicos ao parasita tem sido sugerida como sendo o fator mais impor-tante da resposta imune,nesta fase. (Trischmann ,1983).

Desde os primeiros estudos da doença em pacien-tes humanos,a produção de anticorpos fixadores de complemen-to (Guerreiro e Machado,1913),aglutininas e precipitinas (Muniz e Freitas,1944) tem sido observada,tanto na fase agu-da como na fase crônica. Nestes pacientes,os anticorpos do tipo IgM ,durante a fase aguda,geralmente apresentam-se em altos títulos, (Cerisola ,1977;Teixeira et al.1978) sendo nor-malizado na fase crônica (Camargo e Takeda,1979).Os títulos

de IgG, por outro lado, mantém-se elevado durante toda a infecção, tanto em humanos como em animais experimentais. (rev. Brener, 1980).

O efeito protetor dos anticorpos tem sido demonstrado, em animais experimentais, através de transferência passiva de soro imune (Culbertson e Kolodny, 1938; McHardy, 1977; Krettli e Brener, 1976; Scott, 1981b), de frações de imunoglobulinas (Castelo Branco, 1978) e de células esplênicas depletadas de células T e macrófagos (Scott, 1981b) ou de células B (Trischmann, 1983).

A imunidade na fase crônica, segundo Scott (1981b), seria predominantemente dependente de células B, com envolvimento de linfócitos T auxiliares.

Este fato tem sido confirmado pelo aumento da concentração de IgG concomitante à diminuição de parasitas intracelulares e circulantes. A concentração máxima destas imunoglobulinas tem sido observada na 6^a semana de infecção e seu efeito protetor tem sido demonstrado pela sua transferência para animais normais, posteriormente infectados, reduzindo a parasitemia, a mortalidade e a densidade de estágios intracelulares. (Hanson, 1977)

Os mecanismos dependentes de anticorpos que são sugeridos como participantes no controle dos níveis parasitários, na sua maioria, tem sido estudados em modelos "in vitro", não sendo ainda estabelecidos os processos desenvolvidos "in vivo".

A opsonização de formas sanguícolas do parasita

tem sido verificada após incubação de soro de camundongos da fase crônica com células de fígado e baço. (Scott e Moyes, 1982). Apesar da descrição da atuação dos anticorpos citofílicos neste processo, não tem sido observado o aumento acentuado destes, nem em camundongos resistentes nem em susceptíveis. (Kuhn e Cassida, 1981).

Os mecanismos de lise também tem sido descritos "in vitro" através da ativação do complemento pelas vias clássica e alternativa, em soro de pacientes chagásicos crônicos (Budzko et al. 1975) e pela via alternativa, em camundongos na fase crônica. Em modelos experimentais, a ativação acentuada de complemento pela cepa Fl tem sido observada no 10º dia de infecção, sendo esta moderada na fase crônica. (Irulegui et al. 1980) Esta ativação tem sido associada à presença de complexos imunes particulados e solúveis na circulação e no coração. (Chaves et al. 1980). Em animais de complementados, tem sido observado que a cepa Fl induz maiores níveis parasitêmicos que a cepa Y. (Irulegui et al. 1982) Este comportamento distinto frente aos anticorpos ocorre nas cepas Y e Cl e parece ser dependente de características próprias de cada uma delas (Krettli e Brener, 1976; Krettli, 1978).

Além da lise mediada por soro imune de camundongo e pacientes crônicos, na presença de complemento, tem sido também descrita a lise de tripomastigota mediada por linfócitos, neutrófilos e eosinófilos humanos (Kierszenbaum, 1979 ; Kierszenbaum e Lima, 1983) ou granulócitos de camundongos (Kipnis et al. 1981), na presença de anticorpos.

Estudos "in vitro" com eosinófilos e neutrófilos de camundongos tem sugerido que estes mecanismos de defesa também podem induzir destruição tecidual, através de citotoxicidade celular dependente de anticorpos sobre células adsorvidas com antígenos de T. cruzi e anticorpos específicos (Lopez et al.1983).

Do exposto acima ,percebe-se que, apesar dos conhecimentos adquiridos acerca dos mecanismos desenvolvidos na interação de T. cruzi e seus hospedeiros, ainda não estão estabelecidas as relações entre resistência/susceptibilidade e a resposta imune.

Um dos principais obstáculos ao conhecimento destes mecanismos tem sido a heterogeneidade dos modelos experimentais ,impedindo estudos comparativos. Além disso, a grande maioria destes modelos não reproduz as condições naturais da infecção.

Dentro deste contexto,o objetivo principal desta tese é estudar,num modelo mais próximo da infecção natural,as populações celulares envolvidas na resposta imune ao T. cruzi ,no órgão linfóide que drena o local da inoculação - o gânglio poplíteo. Com o objetivo de se estabelecer possíveis relações entre a resistência/susceptibilidade e a resposta imune desencadeada contra o parasita,foram utilizadas três linhagens isogênicas de camundongos que apresentam diferentes graus de susceptibilidade. Neste sentido,os principais aspectos abordados referem-se às alterações ocorridas à nível de peso,número de células e populações celulares após infecção pelo T. cruzi.

MATERIAL E MÉTODOS

2.1. ANIMAIS.

Foram utilizados camundongos isogênicos, de ambos os sexos, das linhagens F1 (C57Bl/10 X CBA/J), CBA/J e C57Bl/10, com 3 a 4 meses de idade, criados no Biotério Central e mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

2.2. Trypanosoma cruzi

A cepa Y de T. cruzi (Pereira da Silva e Nussensweig, 1953) foi mantida em camundongos Swiss - 55 ou

CBA/J de 3 meses de idade e transferida semanalmente, por inoculação intraperitoneal de 10^5 formas de tripomastigota sanguícolas.

2.3. Infecção experimental por Trypanosoma cruzi.

Lotes de camundongos F1 (C57Bl/10 X CBA/J), CBA/J e C57Bl/10 foram inoculados com 10^2 formas de T. cruzi, pelo coxim plantar da pata direita, via subcutânea (s.c.).

2.4. Obtenção do complexo Peroxidase -Anti-Peroxidase.

(PAP)

Para a identificação de linfócitos T e B em gânglios poplíteos de camundongos normais e infectados com T. cruzi foi utilizado o método imunoenzimático proposto por Sternberger et al. (1970)

O método utiliza a enzima peroxidase complexada a um soro anti-peroxidase formando um complexo Peroxidase - Anti-Peroxidase (PAP) solúvel e estável.

Este complexo liga-se ao antígeno tissular através de dois outros anticorpos independentemente de uma ligação covalente (Sternberger, 1974)

A obtenção do complexo PAP constou de duas etapas : a imunização de coelhos com peroxidase seguida de avaliação da produção de anticorpos específicos e da complexação da peroxidase ao soro anti-peroxidase

2.4.1. Imunização de coelhos com peroxidase.

O soro anti-peroxidase foi obtido em coelhos (2) adultos através da inoculação intramuscular de 10 mg/ml de peroxidase ,livre de sais (Polysciences),em adjuvante com -pleto de Freund. A mesma dose ,sob as mesmas condições,foi inoculada após 2 semanas. Depois de 20 dias foi inoculada intravenosamente 1 mg/ml de peroxidase. Sangrias de prova foram realizadas a cada inoculação e a sangria total foirea lizada uma semana após a última inoculação.

2.4.2. Determinação da zona de equivalência e titulação do antisoro.

Anterior à fase de conjugação da peroxidase ao soro anti-peroxidase ,foi realizada a reação de Heidelberger -Kendall para a determinação da zona de equivalência entre este antígeno e o soro específico.

Foram distribuídos ,em tubos de ensaio, volumes de 1 ml de soro anti-peroxidase aos quais foram adicionados volumes idênticos de solução contendo diferentes concentrações de peroxidase,que variava entre 50 e 500 mg/ml.Estas soluções foram incubadas a temperatura de 49 C,durante 18 horas.Após a incubação ,os tubos foram centrifugados e o sobrenadante foi testado para a presença de excesso de antígeno ou anticorpo.

A concentração de peroxidase escolhida para a

conjugação do soro anti-peroxidase foi a de zona de equivalência mais próxima da zona de excesso de antígeno

O título do soro anti-peroxidase foi determinado por reação de dupla difusão utilizando a peroxidase nas concentrações de 500 e 100 ug/ml e o soro anti-peroxidase diluído de 1:2 a 1:64 (razão 1:2).

2.4.3. Preparação do complexo Peroxidase -Anti-Peroxidase

Uma solução de peroxidase 0,6%, diluída em salina fisiológica 0,15 M, foi incubada com soro de coelho anti-peroxidase, à temperatura ambiente, por 60 minutos, a fim de propiciar a reação da enzima com seu antisoro. Após incubação, esta amostra foi centrifugada a 770 g, durante 20 minutos, a 4°C e o precipitado lavado em salina por três vezes consecutivas. Esse precipitado foi ressuspensão em uma solução de peroxidase 1:500, sob fraca agitação e baixa temperatura. Esta solução foi rapidamente levada à pH 2,3 a fim de dissociar a reação antígeno - anticorpo e, na presença de excesso de peroxidase, levar à formação do complexo PAP (3 moléculas de peroxidase e 2 de anticorpo anti-peroxidase.)

Após dissociação ácida, o pH da solução foi elevado para 7,4 impedindo a denaturação das proteínas. A seguir, a solução foi precipitada por uma mistura de acetato de sódio 0,08 N e acetato de amônio 0,15 N. Após centrifugação a 37.000 g, durante 8 minutos, à temperatura de 1°C, foi adicionado ao sobrenadante, sob agitação, um volume igual de solução

saturada de sulfato de amônio a 4°C, para precipitação de imunoglobulinas livres e complexadas. Esta solução foi centrifugada a 37.000 g, durante 16 minutos, numa temperatura de 1°C. Para a separação do complexo PAP da peroxidase livre, o precipitado foi lavado com sulfato de amônio a meia saturação, a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspensão em água destilada e dialisado contra três mudanças de salina 0,15 M, contendo acetato de sódio-amônio. A solução foi centrifugada a 37.000 g, durante 16 minutos e distribuída em alíquotas de 0,1 ml, em frascos congelados em nitrogênio líquido e estocados a -20°C.

2.4.4. Determinação do título do complexo PAP.

Após a conjugação da peroxidase com o soro anti-peroxidase, o complexo PAP formado foi testado através da técnica de dupla difusão (Ouchterlony, 1958) frente ao soro de carneiro anti-IgG de coelho e através de imunoeletroforese (Grabar e Burtin, 1964), frente aos soros de coelho anti-peroxidase e de carneiro anti-IgG de coelho.

Na técnica de dupla difusão, foram empregadas a forma pura do PAP e diluições até 1:8 frente a concentrações de 100 e 500 ug/ml de soro de carneiro anti-IgG de coelho. A leitura das linhas de precipitação foi efetuada antes e depois da reação com solução de diaminobenzidina (DAB) 0,05% H_2O_2 0,01% em tampão tris-HCl 0,05 N pH 7,6.

A imunoeletroforese foi realizada em placa de

vidro de 12 X 9 cm, contendo uma camada de 3 mm de ágar, em tampão veronal 0,05 M pH 8,4, com gradiente de potencial de 6 volt/cm, durante 60 minutos.

A atividade do PAP também foi testada sobre formas epimastigota e amastigota de T. cruzi. As formas epimastigota foram obtidas de meio LIT, cultivadas a 28°C, lavadas em salina 0,15M, fixadas em formol 10%, depositadas em lâminas histológicas e incubadas com soro anti-FAd (Tamashiro et al. 1983) nas diluições de 1:60 a 1:240, soro de carneiro anti-IgG de coelho e PAP, na diluição de 1:200. Amostras de tecido cardíaco foram obtidas de camundongos Swiss-55 infectados com 10^5 formas tripomastigota de T. cruzi, mantidas em nitrogênio líquido e posteriormente processadas em micrôtom (HistoStat Microtome-American Optical). Secções de coração infectado foram aderidas sobre lâminas histológicas, rapidamente fixadas em acetona e incubadas com os mesmos anti-soros utilizados para formas epimastigotas.

2.5. Obtenção do soro de carneiro anti- IgG de coelho.

O carneiro foi inoculado intramuscularmente com IgG de coelho purificada em coluna de DEAE-celulose (gentilmente cedida pelo Profº Paulo M. Araújo, do Deptº de Microbiologia e Imunologia -UNICAMP) na concentração final de 1,5 mg/ml, em adjuvante completo de Freund. Após um mês foi repetida a inoculação, sob as mesmas condições, na concentração de 200 ug/ml. Um novo reforço foi dado, após 30 dias, com IgG

de coelho na concentração de 3 mg/ml, em adjuvante completo de Freund.

Passado um mês, foi inoculada, na região ganglionar da pata posterior do carneiro, 200 ug/ml de IgG de coelho, dissolvida em salina fisiológica 0,15 M. Decorridos 15 dias desta inoculação, foi realizada sangria parcial, separado o soro, centrifugado a 433 g, durante 10 minutos e estocado a -20° C.

Para um primeiro teste qualitativo da reativi-dade antígeno-anticorpo, foi realizado o teste de anel, com concentração de 100 e 500 ug/ml de IgG de coelho e soro de carneiro anti-IgG de coelho na forma pura.

Este soro foi testado através da técnica de dupla difusão e imunoeletroforese, frente ao soro normal de coelho. Na técnica de dupla difusão foram utilizadas diluções seriadas de soro de carneiro anti-IgG de coelho de 1:4 até 1:128 e soro de coelho nas concentrações de 100 e 500 ug/ml.

2.6. Obtenção do soro de coelho anti-linfócito T de camundongo.

O soro anti-linfócito T, utilizado para caracterização de linfócitos T, foi preparado segundo prescrições de Rodt et al. (1974).

Este soro foi obtido imunizando-se coelhos, intramuscularmente, com células de cérebro de camundongo CBA/J,

suspensas em 1 ml de salina fisiológica 0,15 M, emulsionadas em adjuvante completo de Freund. Após 43 dias da primeira dose, foram inoculados 10^8 timócitos de camundongo da linhagem CBA/J (1 mês de idade), em adjuvante completo de Freund. A esta inoculação, seguiu-se injeção do mesmo número de timócitos de CBA/J, ressuspensos em salina 0,15M, nos seguintes dias, após a primeira inoculação: 44, 45, 71, 72, 102, 104, e 107. Após este período foi realizada a sangria total do coelho.

2.6.1. Absorção do soro anti-linfócito T.

O soro anti-linfócito T foi absorvido com células do fígado, coração e rim de camundongos CBA/J normais e plasmocitomas de IgG, IgA e IgM, desenvolvidos em camundongos BALB/c. Os órgãos e plasmocitomas foram retirados dos animais, homogeneizados em macerador e lavados em PBS pH 7,3. A incubação do soro com estas células foi realizada durante 30 minutos, a 4°C.

O soro normal de coelho, utilizado como controle, foi absorvido com coração, fígado e rim de camundongos da linhagem CBA/J mas não o foi com plasmocitoma de BALB/c, pela dificuldade na obtenção destes tumores.

2.6.2. Determinação do título do antisoro.

O título do soro anti-linfócito T foi determina-

do utilizando-se teste de citólise mediado por complemento, imunofluorescência (Hudson, 1976) e imunoperoxidase (Sternberger, et al., 1970).

Na reação de citólise, os timos de camundongos das linhagens CBA/J, C57Bl/10 e Swiss-55 foram coletados, homogeneizados e a suspensão celular obtida foi ressuspensa em glicose 0,308 M. Esta solução de glicose contendo as células tímicas foi filtrada através de gaze, em pipeta Pasteur, a 4°C. Depois da filtração, a suspensão foi centrifugada duas vezes a 433 g, durante 10 minutos, a 4°C e ressuspensa em 1 ml de PBS. Estas células foram contadas em câmara de Malassez, sua viabilidade verificada através de teste de exclusão pela Nigrosina 0,2% e posteriormente ajustadas para um total de 5×10^7 células/ml.

O complemento liofilizado foi previamente dissolvido em água gelada, durante 30 minutos a 4°C com eritrócitos e baço de camundongos CBA/J de 1 mês de idade.

A reação de citólise consistiu da incubação de volumes iguais de timócitos de camundongos, de soro anti-linfócito T ou soro normal de coelho absorvido ou não (nas diluições finais seriadas de 1:12 a 1:192) e complemento (na diluição inicial de 1:5), durante 30 minutos a 37°C. O período de incubação foi interrompido em banho de gelo e a contagem de células viáveis foi realizada com Nigrosina 0,2%, em câmara de Malassez.

As reações de imunofluorescência foram realizadas sobre suspensões celulares de timo e gânglio de camundongos da linhagem C57Bl/10. Estas suspensões foram incubadas, durante 30 minutos com soro anti-linfócito T ou soro normal de coelho absorvidos, nas diluições seriadas de 1:4 a 1:16. Após lavagem em PBS, as lâminas foram incubadas, durante 30 minutos, com soro de carneiro anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína, nas diluições de 1:20 a 1:40. As lâminas foram montadas sob lamínulas, em solução contendo 9 partes de glicerina e 1 parte de tampão carbonato pH 9,2 e observadas em microscópio de fluorescência com epiluminação da Carl Zeiss.

As reações de imunoperoxidase foram realizadas sobre células do gânglio poplíteo de camundongos normais das linhagens F1 (C57Bl/10 X CBA/J), C57Bl/10 e CBA/J, utilizando-se diluições de 1:100 até 1:1000 de soro anti-linfócito T e complexo PAP 1:40 e 1:80. Como controle foi utilizado soro normal de coelho nas mesmas condições.

2.7. Obtenção do soro de coelho anti-IgG de camundongo

O soro de coelho anti-IgG de camundongos foi gentilmente cedido pela Prof^a Júlia K. Sakurada (Depto. de Microbiologia e Imunologia - UNICAMP) e utilizado na detecção de linfócitos B. Este soro foi obtido através da imunização de coelhos com IgG de camundongos, segundo recomendações de Ey et al. (1978).

2.7.1. Purificação do soro de coelho anti-IgG de camundongo.

A purificação do soro de coelho anti-IgG de camundongo foi realizada em coluna de DEAE-celulose, equilibrada à temperatura ambiente em tampão fosfato de sódio 0,01 N pH 8,0.

O soro de coelho anti-IgG de camundongo liofilizado foi ressuspenso em 10 ml de água destilada gelada e dialisado, durante dois dias, contra solução tampão fosfato de sódio 0,01 N pH 8,0. A seguir foi centrifugado a 1732 g, durante 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante aplicado numa coluna de 2,4 X 87 cm, num fluxo de 10 gotas /min. Após passagem em coluna, a amostra foi coletada e dialisada em PBS 0,013 M pH 7,4 a 4°C, por dois dias. Este soro foi estocado em alíquotas de 0,5 ml a -20°C.

2.7.2. Titulação do antisoro.

A amostra de IgG de coelho anti-IgG de camundongo, purificada em DEAE-celulose, foi testada através da técnica de dupla difusão (Ouchterlony, 1958), nas diluições de 1:2 a 1:64 frente ao soro normal de camundongo, nas concentrações de 100 e 500 ug/ml, e por imunoeletroforese.

2.8. Parasitemia das linhagens isogênicas Fl(C57Bl/10 X

CBA/J) , CBA/J e C57B1/10.

A parasitemia dos camundongos das linhagens F1 (C57B1/10 X CBA/J), CBA/J e C57B1/10, inoculados com 10^2 formas de T. cruzi, no coxim plantar, foi determinada diariamente segundo Brener (1962).

Os camundongos foram sangrados através de pequeno corte na extremidade da cauda e, após desprezar-se a primeira gota, o sangue foi coletado através de pipeta de hemoglobina calibrada para 5 μ l e colocado entre lâmina e lamínula de 22 X 22 mm. Esta preparação foi observada ao microscópio óptico, sendo contado o número de parasitas, em 20 campos, com objetiva 40. Para a obtenção do número de parasitas em 1 ml, o número obtido foi multiplicado por 3×10^4 . Os resultados foram expressos através de média aritmética. Os desvios-padrões calculados não foram expressos no gráfico porque atingiram valores muito elevados, chegando a atingir níveis superiores à própria média.

2.9. Determinação do peso dos gânglios normais e infectados.

O peso dos gânglios poplíteos normais e infectados com 10^2 formas de T. cruzi, foi obtido a cada 5 dias de infecção até o 45º dia, nas linhagens F1 (C57B1/10 X CBA/J), CBA/J e C57B1/10. A pesagem foi realizada em papel alumínio previamente pesado em balança analítica (Mettler H 34) e ex

presso em mg.

2.10. Obtenção das suspensões celulares dos gânglios poplíteos.

As suspensões celulares obtidas de gânglios poplíteos das patas dos camundongos das linhagens F1 (C57Bl/10 X CBA/J), CBA/J e C57Bl/10, inoculados com T. cruzi e coletados a cada 5 dias, foram divididas em duas amostras distintas: aquelas provenientes dos gânglios da pata inoculada com T. cruzi e aquelas suspensões correspondentes aos gânglios das patas contralaterais às inoculadas.

Os gânglios poplíteos normais, utilizados como controle, foram obtidos de 3 a 5 camundongos das três linhagens estudadas.

Estes gânglios foram lavados em Hanks', excisados com agulhas finas e as suspensões celulares obtidas, centrifugadas a 433 g, por 10 minutos. A viabilidade destas células foi verificada através da Nigrosina 0,2% e o número total destas células foi contada em câmara de Malassez. Após terem sido ajustadas para um número de 1×10^6 células/ml, foram depositadas sobre lâminas de vidro (Chagas-Inlab) a 40°C, durante uma a duas horas. O sobrenadante foi absorvido com papel filtro e as lâminas submetidas a secagem rápida a 40°C. Após secagem, foram imediatamente fixadas em metanol 100% (Merck), durante 30 minutos, a -20°C (Sassen e Platse, 1980)

2.11. Determinação do número de macrófagos.

O número de macrófagos das suspensões celulares de gânglio poplíteo das linhagens F1 (C57B1/10 X CBA/J) CBA/J e C57B1/10, normais ou infectados com 10^2 formas de T. cruzi, foi obtido através da ativação destas células com carbono coloidal (Pelikan C11/1431a).

Alíquotas de 50 ul de suspensão celular foram incubadas com 50 ul de solução de carbono coloidal durante 10 minutos, a baixa temperatura. Os macrófagos foram identificados através de seus grânulos de carbono coloidal fagocitado.

A porcentagem de macrófagos foi determinada pela contagem diferencial de linfócitos e macrófagos em câmara de Malassez. Camundongos normais das mesmas linhagens foram utilizados como controle na detecção do número de macrófagos em gânglios não estimulados pelo parasita.

2.12. Detecção citoenzimática de linfócitos T e B em camundongos inoculados com T. cruzi.

Para a detecção das populações linfocitárias em camundongos das linhagens F1 (C57B1/10 X CBA/J), CBA/J e C57B1/10, foram coletados os gânglios poplíteos destes animais, no período de 5 a 45 dias, num intervalo de 5 dias. Os gânglios poplíteos dos camundongos das linhagens CBA/J e C57B1/10 foram coletados durante a fase aguda, entre o 10º e

20ª dia de infecção.

As lâminas contendo as suspensões celulares foram incubadas com soro normal de carneiro ,soro de coelho anti-linfócito T (diluição 1:1000),soro de carneiro anti-IgG de coelho e complexo PAP,para a detecção de linfócitos T. Para a caracterização de linfócitos B,foi utilizado como soro primário o soro de coelho anti-IgG de camundongo. Como controle dos soros primários foi utilizado soro normal de coelho.

Cada incubação foi realizada durante um período de 30 minutos, a 20ª e em cada intervalo de incubação as lâminas foram lavadas em PBS ,durante 10 minutos.

A revelação da reação foi feita com diaminobenzidina 0,05% e H_2O_2 em tris-salina 0,05 N pH 7,6 por 10 minutos para todos os soros primários utilizados.No caso das lâminas incubadas com soro anti-IgG de camundongo foi realizada uma pós -fixação com tetróxido de ósmio por 5 minutos, para tornar mais evidente a reação .

A contagem do número de células marcadas pela reação de imunoperoxidase foi realizada em microscópio óptico da Carl Zeiss,sendo calculadas as porcentagens e desvios padrão destas,em relação ao número de células não marcadas. Foram utilizados para a contagem 10 campos das 6 a 8 amostras de um "pool" celular de cada um dos 2 grupos experimentais , num total médio de 500 células.

2.14. Análise estatística.

Foram realizadas através do teste t de Student.

3.0. RESULTADOS

3.1. Caracterização e especificidade dos soros.

A caracterização das populações celulares, especificamente linfócitos T e B, durante a infecção pelo T.cruzi, foi antecedida pela produção e caracterização de uma série de soros e complexo imune, cujas características são fundamentais na elucidação dos resultados posteriormente obtidos. Neste sentido, são descritas, nesta primeira secção, as características imunológicas e citoquímicas do complexo e dos soros utilizados.

3.1.1. Complexo Peroxidase-Anti-Peroxidase. (PAP)

A reatividade do soro anti-peroxidase frente ao seu antígeno específico (peroxidase) e a manutenção das características imunológicas e enzimáticas do complexo PAP foi confirmada através de técnicas de dupla difusão (Ouchterlony, 1958) e imunoeletroforese (Grabar e Burtin, 1964).

Na técnica de dupla difusão, o soro de coelho anti-peroxidase (68 mg/ml) apresentou título de 1:16 frente às concentrações de 500 e 100 ug/ml de peroxidase (Figura la) e frente ao PAP (Figura lb). As linhas de precipita -

ção apresentando coloração marrom,após incubação com DAB 0,05% e H₂O₂ 0,01% em tris-HCl 0,05 N pH 7,6 confirmaram a manutenção das características enzimáticas e imunológicas da peroxidase e do soro anti-peroxidase após o processo de conjugação. (Figuras 1a e 1b).

Em imunoeletroforese observou-se a migração da peroxidase em direção à região anódica e as linhas de precipitação ,após reação com soro anti-peroxidase ,ocorreram na região das gamaglobulinas,mais especificamente na região da classe IgG (Figura 2a).

Quando o complexo PAP foi colocado na presença do soro anti-peroxidase,observou-se que a migração deste complexo foi mais lenta quando comparada à migração da peroxidase livre,indicando que a peroxidase reativa manteve-se complexada ao soro específico. Frente a este mesmo soro foi observado um arraste proteico que pode ser considerado uma fração do PAP inativada. O complexo PAP,quando em presença do soro anti-peroxidase e soro de carneiro anti-IgG de coelho,apresentou linhas de precipitação na região de migração das gamaglobulinas ,especificamente na região de IgG (Figura 2b).

Estes resultados confirmaram a reatividade do soro anti-peroxidase antes e após a conjugação e indicaram que a imunoglobulina predominante no complexo possui características de IgG.

Os resultados obtidos na detecção de antígenos de superfície - FAd- de formas epimastigota (Figura 3) e amastigota (Figura 4),em diluições de até 1:200 do com-

FIGURA 1: a) Reação de dupla difusão (Ouchterlony) entre soro anti-peroxidase e peroxidase.

Centro: 500 e 100 ug/ml de peroxidase.

Laterais: diluições do soro anti-peroxidase.

b) Reação de dupla difusão entre soro anti-peroxidase e PAP.

Centro: PAP puro.

Laterais: diluições do soro anti-peroxidase.

FIGURA 2: Imunoeletroforese de peroxidase (Po), complexo peroxidase-anti-peroxidase (PAP), soro normal de coelho (SNCo) e soro normal de camundongo (SNCa) revelados com soro anti-peroxidase (SAPO), soro de carneiro anti-IgG de coelho (aIgCo) e soro de coelho anti-IgG de camundongo (aIgCa).

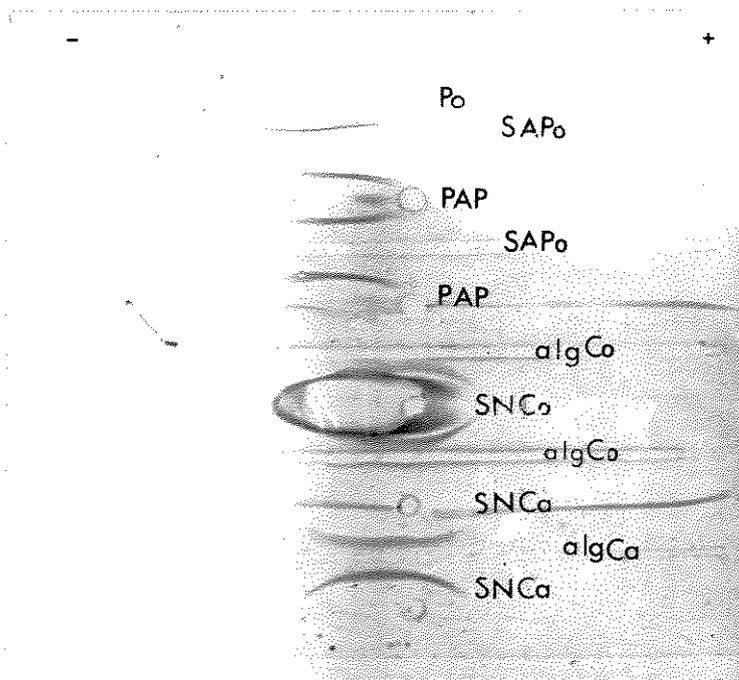




FIGURA 3

Imunoperoxidase utilizando o complexo PAP (1:200) sobre formas epimastigota de T. cruzi incubadas com soro anti-FAd (1:80) e soro de carneiro anti-IgG de coelho.



FIGURA 4

Imunoperoxidase utilizando o complexo PAP (1:200) sobre formas amastigota de T. cruzi incubadas com soro anti-FAd (1:80) e soro de carneiro anti-IgG de coelho.

plexo PAP confirmaram a reatividade e a manutenção das características enzimáticas do complexo sobre secções de tecido e suspensões celulares.

3.1.2. Soro de carneiro anti-IgG de coelho.

A reatividade do soro de carneiro anti-IgG de coelho (62 mg/ml) foi confirmada através da positividade do teste do anel e através das técnicas de dupla difusão e imuno-elektroforese frente à IgG de coelho e soro normal de coelho.

Na técnica de dupla difusão, o título deste soro foi de 1:128 e 1:32 nas concentrações de 100 e 500 ug/ml de IgG de coelho, respectivamente. (Figura 5a).

Em imuno-elektroforese, o soro de carneiro anti-IgG de coelho mostrou-se poliespecífico, frente ao soro normal de coelho, apresentando linhas de precipitação acentuadas na região de migração das imunoglobulinas do tipo IgG e linha muito tênue na região de IgA. No entanto, estes resultados demonstraram que apesar de ser reativo com estas duas classes de imunoglobulinas, este soro reage mais intensamente com a imunoglobulina do tipo IgG, sendo predominantemente um soro anti-IgG de coelho (Figura 2c).

3.1.3. Soro de coelho anti-linfócito T de camundongo (SAT)

A especificidade do soro de coelho anti-linfócito

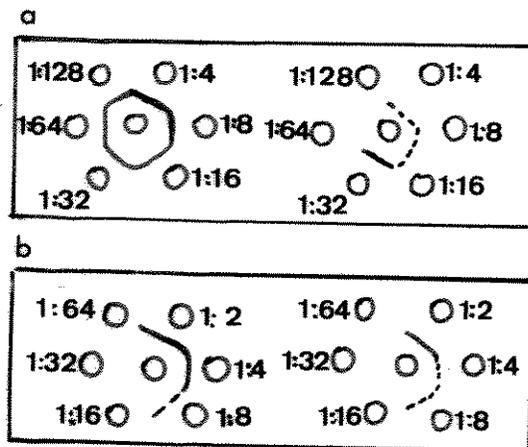


FIGURA 5

a) Reação de dupla difusão entre soro de carneiro anti -
IgG de coelho e IgG de coelho.

Centro: 500 e 100 ug/ml de IgG de coelho.

Laterais: diluições do soro de carneiro anti-IgG de
coelho .

b) Reação de dupla difusão entre soro de coelho anti -
IgG de camundongo e soro normal de camundongo.

Centro: 500 e 100 ug/ml de soro normal de camundongo.

Laterais: diluições do soro de coelho anti-IgG de ca -
mundongo.

T de camundongo foi confirmada através de teste de citólise mediada por complemento, imunofluorescência indireta e imunoperoxidase (PAP).

As reações de citólise, efetuadas antes da absorção do soro, demonstraram que os resultados dependem da linhagem de camundongo utilizada e da concentração do soro normal ou do soro anti-linfócito T (Figura 6a).

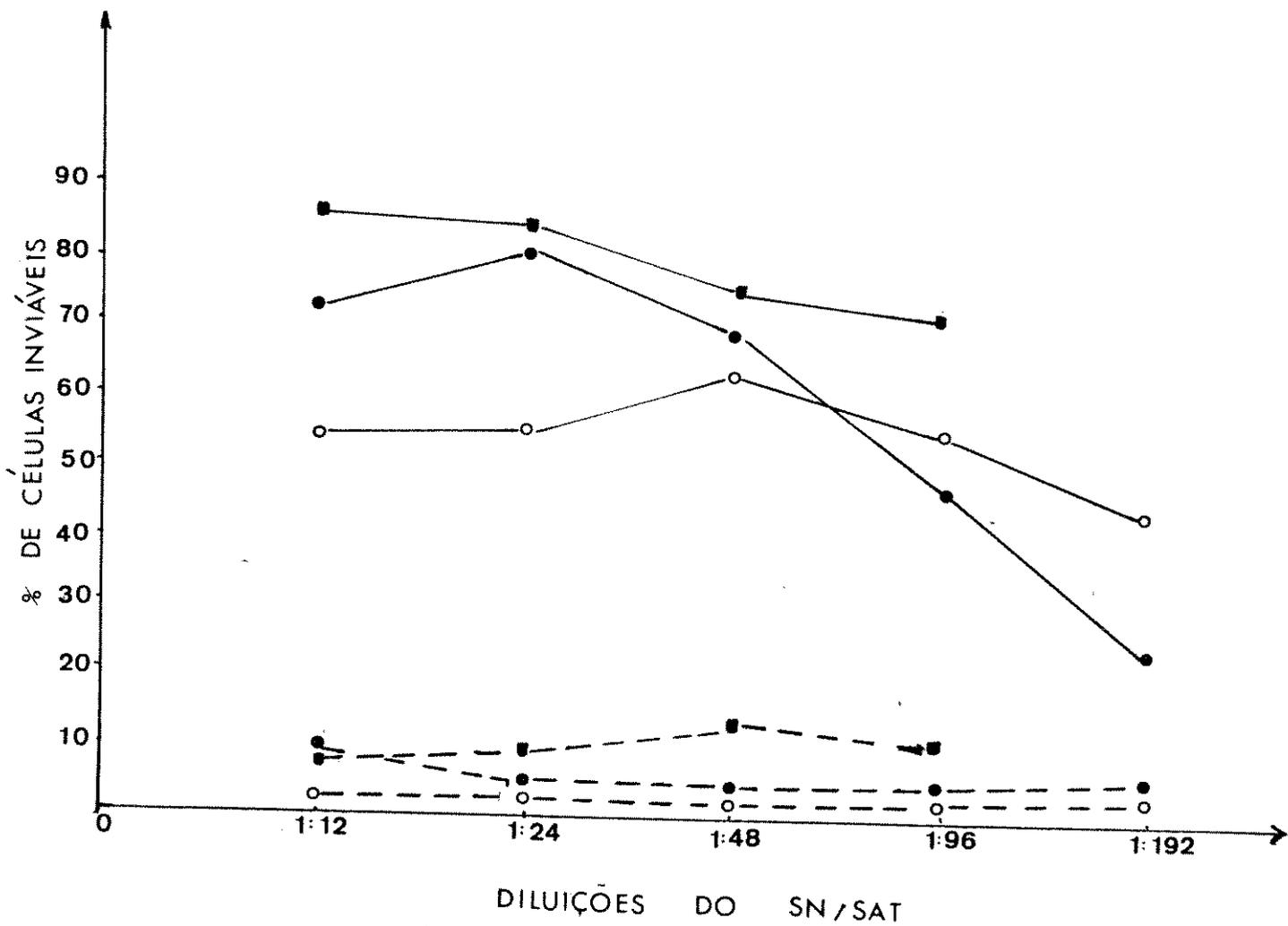
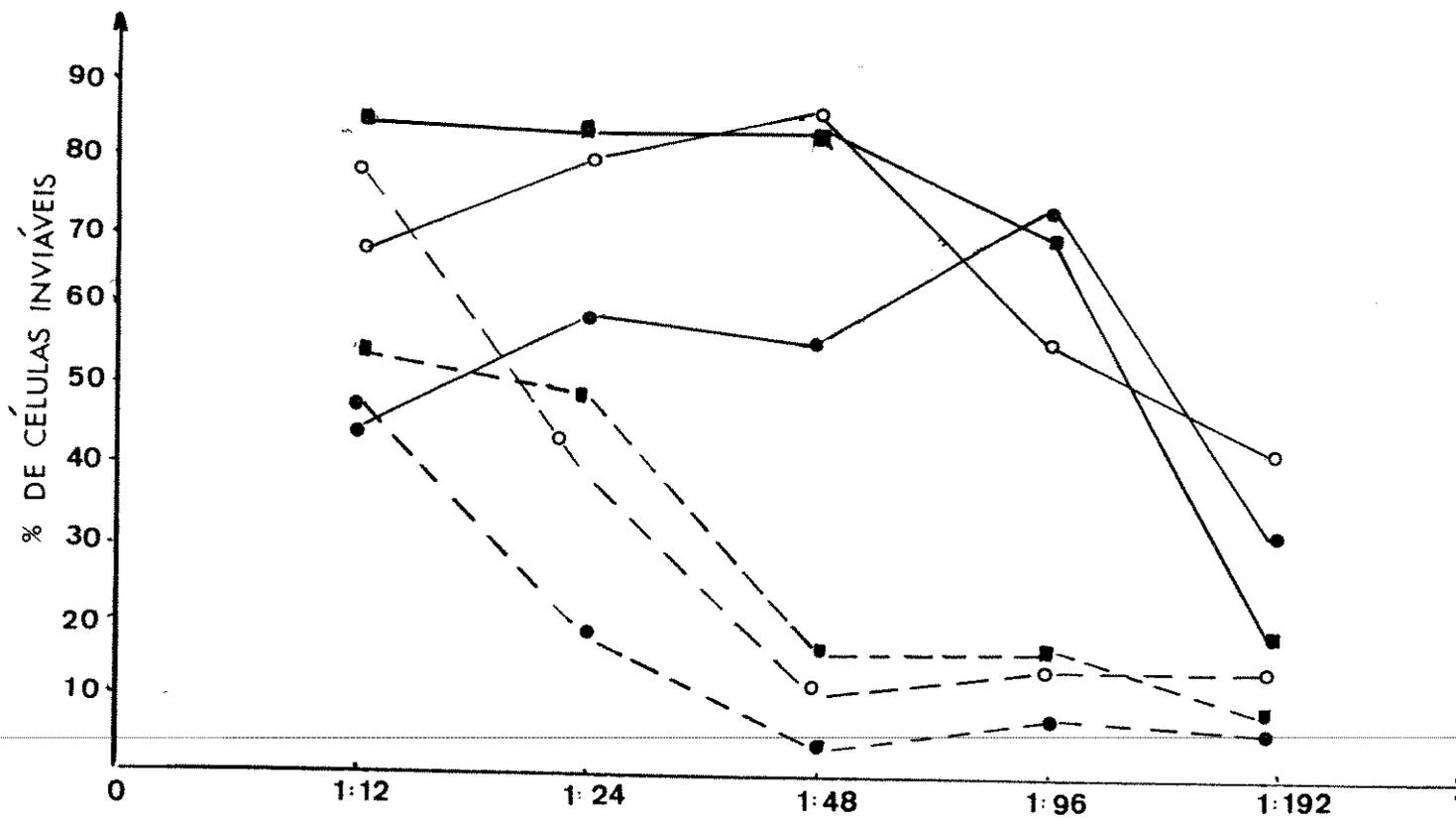
Frente às células tímicas das três linhagens de camundongos utilizadas -CBA/J, C57Bl/10 e Swiss-55 - tanto o soro anti-linfócito T quanto o soro normal, na diluição de 1:12, ocasionou altos índices de lise celular (Figura 6a). A partir da diluição 1:24, a ação lítica do soro normal sobre as células tímicas declinou, com um concomitante aumento da ação lítica do soro anti-linfócito T sobre estas células. Nos camundongos da linhagem CBA/J, foi atingido um índice de lise celular máximo de 85%, na diluição de 1:48, enquanto que na linhagem C57Bl/10, o índice de lise máxima foi menor - 75% - na diluição de 1:96. Nos camundongos Swiss-55, os maiores índices de lise foram obtidos entre as diluições de 1:12 e 1:48, com 85 a 80% de inviabilidade celular. A partir deste índice máximo, houve um declínio da especificidade do soro anti-linfócito T sobre as células das três linhagens, atingindo níveis próximos ao do soro normal. (Figura 6a)

Após absorção foi observado, nas três linhagens, um aumento evidente da especificidade do soro anti-linfócito T. Isto foi evidenciado através da porcentagem de lise frente ao soro normal, que variou em média, de 5 a 10%, tanto

FIGURA 6: Citólise mediada por complemento.

a) Porcentual de timócitos inviáveis frente à diluições do soro de coelho anti-linfócito T não-absorvido (___) ou soro normal de coelho não-absorvido (___) , na presença de complemento , em camundongos das linhagens Swiss-55 (■—■) , C57Bl/10 (●—●) e CBA/J (○—○).

b) Porcentual de timócitos inviáveis frente à diluições do soro de coelho anti-linfócito T absorvido (___) ou soro normal de coelho absorvido (___) , na presença de complemento, nas mesmas linhagens.



em baixas quanto em altas diluições (Figura 6b). Frente ao soro anti-linfócito T, na linhagem CBA/J, a citólise máxima (62,5%) ocorreu na diluição de 1:48, enquanto que em camundongos C57Bl/10 esta ocorreu na diluição 1:24, com uma taxa de citólise igual a 80%. (Figura 6b). Nos camundongos Swiss-55, foi atingida a maior taxa de citólise - 85% - na diluição de 1:12.

Comparando-se os resultados obtidos, antes e depois da absorção, foi verificada a retirada dos antígenos de reação inespecífica, tornando este soro específico para o antígeno de linfócito T - Thy 1.2.

Em reações de imunofluorescência sobre suspensões celulares, foram obtidos resultados positivos com soro anti-linfócito T tanto em linfócitos do gânglio poplíteo como sobre células tímicas. O título do soro anti-linfócito T para células tímicas foi de 1:16 enquanto que sobre células do gânglio poplíteo foi de 1:8, utilizando soro de carneiro anti-IgG de coelho marcado com fluoresceína, na diluição 1:20. Os controles utilizando soro normal e PBS apresentaram resultados negativos.

Em reações de imunoperoxidase (PAP) sobre células do gânglio poplíteo de camundongo Fl (C57Bl/10 X CBA/J), CBA/J e C57Bl/10 normais, o título do soro anti-linfócito T foi de 1:1000 e do complexo PAP 1:80.

3.1.4. Soro de coelho anti-IgG de camundongo.

A reatividade do soro de coelho anti-IgG de ca -

mundongo (4 mg/ml) foi confirmada através das técnicas de dupla difusão, imunoeletroforese e imunoperoxidase.

Na técnica de dupla difusão foi obtido um título de 1:8 frente ao soro normal de camundongo, nas concentrações de 100 e 500 ug/ml. (Figura 5b)

Em imunoeletroforese, o soro de coelho anti-IgG de camundongo, frente ao soro normal de camundongo, apresentou linhas de precipitação na região de migração de imunoglobulina do tipo IgG. Estes resultados demonstraram que este soro reage especificamente com imunoglobulina do tipo IgG (Figura 2d), porém como o anticorpo foi obtido pelo inóculo de imunoglobulina íntegra, naturalmente ele também pode reconhecer cadeias leves de outras classes de imunoglobulinas.

Em reação de imunoperoxidase (PAP) sobre suspensões celulares, de gânglios poplíteos de camundongos Fl (C57Bl/10 X CBA/J), CBA/J e C57Bl/10 normais, o título deste soro foi de 1:800 e do complexo PAP 1:80.

3.2. Resposta imune de camundongos Fl (C57Bl/10 XCBA/J), CBA/J e C57Bl/10 infectados com T. cruzi.

3.2.1. Infecção dos camundongos isogênicos das três linhagens.

A via de inoculação é fator determinante do cur

so de uma infecção, sendo que a grande maioria dos estudos de níveis parasitêmicos, na infecção pelo T. cruzi utilizam a via intraperitoneal. Como no modelo experimental utilizado, a via de inoculação é a subcutânea, através do coxim plantar, foram realizadas parasitemias diárias após inoculação de 10^2 formas de T. cruzi, nas três linhagens estudadas.

Os camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J) e C57Bl/10, que nas condições utilizadas são considerados resistentes à infecção, apresentaram, em média, o nível mais elevado de parasitas no sangue, no 12º dia de infecção. Neste dia, os camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J) apresentaram um número máximo de $5,3 \times 10^5$ parasitas/ml enquanto que os da linhagem C57Bl/10 atingiram $7,8 \times 10^5$ parasitas/ml. (Figura 7)

Os camundongos da linhagem CBA/J, considerados susceptíveis nas mesmas condições, apresentaram um nível máximo de parasitas no 13º dia, atingindo níveis mais elevados que as outras linhagens - $1,4 \times 10^6$ parasitas/ml (Figura 7).

O índice de mortalidade destes animais até o 20º dia de infecção foi de 86,6% para os CBA/J, 6,6% para os camundongos C57Bl/10 e 0% para os F1 (C57Bl/10 X CBA/J). (Tabela 1)

3.2.2. Peso dos gânglios poplíteos.

No decorrer da infecção pelo T. cruzi, nos camun-

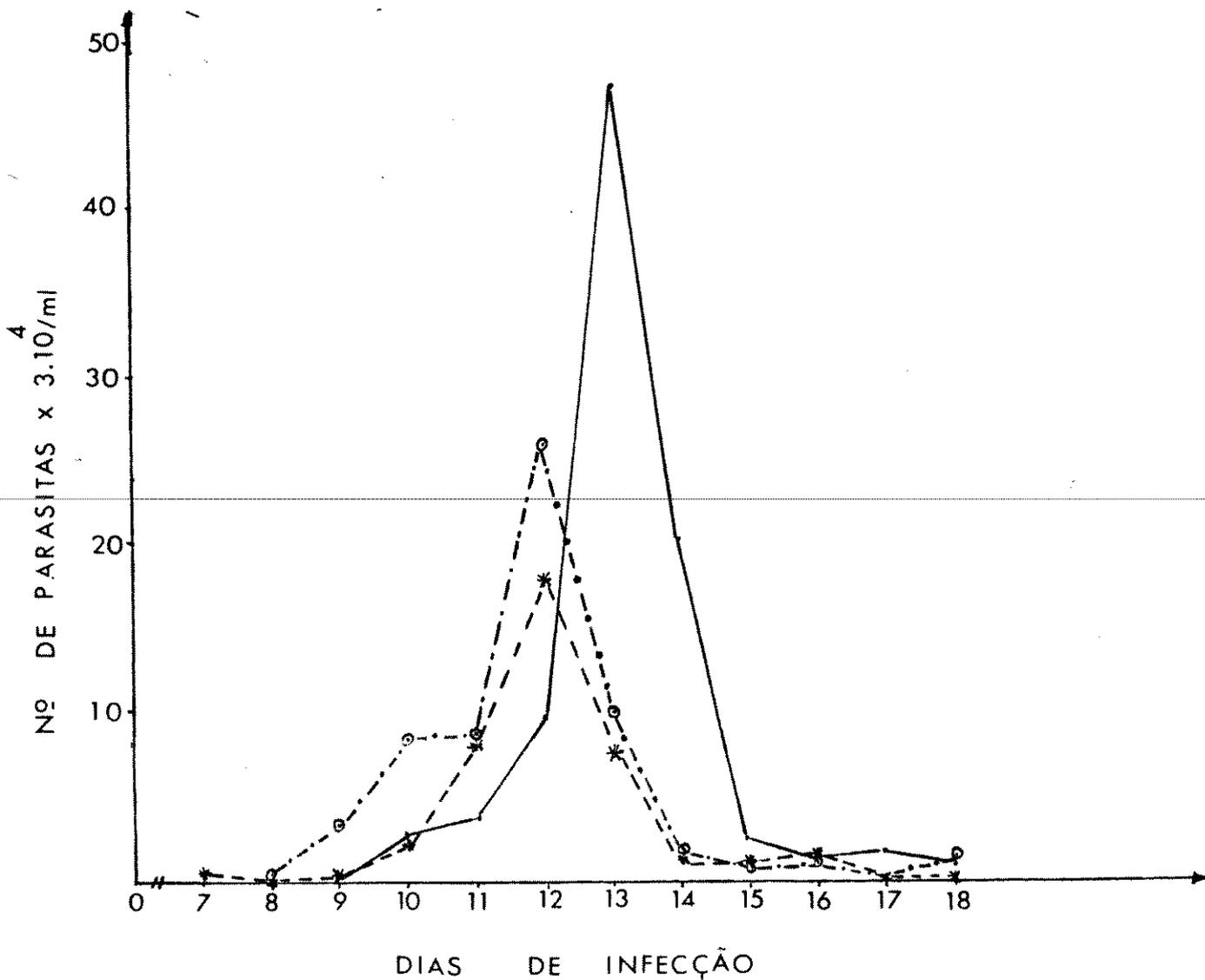


FIGURA 7: Curso da parasitemia em camundongos das linhagens CBA/J (____), C57Bl/10 (o____o) e F1(C57Bl/10 X CBA/J) (*____*) inoculados com 10^2 formas de T. cruzi Cepa Y, no coxim plantar. Cada ponto representa a média aritmética do número de parasitas $\times 3.10^4$ /ml em grupos de 5 - 10 animais.

TABELA 1

Mortalidade de linhagens isogênicas de camundongos infectados com T. cruzi . (§)

LINHAGENS	MORTALIDADE
F1 (C57B1/10 X CBA/J)	0/15 (E) - 0%
CBA/J	13/15 - 86,6%
C57B1/10	1/15 - 6,6%

(§) - Camundongos infectados por via subcutânea com 10^2 formas de tripomastigota.

(E) - Número de animais mortos pelo número de animais infectados.

dongos das três linhagens, foram observadas alterações tanto no peso como no aspecto anatômico dos gânglios poplíteos. As alterações de peso foram acompanhadas tanto nos gânglios da pata na qual foi inoculado o parasita como no gânglio contralateral.

Linhagem Fl (C57B1/10 X CBA/J).

Nesta linhagem, até o 5º dia de infecção, tanto o gânglio da pata inoculada quanto o seu contralateral, apresentaram um enfartamento semelhante e concomitante aumento de cerca de três vezes o seu peso médio normal.

Após o 5º dia de infecção, ocorreu uma modificação nas alterações apresentadas pelos dois gânglios. No gânglio da pata inoculada com o parasita ocorreu, no 10º dia, um aumento de cerca de dez vezes o seu peso normal, havendo um pico máximo no 20º dia, quando aumentou cerca de quatorze vezes. A partir do 20º dia, houve um declínio no peso deste gânglio, não chegando, no entanto, ao seu peso normal até o 45º dia de infecção. No gânglio da pata contralateral, a maior alteração do peso também ocorreu no 20º dia, quando foi atingido cerca de 5 vezes o seu peso normal. No entanto, em todos os outros dias observados, o peso médio deste gânglio manteve-se praticamente estável com o mesmo peso adquirido no 5º dia. (Tabela 2 e Figura 8a, b)

TABELA 2

Peso médio dos gânglios poplíteos dos camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J).

DIAS	I+		Cl+	
	PESO	R	PESO	R
Normal	0,9 ± 0,3		0,9 ± 0,3	
5	2,6 ± 1,6	2,9	2,4 ± 1,4	2,7
10	8,8 ± 3,8	9,8	2,7 ± 0,3	3,0
15	6,5 ± 1,5	7,2	2,4 ± 0,6	2,7
20	12,5 ± 5,1	13,9	4,5 ± 1,6	5,0
25	6,7 ± 2,2	7,4	3,0 ± 0,7	3,3
30	3,8 ± 0,6	4,2	3,0 ± 1,0	3,3
35	3,7 ± 0,4	4,1	3,1 ± 2,3	3,4
40	2,3 ± 1,1	2,6	1,8 ± 0,6	2,0
45	3,0 ± 1,6	3,3	2,4 ± 0,1	2,7

+ - peso médio de 3 a 5 gânglios expressos em mg ± desvio padrão /Gânglio.

I - peso do gânglio da pata inoculada com 10^2 formas de T. cruzi.

Cl - peso do gânglio da pata contralateral ã inoculada.

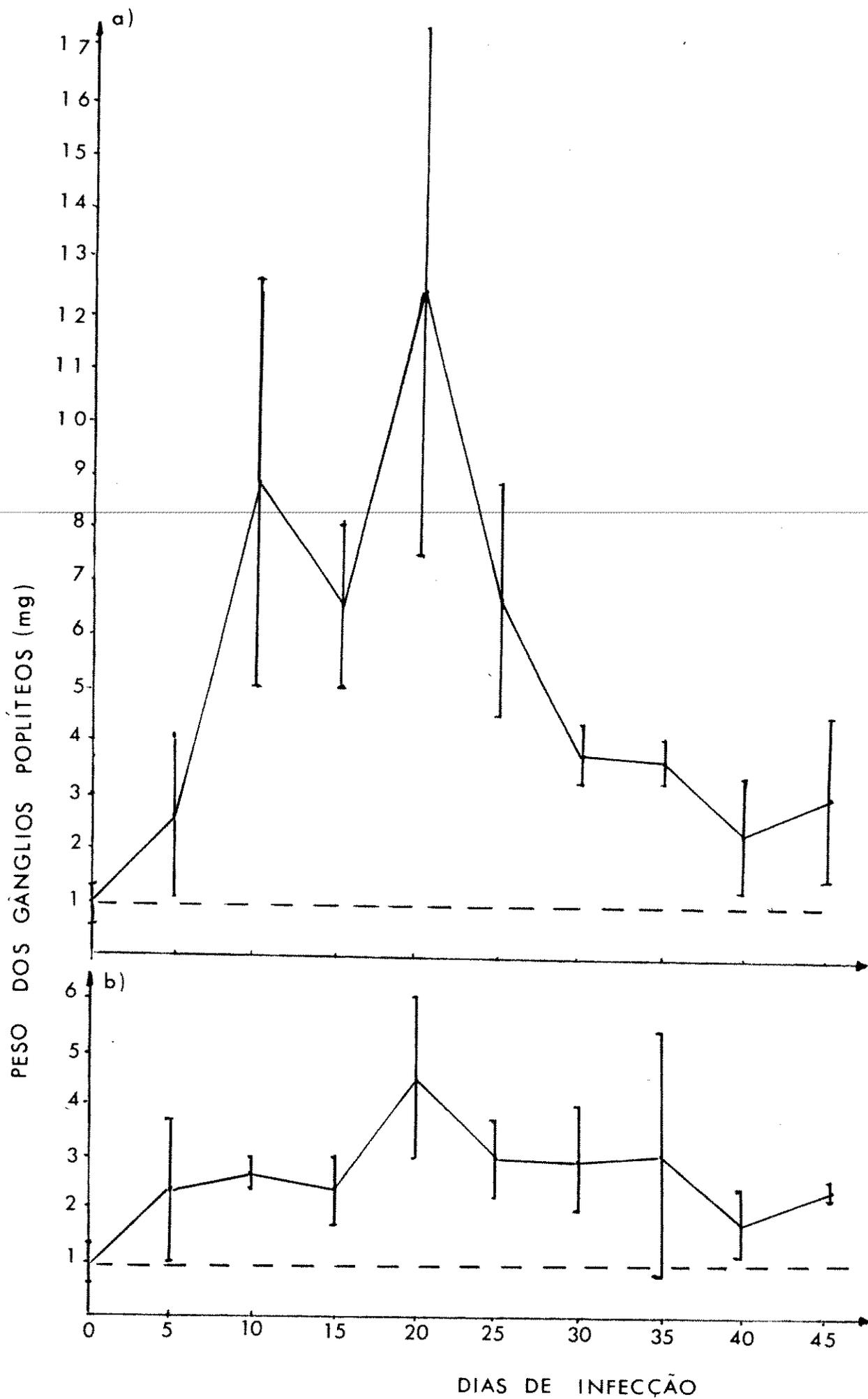
R - razão entre o peso dos gânglios da pata inoculada ou da pata contralateral e o peso dos gânglios normais.

FIGURA 8: EVOLUÇÃO DO PESO DE GÂNGLIOS POPLÍTEOS EM CA
MUNDONGOS DA LINHAGEM F1 (C57B1/10 X CBA/J)
APÓS INFECÇÃO s.c. COM 10^2 FORMAS DE T.cruzi.

a) Gânglio poplíteo da pata inoculada.

b) Gânglio poplíteo da pata contralateral.

Cada ponto representa a média aritmética \pm
desvio-padrão de 6 gânglios. As linhas ho-
rizontais representam a média obtida em ca -
mundongos normais utilizados como controle.



Linhagem CBA/J.

Os gânglios de camundongos normais desta linhagem apresentaram um peso 1,7 vezes maior que os dos camundongos Fl (C57Bl/10 X CBA/J) normais. (Tabela 2 e 3) Após a infecção, foram observadas semelhanças no padrão de alterações entre estas duas linhagens. (Figuras 8 e 9)

No 5º dia de infecção, o gânglio da pata inoculada com o parasita sofreu uma triplicação do seu peso normal, enquanto que o contralateral duplicou o seu peso, em termos médios. A partir do 5º dia de infecção, o gânglio da pata inoculada apresentou as maiores alterações observadas, atingindo um pico máximo no 15º dia, quando aumentou sete vezes em relação ao seu peso normal. A partir deste período, o gânglio sofreu um declínio em seu peso, atingindo níveis próximos ao normal, por volta de 35º dia de infecção. (Tabela 3 e Figura 9a)

O gânglio da pata contralateral, assim como o observado nos camundongos da linhagem Fl (C57Bl/10 X CBA/J), não sofreu alterações significativas em seu peso, tendo seu pico máximo no 15º dia, com um aumento de 3,2 vezes em relação ao seu peso normal. Após este período, observou-se um declínio no peso destes gânglios chegando a atingir níveis próximos ao normal, nos animais que atingiram esta fase da infecção (Tabela 3 e Figura 9b).

TABELA 3

Peso médio dos gânglios poplíteos dos camundongos da linhagem CBA/J.

DIAS	I+		Cl+	
	PESO	R	PESO	R
Normal	1,5 ± 0,6		1,5 ± 0,6	
5	4,1 ± 0,8	2,7	2,7 ± 0,6	1,8
10	6,1 ± 1,9	4,1	3,0 ± 1,1	2,0
15	10,7 ± 4,9	7,1	4,8 ± 1,4	3,2
20	6,8 ± 2,0	4,5	2,4 ± 0,3	1,6
25	7,6 ± 2,9	5,1	1,5 ± 0,6	1,0
30	3,6 ± 0,2	2,4	1,4 ± 0,1	0,9
35	2,7 ± 1,9	1,8	1,2 ± 1,4	0,8
40	2,4 ± 0,9	1,6	0,9 ± 0,4	0,6
45	2,4 ± 1,4	1,6	1,4 ± 0,3	0,9

+ - peso médio de 3 a 5 gânglios expressos em mg ± desvio - padrão /Gânglio.

I - peso do gânglio poplíteo da pata inoculada com 10^2 formas de T. cruzi.

Cl - peso do gânglio da pata contralateral ã inoculada.

R - razão entre o peso dos gânglios da pata inoculada ou da pata contralateral e o peso dos gânglios normais.

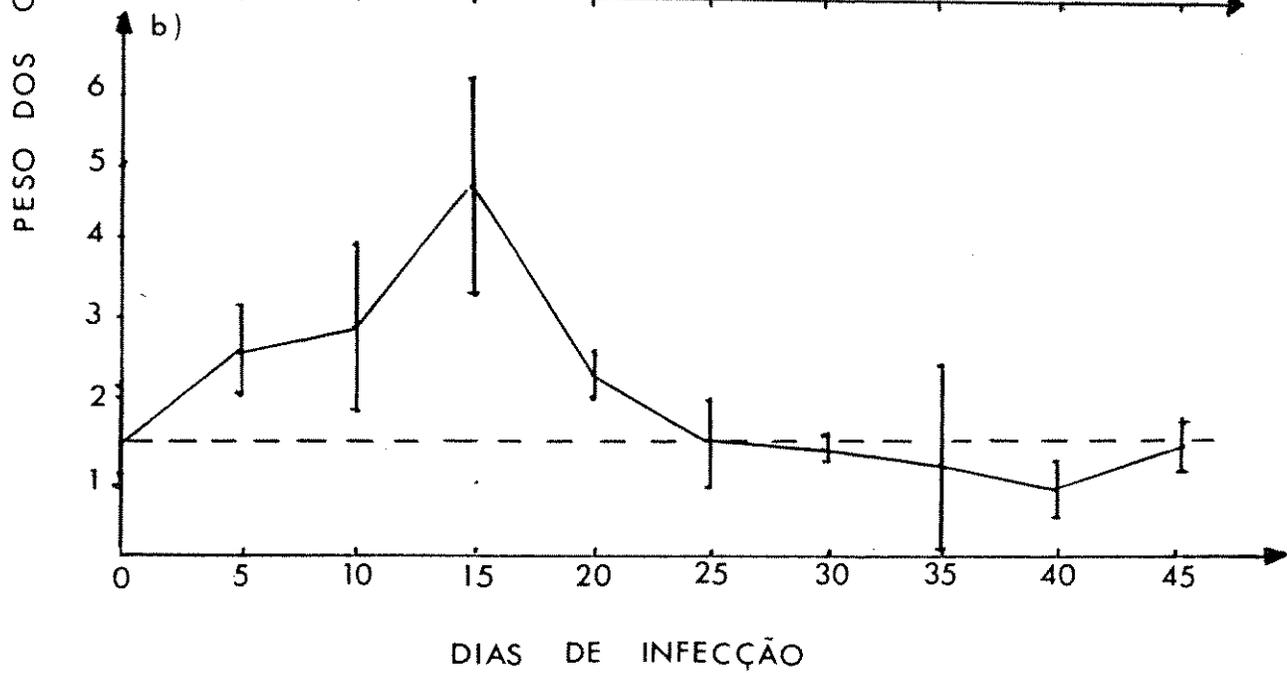
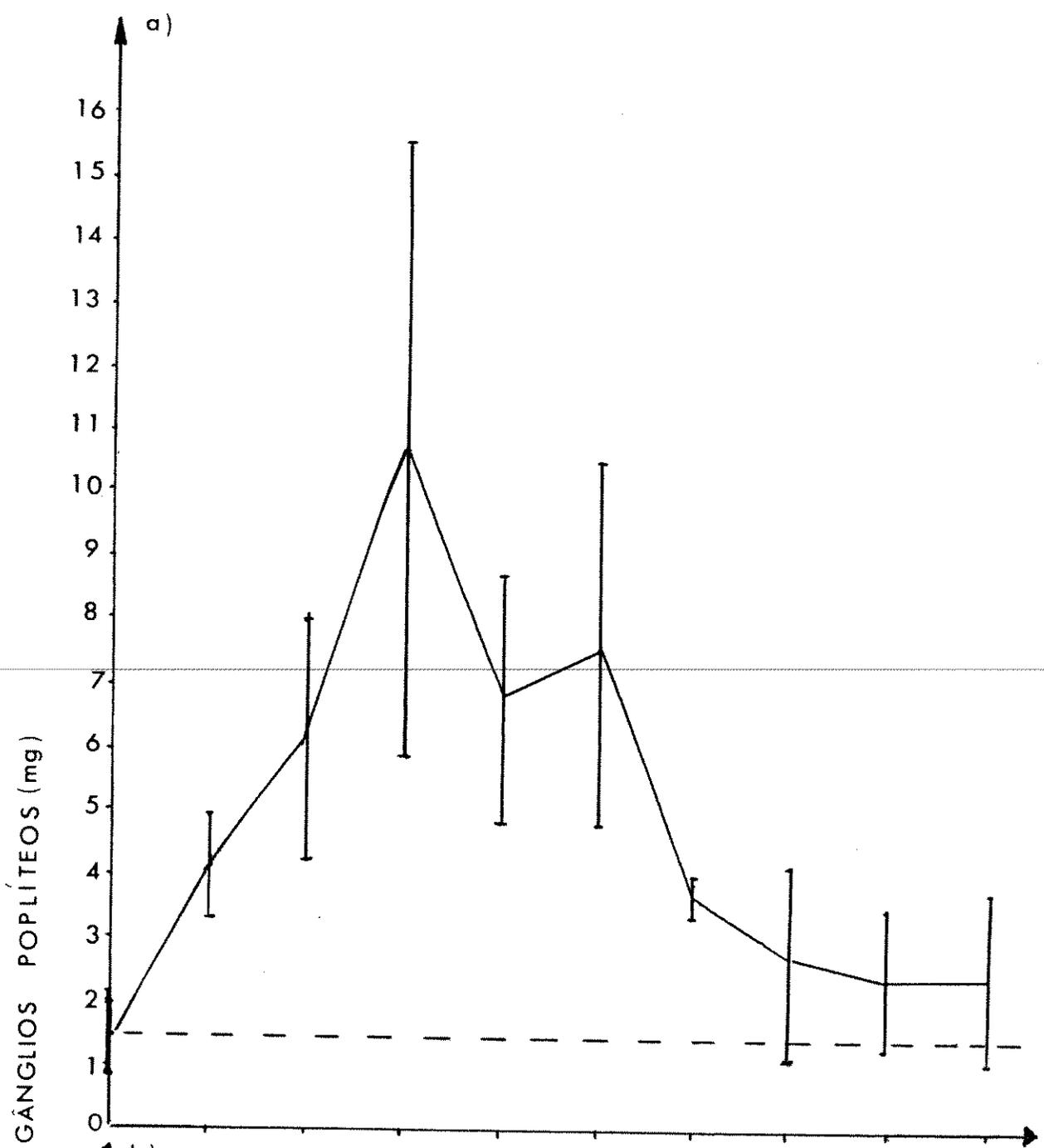
FIGURA 9 : EVOLUÇÃO DO PESO DE GÂNGLIOS POPLÍTEOS EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM CBA/J APÓS INFECÇÃO S.C. COM 10^2 FORMAS DE T. cruzi.

a) Gânglio poplíteo da pata inoculada.

b) Gânglio poplíteo da pata contralateral.

Cada ponto representa a média aritmética + desvio-padrão de 6 gânglios.

As linhas horizontais representam a média obtida em camundongos normais utilizados como controle.



Linhagem C57B1/10

Esta linhagem de camundongo apresentou o peso dos gânglios poplíteos normais semelhante ao dos camundongos da linhagem CBA/J ,sendo 1,6 maior que o apresentado pelos camundongos F1 (C57B1/10 X CBA/J). (Tabela 2 e 4 e Figuras 8 e 10) Apesar de apresentarem características semelhantes quanto ao peso inicial,as alterações observadas nestes gânglios,após infecção,foram distintas daquelas encontradas nos camundongos das duas outras linhagens.

No 5º dia de infecção,foi observado um aumento de 1,5 e 1,1 vezes do peso do gânglio da pata inoculada e seu contralateral,respectivamente. Entre o 15º e o 25º dia, o gânglio da pata inoculada sofreu um aumento,em média,de 4 vezes o seu peso normal,não havendo um pico máximo bem definido como o observado nas linhagens F1(C57B1/10 X CBA/J) e CBA/J . A partir do 25º dia,o peso deste gânglio declinou não atingindo níveis próximos ao normal até o 45º dia. (Tabela 4 e Figura 10a).

O gânglio da pata contralateral,durante todo o período observado,não sofreu alterações intensas em seu peso ,chegando ao peso máximo entre o 20º e 25º dia de infecção,quando atingiu o dobro de seu peso normal (Tabela 4 e Figura 10b).

TABELA 4

Peso médio dos gânglios poplíteos dos camundongos da linhagem C57B1/10 .

DIAS	I+		Cl+	
	PESO	R	PESO	R
Normal	1,4 ± 0,6		1,4 ± 0,6	
5	2,1 ± 0,9	1,5	1,6 ± 0,5	1,1
10	3,8 ± 1,2	2,7	2,4 ± 0,9	1,7
15	5,8 ± 2,2	4,1	1,9 ± 0,9	1,4
20	6,2 ± 2,0	4,4	2,7 ± 0,8	1,9
25	4,9 ± 2,0	3,5	3,0 ± 0,8	2,1
30	2,8 ± 0,8	2,0	1,8 ± 0,9	1,3
35	2,7 ± 0,7	1,9	1,5 ± 0,9	1,1
40	3,9 ± 1,1	2,8	2,3 ± 0,4	1,6
45	2,7 ± 0,3	1,9	1,2 ± 0,5	0,9

+ - peso médio de 3 a 5 gânglios ,expresso em mg ± desvio-padrão/Gânglio.

I - peso do gânglio da pata inoculada com 10^2 formas de T. cruzi.

Cl - peso do gânglio da pata contralateral ã inoculada.

R - razão entre o peso dos gânglios da pata inoculada ou contralateral e o peso dos gânglios normais.

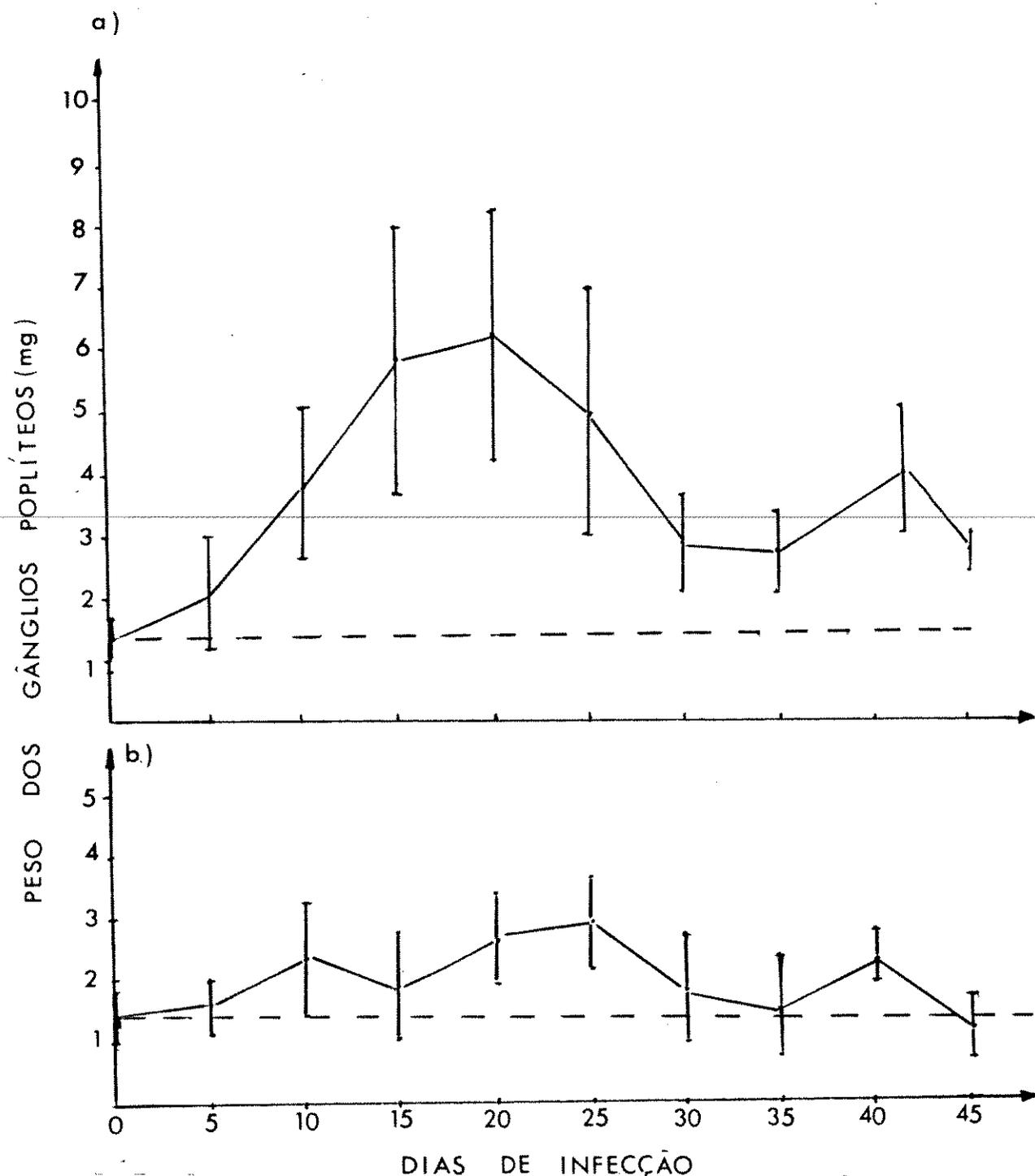


FIGURA 10 : EVOLUÇÃO DO PESO DE GÂNGLIOS POPLÍTEOS EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57B1/10 APÓS INFECÇÃO s.c. COM 10 FORMAS DE T. cruzi. a) Gânglio poplíteo da pata inoculada b) Gânglio poplíteo da pata contralateral. Cada ponto representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 6 gânglios. As linhas horizontais representam a média obtida em camundongos normais utilizados como controle.

3.2.3. Número de células dos gânglios poplíteos.

Concomitante às alterações de peso dos gânglios poplíteos, foram observadas modificações no número total de células destes órgãos, à medida que a infecção evoluía.

Durante todo este período de infecção não foi observada, em nenhuma das linhagens, a presença de parasitas na forma tripomastigota ou amastigota, tanto em suspensão como dentro das células macrofágicas.

Linhagem F1 (C57B1/10 X CBA/J).

Nos primeiros 5 dias de infecção, a celularização do órgão, tanto no gânglio da pata inoculada como no contralateral, apresentou um mesmo padrão de alteração, com um aumento de 2 e 1,5 vezes, respectivamente. (Tabela 5 e Figura 11 c).

No período de 5 a 15 dias de infecção, foi observada uma dicotomia na resposta linfoproliferativa dos dois tipos de gânglios analisados. Enquanto que, neste período, o gânglio da pata inoculada aumentou cerca de 6,5 vezes o seu número inicial de células (Tabela 5 e Figura 11c), o gânglio contralateral sofreu ligeira elevação em relação ao controle. (Tabela 5 e Figura 11c)

TABELA 5

Número total de células dos gânglios poplíteos dos camundongos da linhagem Fl (C57Bl/10 X CBA/J).

DIAS	I+		Cl+	
	NÚMERO	R	NÚMERO	R
Normal	1,5 ± 0,2		1,5 ± 0,2	
5	2,9 ± 1,3	1,9	2,2 ± 1,4	1,5
10	9,8 ± 3,9	6,5	2,7 ± 1,2	1,7
15	9,5 ± 2,0	6,3	2,9 ± 0,8	1,9
20	6,9 ± 2,4	4,6	2,5 ± 0,8	1,7
25	5,4 ± 3,1	3,6	2,2 ± 1,1	1,5
30	5,0 ± 0,6	3,3	2,8 ± 0,9	1,9
35	4,3 ± 0,7	2,9	3,1 ± 1,3	2,1
40	3,7 ± 1,7	2,4	3,2 ± 1,8	2,1
45	4,6 ± 1,6	3,0	4,2 ± 1,6	2,8

+ - número de células de 3 a 5 gânglios poplíteos ,ex - presso em média ± desvio-padrão /Gânglio X 10⁶ cêls/ml.

I- número de células do gânglio da pata inoculada com 10² formas de T. cruzi.

Cl- número de células do gânglio da pata contralateral ã inoculada.

R - razão entre o número de células apõs e antes da infecção.

Após este pico de proliferação celular, o gânglio da pata inoculada sofreu um declínio no número de suas células até o 40º dia. Concomitante a este declínio foi observada uma tendência à elevação no número de células no gânglio contralateral, chegando a atingir níveis próximos ao número observado no gânglio da pata inoculada. A partir do 40º dia, esta tendência de elevação no número de células foi observada em ambos os gânglios, que apresentaram níveis semelhantes de celularização.

Linhagem CBA/J.

Das três linhagens isogênicas analisadas, os gânglios da pata inoculada dos camundongos da linhagem CBA/J foram os que apresentaram as maiores alterações médias linfoproliferativas, sendo observado um padrão diferente daqueles apresentados pelas duas outras linhagens.

Nos cinco primeiros dias de infecção, foi observada uma maior diferença entre os níveis de proliferação do gânglio da pata inoculada e do gânglio contralateral, em relação às duas outras linhagens estudadas. Neste período da infecção, o gânglio da pata inoculada aumentou cerca de quatro vezes o seu número inicial de células (Tabela 6 e Figura 11a) enquanto que o contralateral aumentou 2,5 vezes (Tabela 6 e Figura 11a).

No gânglio da pata inoculada, intensa atividade

TABELA 6

Número total de células dos gânglios poplíteos dos camundongos da linhagem CBA/J.

DIAS	I+		CL+	
	NÚMERO	R	NÚMERO	R
Normal	1,1 ± 0,6		1,1 ± 0,6	
5	4,5 ± 1,1	4,1	2,8 ± 1,4	2,5
10	9,1 ± 1,5	8,3	2,9 ± 1,7	2,6
15	13,4 ± 1,5	12,2	3,0 ± 1,1	2,7
20	5,4 ± 0,9	4,9	2,3 ± 1,4	2,1
25	4,7 ± 2,5	4,3	2,0 ± 1,4	1,8
30	2,8 ± 0,0	2,6	2,2 ± 0,0	2,0
35	3,3 ± 0,0	3,0	1,3 ± 0,0	1,1
40	2,2 ± 0,0	2,0	0,9 ± 0,0	0,8
45	2,1 ± 0,0	1,9	0,9 ± 0,0	0,8

+ - Número de células de 3 a 5 gânglios poplíteos, expresso em média aritmética ± desvio-padrão/Gânglio x 10⁶ células/ml.

I - Número de células do gânglio da pata inoculada com 10² formas de T. cruzi.

Cl - Número de células do gânglio da pata contralateral à inoculada.

R - razão entre o número de células após e antes da infecção.

de repopulação do órgão foi observada, atingindo níveis máximos no 15º dia de infecção, quando o número de células chegou a doze vezes o número inicial. Em contrapartida, o gânglio da pata contralateral manteve-se com seu número de células estável com cerca de 2,5 vezes o seu número normal, até o 20º dia de infecção.

A partir do 20º dia, os gânglios sofreram declínio no número de suas células, sendo este mais evidente no gânglio da pata inoculada. Nos animais sobreviventes, após este período, foi observado um declínio no número de células que atingiu níveis próximos ao normal.

Linhagem C57Bl/10.

O processo de recrutamento das células para os gânglios de camundongos da linhagem C57Bl/10 foi semelhante ao apresentado pelos camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J).

As primeiras alterações no número de células que povoam os gânglios, tanto no gânglio da pata inoculada como no seu contralateral, foram observadas a partir do 5º dia de infecção, com um aumento de 2,8 e 2,1 vezes, respectivamente. (Tabela 7 e Figura 11b)

O gânglio da pata inoculada apresentou seu pico máximo entre o 10º e 15º dia, aumentando cerca de oito vezes o seu número de células normais. A partir deste período, hou-

TABELA 7

Número total de células dos gânglios poplíteos dos camundongos da linhagem C57Bl/10.

DIAS	I+		Cl+	
	NÚMERO	R	NÚMERO	R
Normal	1,6 ± 0,02		1,6 ± 0,02	
5	3,1 ± 0,8	2,8	2,3 ± 0,04	2,1
10	8,8 ± 3,7	8,0	2,1 ± 0,5	1,9
15	9,2 ± 3,4	8,4	2,1 ± 0,7	1,9
20	6,4 ± 1,1	5,8	2,3 ± 1,3	2,1
25	5,2 ± 2,2	4,7	2,6 ± 0,8	2,4
30	2,4 ± 1,1	2,1	1,5 ± 0,05	0,9
35	3,2 ± 0,05	2,9	2,3 ± 1,3	1,3
40	4,4 ± 0,05	4,0	2,4 ± 0,0	2,2
45	2,0 ± 0,0	1,8	1,5 ± 0,0	1,3

+ - Número de células de 3 a 5 gânglios poplíteos ,expressos em média ± desvio padrão /Gânglio X 10⁶ céls /ml.

I - Número de células do gânglio da pata inoculada com 10² formas de T. cruzi.

Cl- Número de células do gânglio da pata contralateral ã inoculada.

R - razão entre o número de células apõs e antes da infecção.

ve um declínio no número de células até o 30º dia ,quando apresentou novamente uma ligeira elevação neste número,atⁱⁿgindo um pico menor aos 40 dias de infecção . (Tabela 7 e Figura 11b).

O gânglio da pata contralateral,depois de ter atingido um número de 2,1 vezes o seu normal,continuou a apresentar,em média,este mesmo padrão até o 45º dia de in - fecção (Tabela 7 e Figura 11b).

3.2.4. Relação entre o peso e o número de células dos gânglios poplíteos.

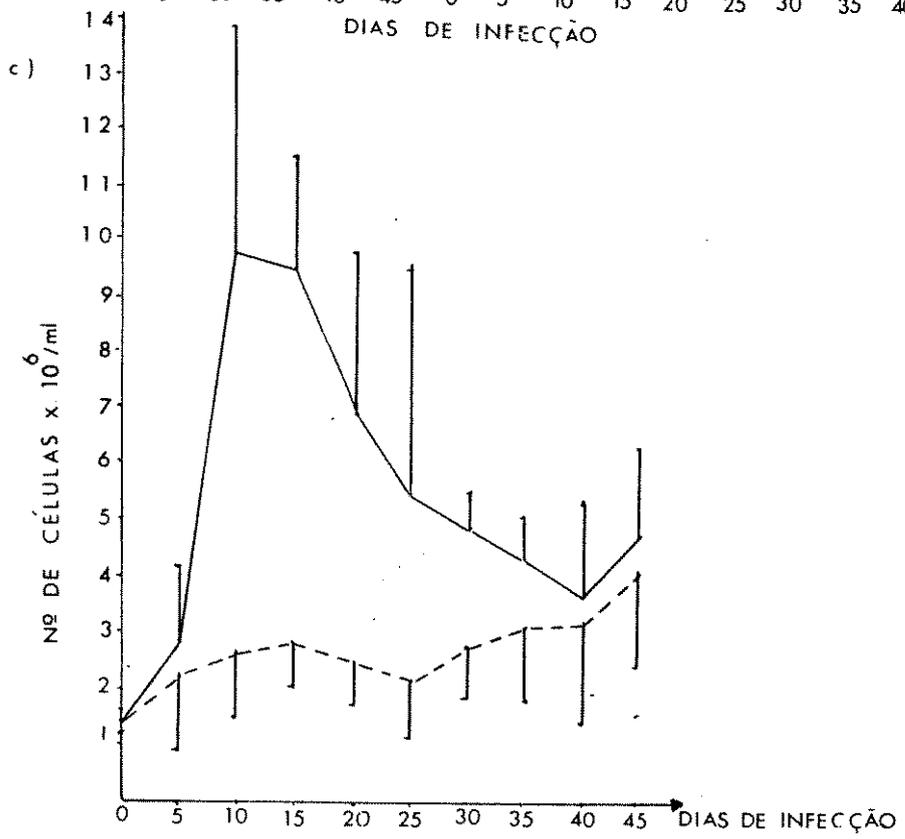
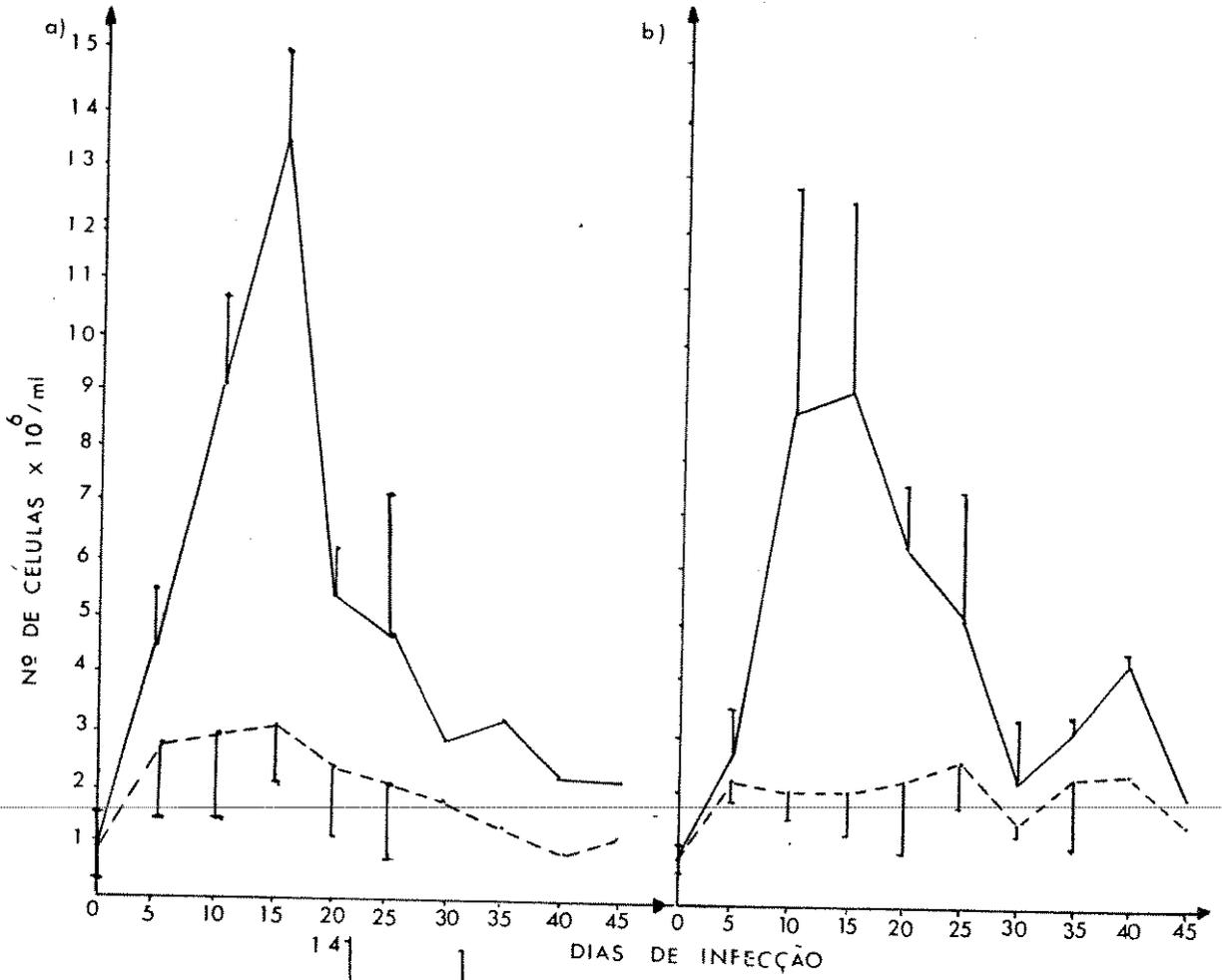
Quando foram relacionados os números máximos de células e as alterações máximas de peso dos gânglios do local de drenagem ou de seus contralaterais,observou-se que ocorrem diferenças entre os resultados obtidos nas linha - gens resistentes e na susceptível.

Nos camundongos da linhagem CBA/J,observou -se que existe uma relação entre o aumento máximo do número de células e o aumento máximo de peso ,tanto no gânglio da pata inoculada como no seu contralateral,no 15º dia de infecção (Figuras 9 e 11a). Portanto,nesta linhagem,as alterações de peso estão diretamente relacionadas ao aumento no número de células.

Nos camundongos C57Bl/10,os gânglios de drenagem do local da infecção apresentaram um número máximo de células entre o 10º e 15º dias de infecção (Figura 11b) en-

FIGURA 11 : NÚMERO TOTAL DE CÉLULAS DE GÂNGLIOS POPLÍTEOS DA PATA INOCULADA (____) OU DA PATA CONTRALATERAL (_ _ _) EM CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS ISOGÊNICAS CBA/J(a), C57B1/10 (b) e F1 (C57B1/10 X CBA/J) (c).

- Cada ponto representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 4 gânglios poplíteos .



quanto que o peso máximo atingido, ocorreu entre o 15º e 20º dia (Figura 10a), não sendo observada uma relação positiva total entre os dois eventos. No gânglio contralateral, no entanto, o pico máximo de células ocorreu no 25º dia (Figura 11b) enquanto que o aumento máximo de peso entre o 20º e 25º dia (Figura 10b), havendo esta relação. Portanto, somente os gânglios de drenagem não apresentaram uma relação direta total entre o número de células e peso, sugerindo que o aumento de peso não é devido somente ao número de células.

Nos camundongos F1 (C57Bl/10 X CBA/J), no entanto, tanto no gânglio da pata inoculada quanto no contralateral, não foi observada uma relação, entre estes dois fatores, tão direta como na linhagem CBA/J, sugerindo que o aumento de peso, em ambos os órgãos, não foi somente devido ao aumento no número de células. No gânglio da pata inoculada, o pico máximo de células foi atingido entre o 10º e 15º dia (Figura 11c) enquanto que o do peso, no 20º dia (Figura 8a). No gânglio contralateral, o número de células máximo foi atingido no 15º dia de infecção (Figura 11c), enquanto que o peso máximo 5 dias após, ou seja, no 20º dia. (Figura 8b)

3.2.5. Número total e porcentual de linfócitos T, B e macrófagos de gânglios poplíteos.

Linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J).

Quando foram analisadas as populações celulares do gânglio poplíteo ,durante a infecção,observou-se que alterações estatisticamente significativas não ocorreram a nível de macrófagos,estando estas predominantemente concentradas sobre a população de linfócitos. Estes resultados foram observados tanto a nível de gânglios que entraram em contato com o parasita,no primeiro momento da infecção (Figura 12a) quanto nos contralaterais (Figura 12b),através de sua disseminação pela corrente sanguínea.

As alterações observadas nas populações de linfócitos ocorreram principalmente durante a fase aguda, mantendo-se através da fase crônica. Foi considerado como limite entre as duas fases o 20º dia,quando os níveis do parasita no sangue foram drasticamente reduzidos.

Nos primeiros 10 dias de infecção,o porcentual de linfócitos T e B não foi alterado significativamente. A partir do 10º dia,período em que ocorreu o pico parasitêmico,foram observadas alterações principalmente a nível de porcentual de linfócitos T,que apresentou um declínio acentuado,chegando ao mínimo de 38,5 %,no 15º dia,no gânglio da pata inoculada (Figura 12a) e a 35,9% no 20º dia,no gânglio da pata contralateral (Figura 12b) .Neste mesmo período, o porcentual de linfócitos B encontrava-se elevado,sendo os dois órgãos predominantemente populado por estes linfócitos.

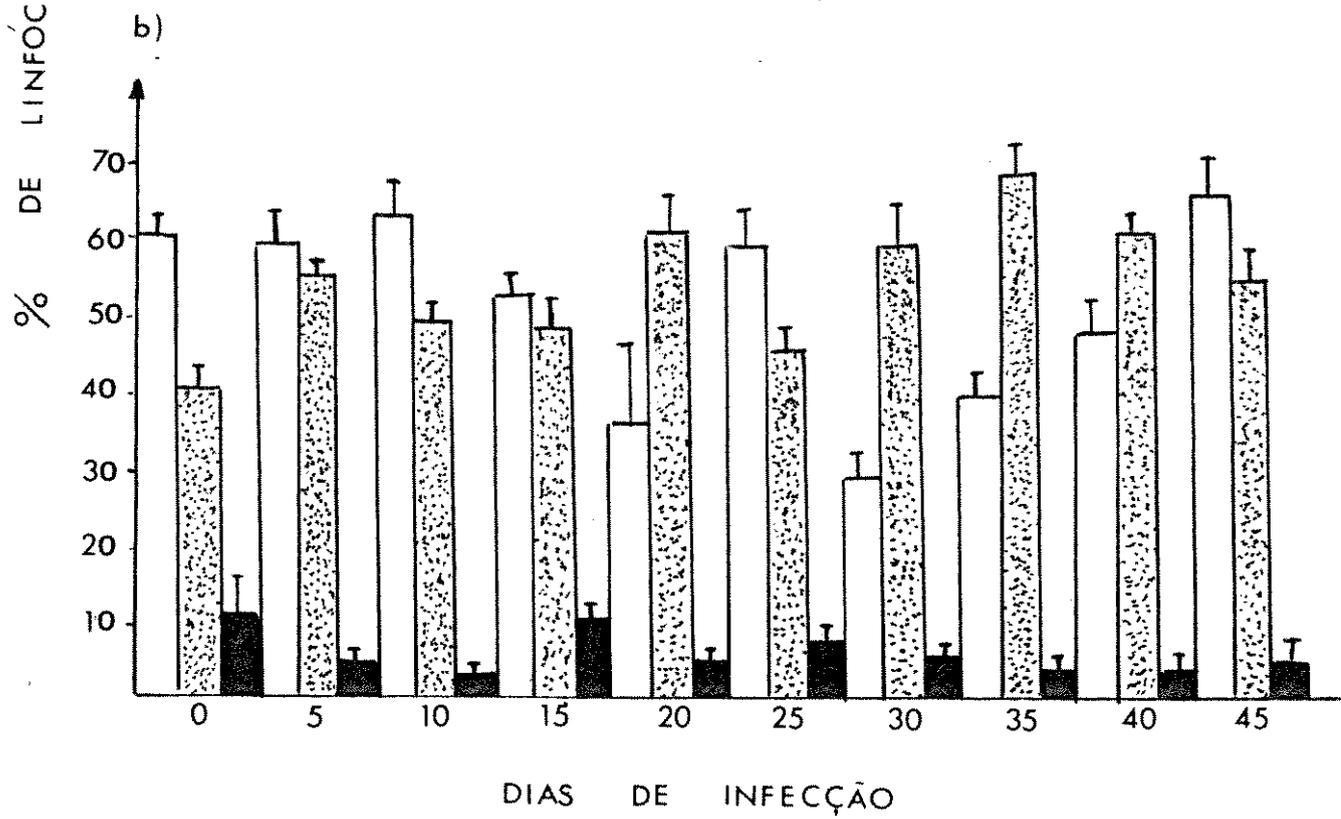
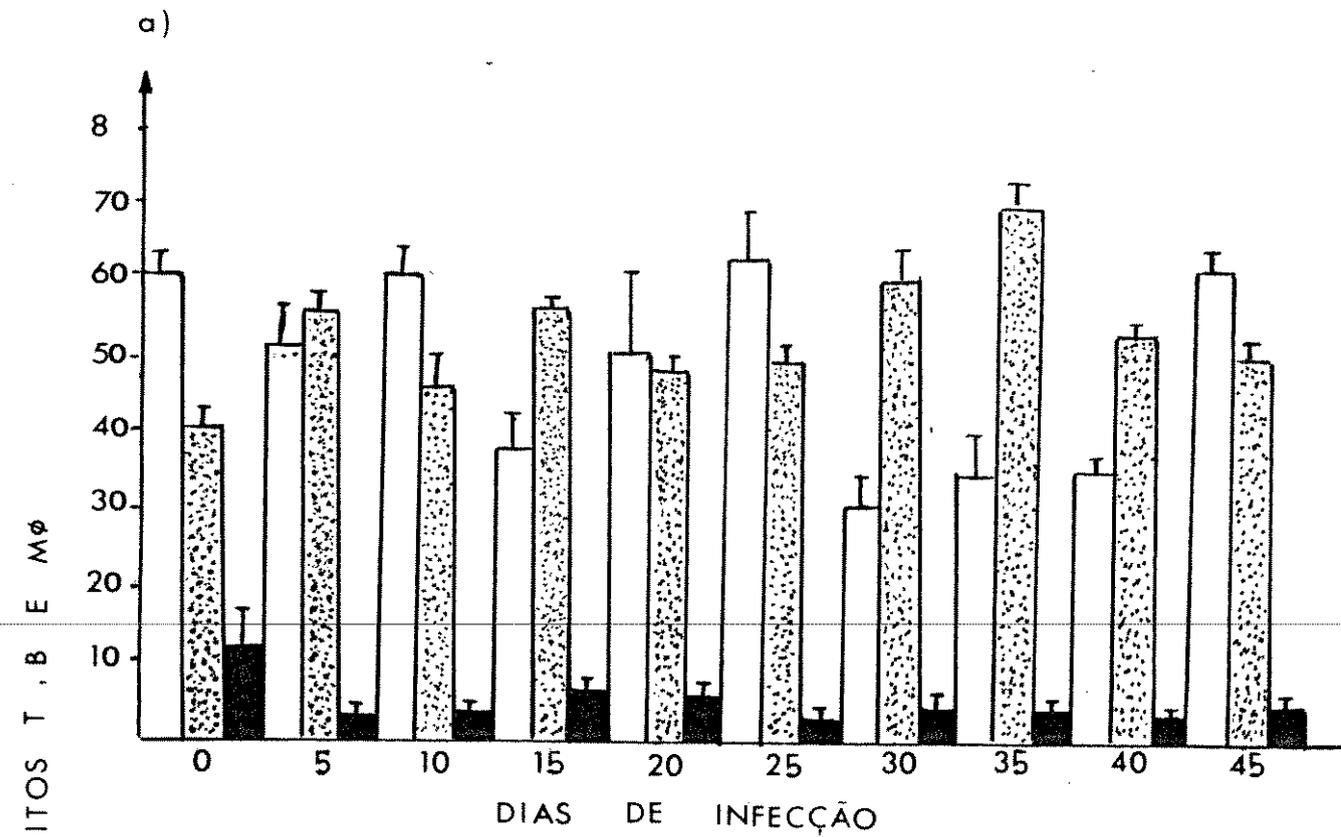
No início da fase crônica,os níveis de linfócitos T e B retornaram a seus níveis normais. No entanto,no 30º dia foi observado um novo declínio porcentual de linfó-

FIGURA 12 : PORCENTUAL DE LINFÓCITOS T () ,
B () E MACRÓFAGOS ()
EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM ISOGÊNICA
F1 (C57B1/10 X CBA/J).

a) Gânglio da pata inoculada com 10^2
formas de T. cruzi.

b) Gânglio da pata contralateral ã
inoculada.

- Cada barra representa a média arit
mética + desvio-padrão de 4 gânglios
poplíteos.



citó T. Durante este período - 30 a 40 dias - o percentual de linfócitos T, no gânglio da pata inoculada manteve-se entre 31,6 e 35% (Figura 12a). No gânglio contralateral foi observado um percentual mínimo de 28,8%, no 30º dia, com um aumento subsequente para cerca de 50,0%, no 40º dia. (Figura 12b) Concomitante ao declínio de linfócitos T, a partir do 25º dia, foi observado um aumento progressivo no percentual de linfócitos B, que atingiu um pico máximo no 35º dia, com 69,6% no gânglio da pata inoculada (Figura 12a) e 68,1%, no contralateral. (Figura 12b) Após o pico de linfócitos B, ocorreu uma tendência das duas populações linfocitárias se igualarem percentualmente, voltando a níveis próximos ao normal por volta do 45º dia, nos dois tipos de gânglios.

Durante o período de estudo foi observada a existência de duas populações distintas de linfócitos T e B, que se caracterizavam por apresentarem uma distribuição de seus antígenos de superfície - Thy 1.2 no caso de linfócitos T e de Ig no de linfócitos B - por toda a membrana - como um anel, (Figura 13 a e b) ou por regiões restritas na forma de um "capping" (Figura 14 e 13 b - seta).

Em animais normais da linhagem Fl (C57Bl/10XCBA/J), os linfócitos T e B, com marcação em anel constituíram um pequeno percentual da população, sendo de 1,6% para os linfócitos T (Figura 15 a) e de 4,2% para os linfócitos B (Figura 15 b).

O maior percentual de linfócitos T ou B nestes

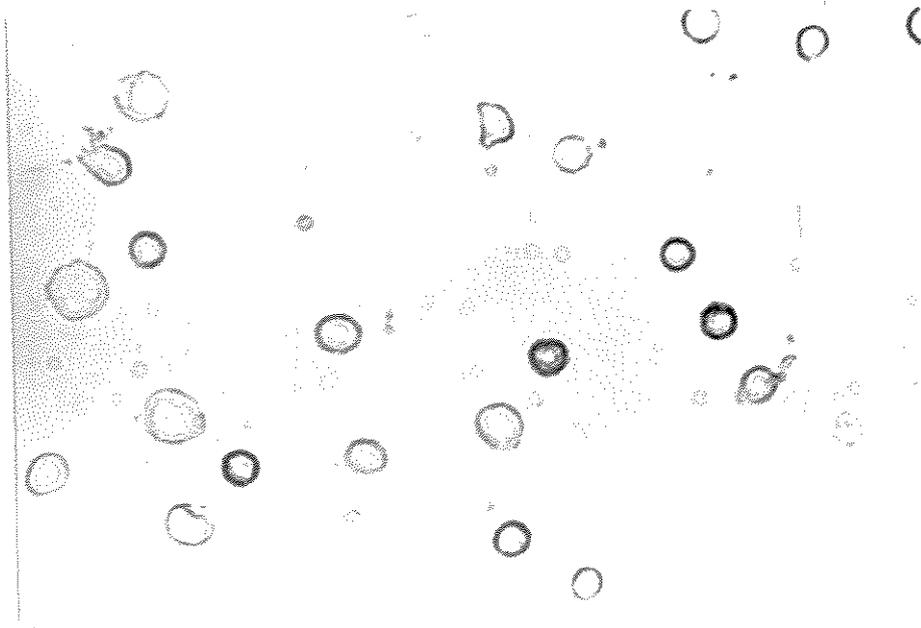


FIGURA 13a

Células de gânglio poplíteo de camundongo F1 (C57BL/10XCBA/J) infectado com T. cruzi (20º dia), incubadas com soro anti linfócito T (1:1000), soro de carneiro anti-IgG de coelho e PAP (1:80). Aumento: 500 vezes.

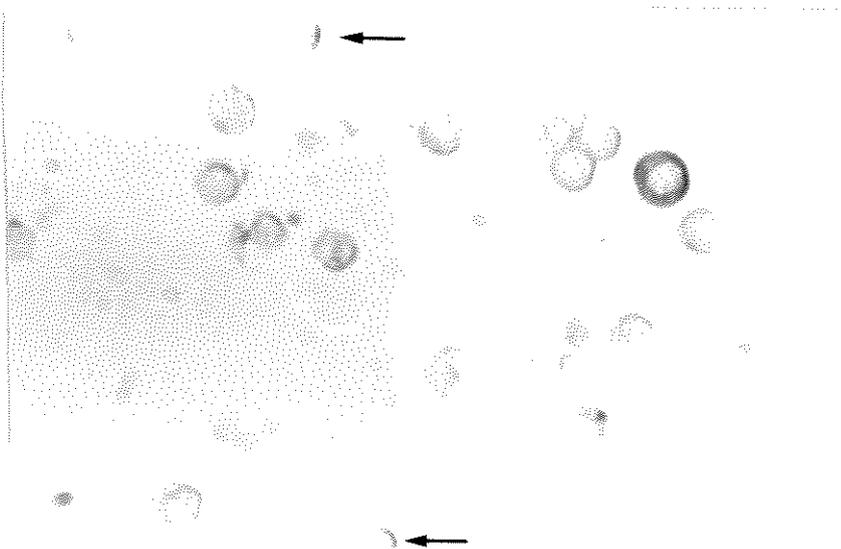


FIGURA 13b

Células de gânglio poplíteo de camundongo F1 (C57BL/10XCBA/J) infectado com T. cruzi (20º dia), incubadas com soro anti-IgG de camundongo (1:800), soro de carneiro anti-IgG de coelho e PAP (1:80). Aumento: 500 vezes. (seta-marcação em "capping")

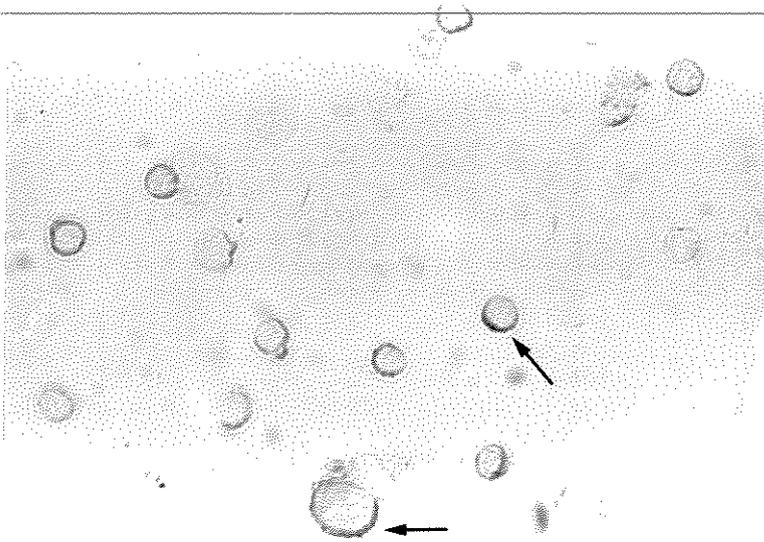


FIGURA 14

Células do gânglio poplíteo de camundongo F1(C57Bl/10XCBA/J), infectado com T. cruzi, incubadas com soro anti-linfócito T (1:1000), soro de carneiro anti-IgG de coelho e PAP(1:80) Aumento :500 vezes . (seta - marcação em "capping").

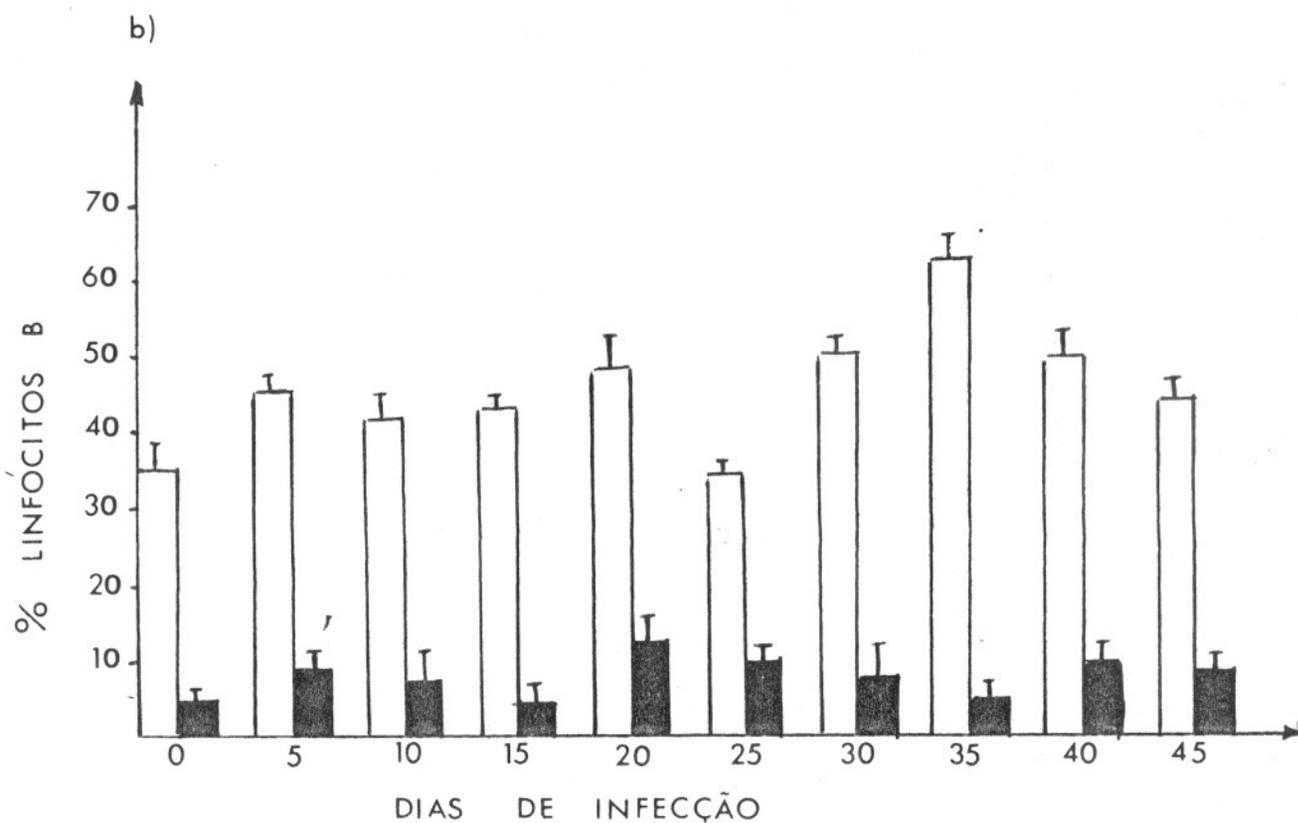
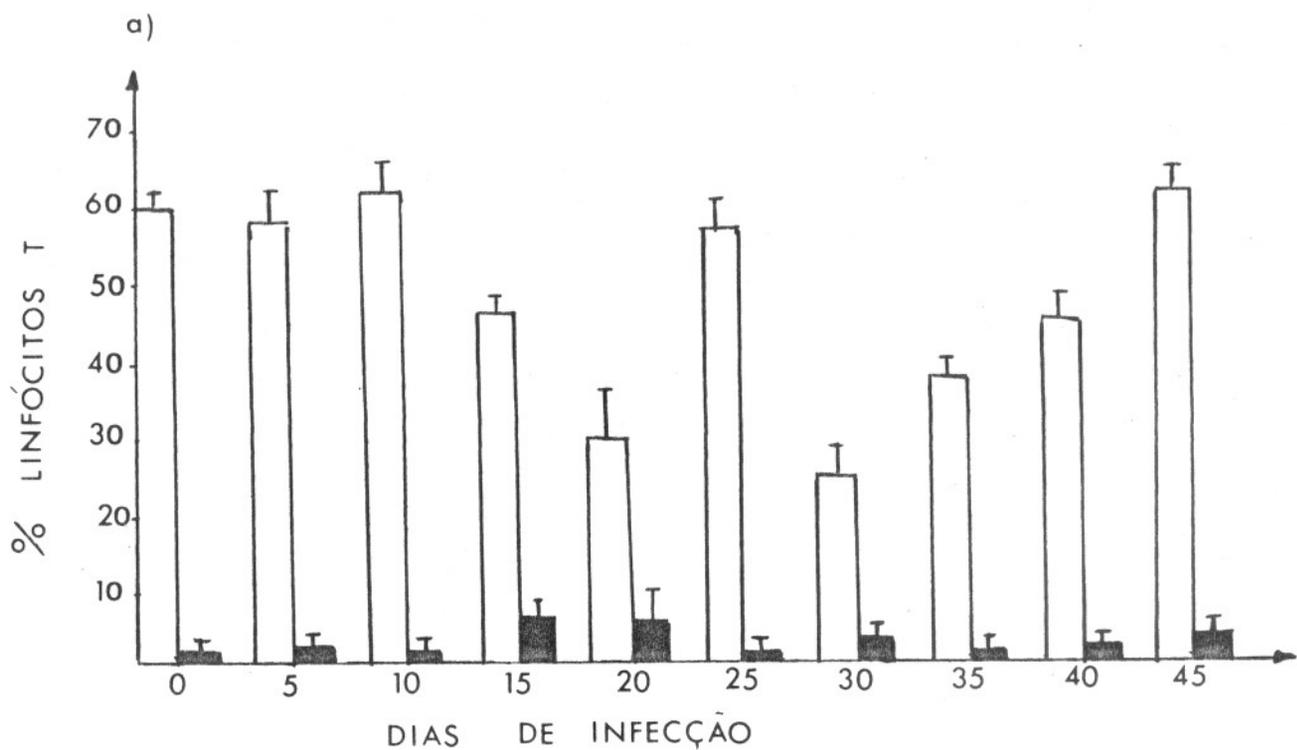


FIGURA 15:a) Porcentual de linfócitos T de camundongos da linhagem F1(C57Bl/10 X CBA/J) marcados em "capping" () ou em anel () de gânglios poplíteos da pata inoculada com 10^2 formas de T. cruzi. b) Porcentual de linfócitos B de camundongos da linhagem F1(C57Bl/10 X CBA/J) marcados em "capping" () ou em anel () no mesmo gânglio. Cada barra representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 4 gânglios.

animais, tanto antes quanto depois da infecção, foi caracterizado por populações que apresentavam marcações em "capping". No entanto, quando foi observado um declínio da população total de linfócitos T- no período de 10 a 25 dias de infecção - ocorreu um aumento porcentual progressivo de linfócitos T marcados em anel e este foi mais acentuado no gânglio da pata inoculada com o parasita. Neste gânglio, estas células atingiram seus níveis máximos entre o 20º e 25º dias de infecção, atingindo porcentuais de 13,5% e 12,2%, respectivamente. (Figura 15a) No gânglio contralateral este aumento não foi tão exacerbado, chegando a atingir, no 20º dia, um porcentual de 5,6. (Figura 16a) Com o reestabelecimento dos níveis normais de linfócitos T, no 25º dia, estas células marcadas em anel também voltaram à normalidade.

Em relação aos linfócitos B com marcação em anel, não ocorreram alterações significativas em nenhum dos dois tipos de gânglios (Figuras 15 b e 16b).

Quando analisamos as populações celulares em números absolutos, observou-se que nos primeiros cinco dias de infecção, ocorreu um aumento numérico destas células, apesar de não se alterarem as suas proporções. A partir do 5º dia, no gânglio da pata inoculada, tornou-se mais acentuado o aumento no número de linfócitos T e B, sendo esta intensa celularização caracterizada principalmente por linfócitos T (Figura 17). No gânglio contralateral, apesar de não ser observado este aumento intenso no número de células, ocorreu também um predomínio de linfócitos T (Figura 18).

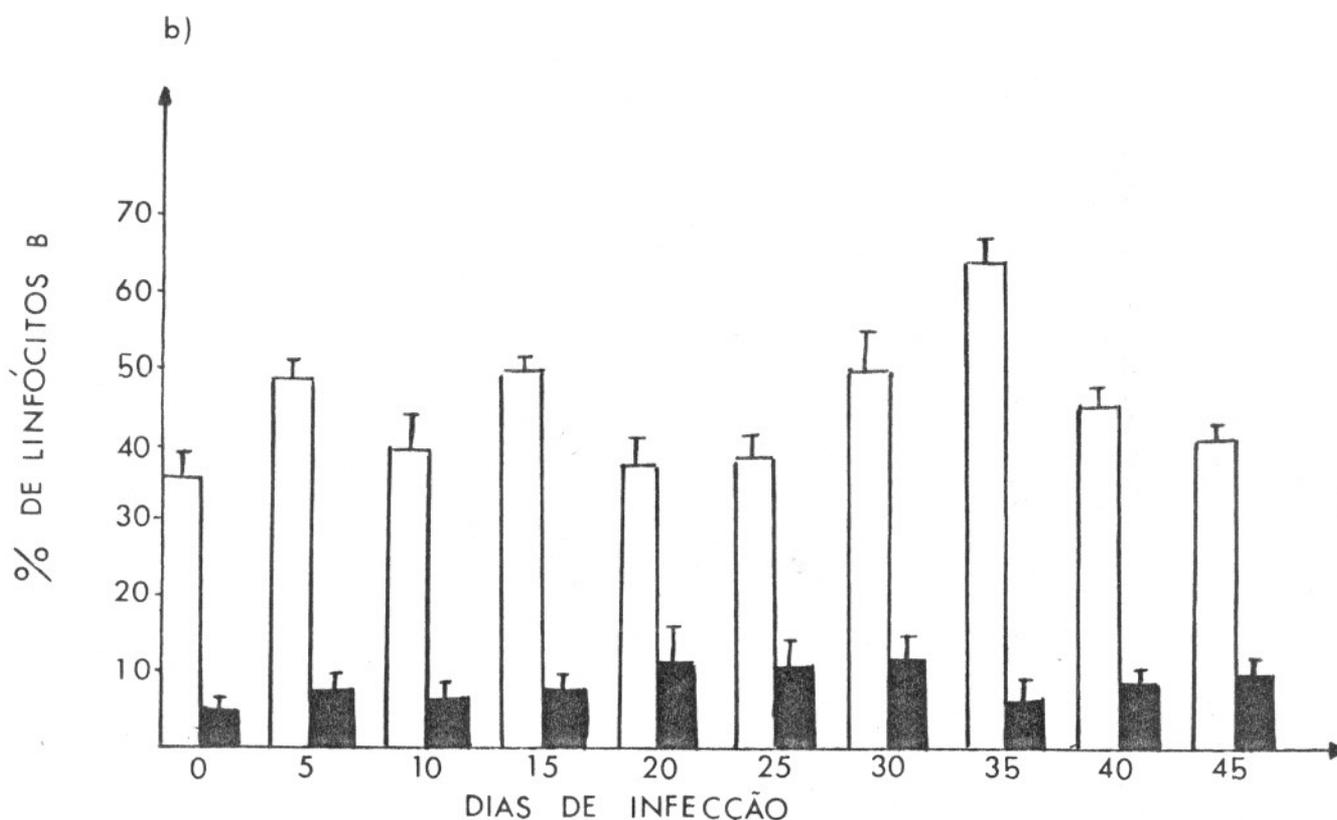
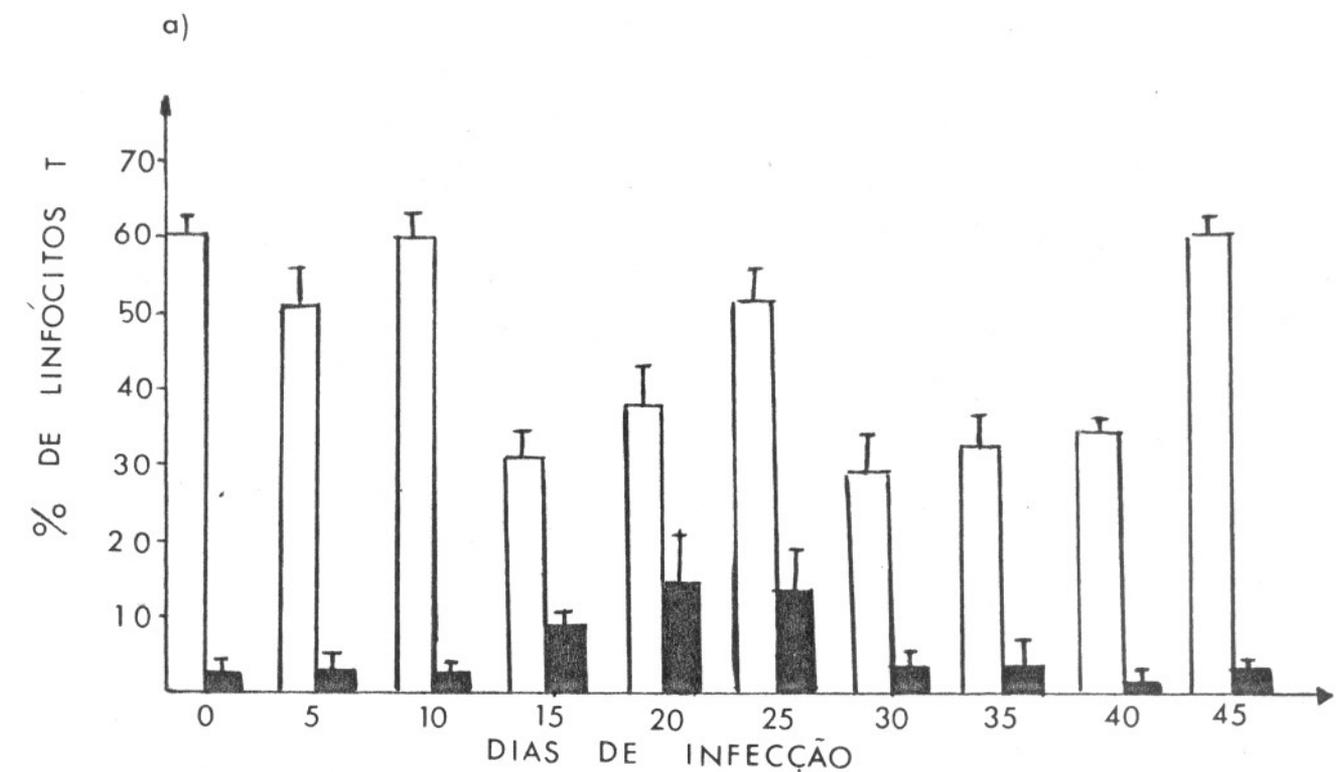


FIGURA 16: a) Porcentual de linfócitos T de camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J) marcados em "capping" (□) ou em anel (■) de gânglios poplíteos da pata contralateral à inoculada com *T. cruzi* b) Porcentual de linfócitos B de camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J) marcados em "capping" (□) ou em anel (■) no mesmo gânglio. Cada barra representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 4 gânglios.

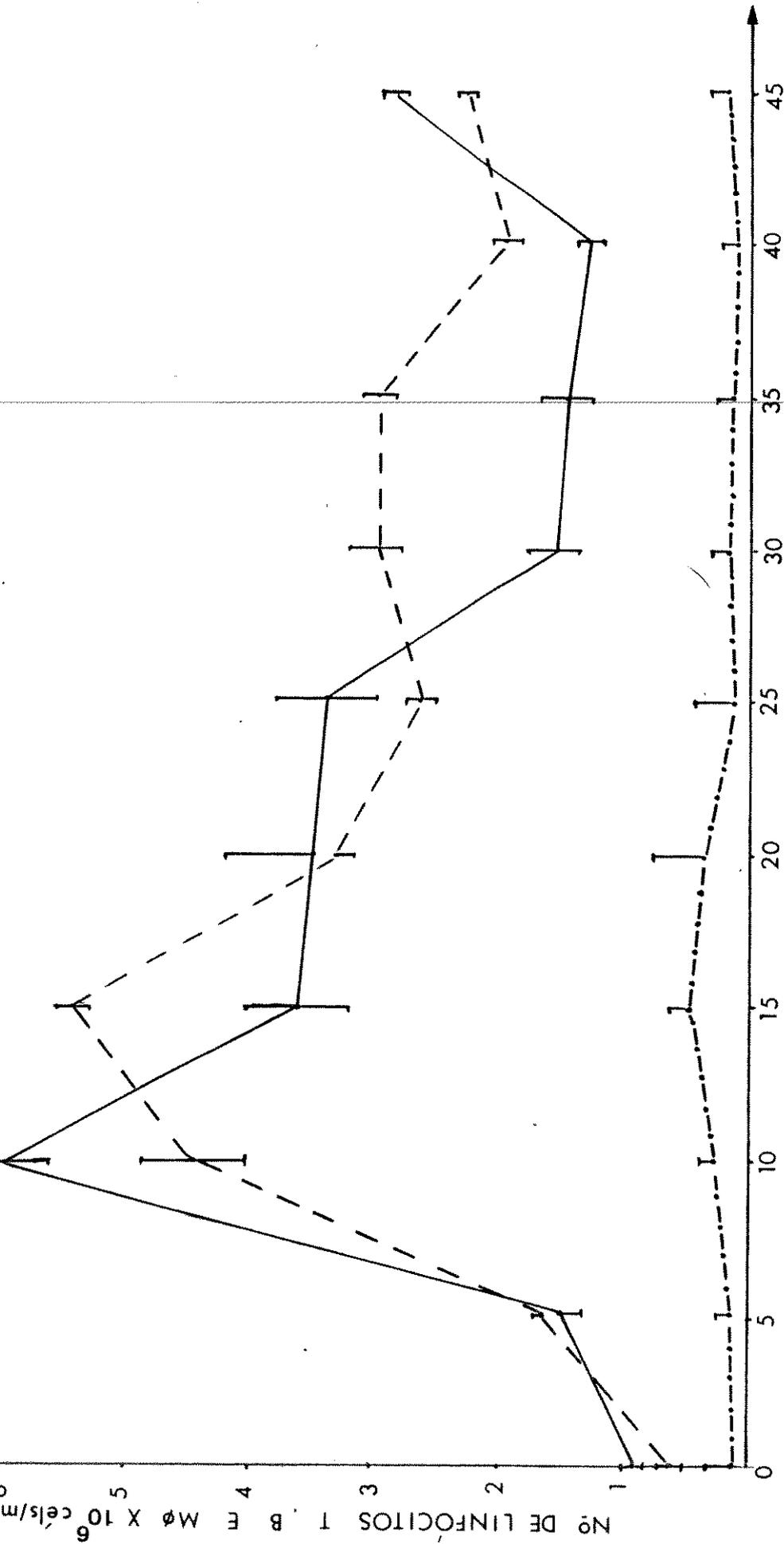


FIGURA 17: Número de linfócitos T (____), B (- - -) e macrófagos

(- · - ·) em gânglios poplíteos da pata inoculada com 10^2 formas de T. cruzi, de camundongos Fl (C57Bl/10 X CBA/J), durante as fases aguda e crônica da infecção. Cada ponto representa a média aritmética + desvio-padrão do número de células de 4 gânglios.

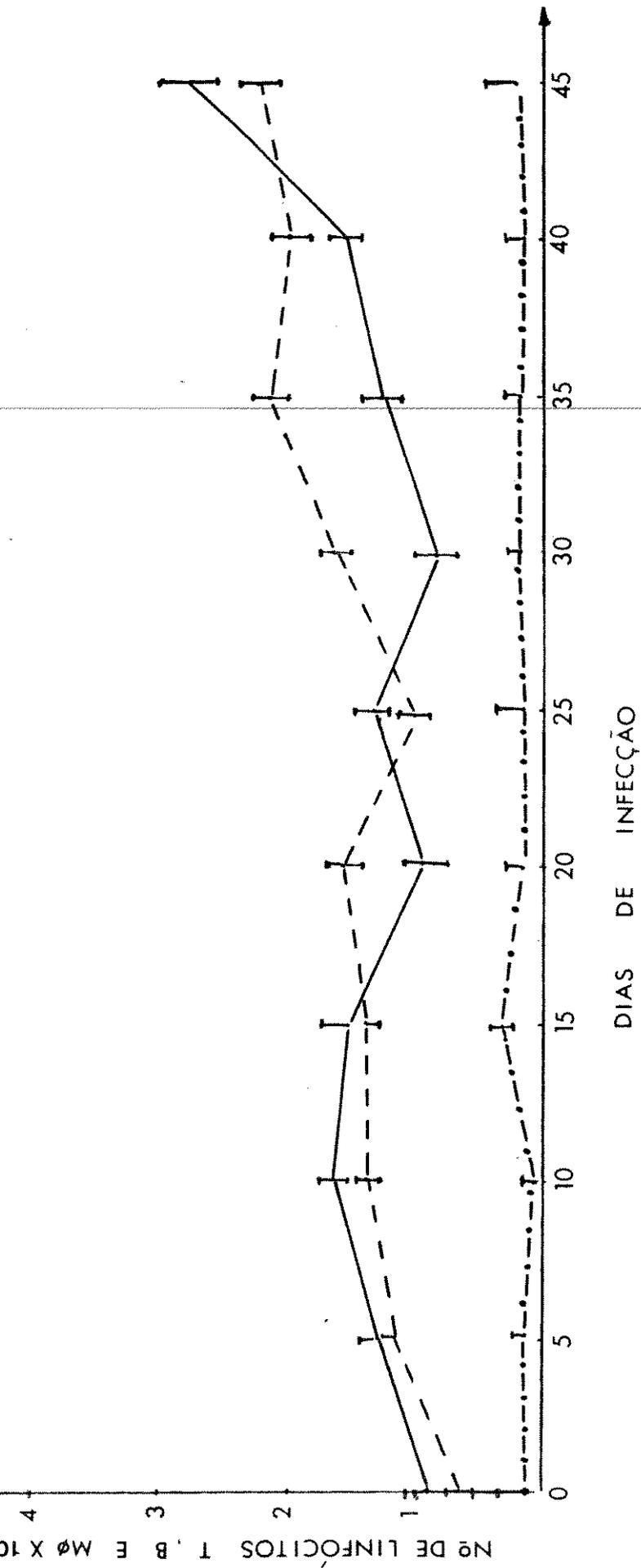


FIGURA 18: Número de linfócitos T (—), B (- - -) e macrófagos (- · - ·) em gânglios poplíteos da pata contralateral à pata inoculada com 10^2 formas de T.cruzi, de camundongos da linhagem Fl(C57Bl/10 X CBA/J), durante as fases aguda e crônica da infecção. Cada ponto representa a média aritmética \pm desvio-padrão do número de células de 4 gânglios.

No 15º dia de infecção, no gânglio da pata inoculada, quando se observou acentuada redução porcentual de linfócitos T, foi detectada uma elevação do número absoluto de linfócitos T embora houvesse um predomínio do número absoluto e porcentual de linfócitos B (Figura 17). No gânglio contralateral apesar de não ter ocorrido um aumento exacerbado no número de células, no 20º dia, o predomínio foi também de linfócitos B (Figura 18).

A partir deste período, foi observado um declínio no número de linfócitos T e B, no gânglio da pata inoculada, não havendo, no entanto, a redução a níveis normais do número de linfócitos B, até o 45º dia. (Figura 17) No gânglio contralateral, estes resultados foram semelhantes, sendo atingido o maior número de linfócitos B, no 35º dia de infecção. (Figura 18)

Linhagem CBA/J.

Nesta linhagem parental dos camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J), susceptível à infecção pelo T. cruzi, também foram observadas maiores alterações quantitativas nas populações linfocitárias. As alterações quantitativas ocorridas nas populações macrofágicas não foram intensas, não havendo um maior significado no estudo das modificações da cinética celular decorrente da infecção.

O estudo destas modificações, durante a infecção.

pelo T. cruzi ,nesta linhagem, foram restritas à fase aguda, sendo observadas alterações quantitativas à nível porcentual e absoluto.

Quando foram analisadas as populações celulares normais desta linhagem de camundongos, observou-se que existe um porcentual maior de linfócitos T nestes animais-70,9% - (Figura 19 a e b) quando comparados com camundongos das linhagens Fl (C57Bl/10 X CBA/J) e C57Bl/10 com 60,6% (Figura 12) e 59,4 % (Figura 21), respectivamente.

Esta população de linfócitos ,após a infecção , sofreu um declínio porcentual pronunciado, nos primeiros 20 dias ,no gânglio da pata inoculada - 37,8 % - e no gânglio da pata contralateral - 46,5 (Figuras 19 a e b). Concomitante a este declínio do porcentual de linfócitos T, ocorreu uma elevação porcentual gradativa de linfócitos B que atingiu seu máximo, entre o 15º e 20º dia de infecção, nos dois gânglios analisados ,chegando a 50,9% no gânglio da pata inoculada (Figura 19a) e 52,0% no contralateral (Figura 19 b). Estas alterações foram extremamente significativas desde que os gânglios linfáticos são órgãos com predomínio de linfócitos T, apresentando cerca de 34,6% de linfócitos B ,nesta linhagem (Figura 19 a e b).

Após este ápice no porcentual de linfócitos B , observou-se até o 20º dia, nos dois gânglios ,uma tendência entre as populações de linfócitos T e B, em se equilibrarem.

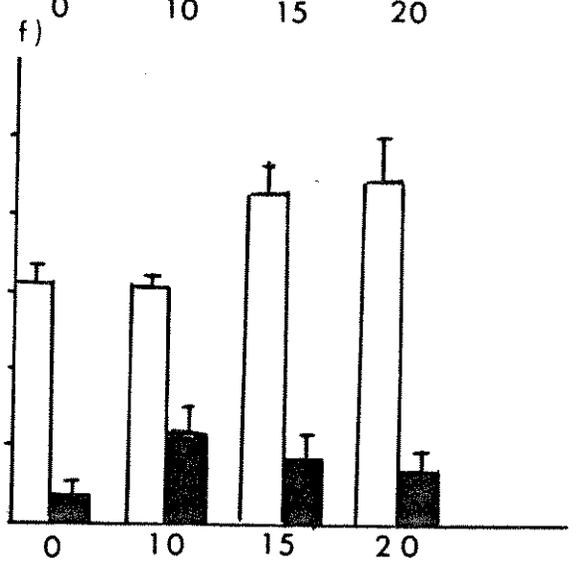
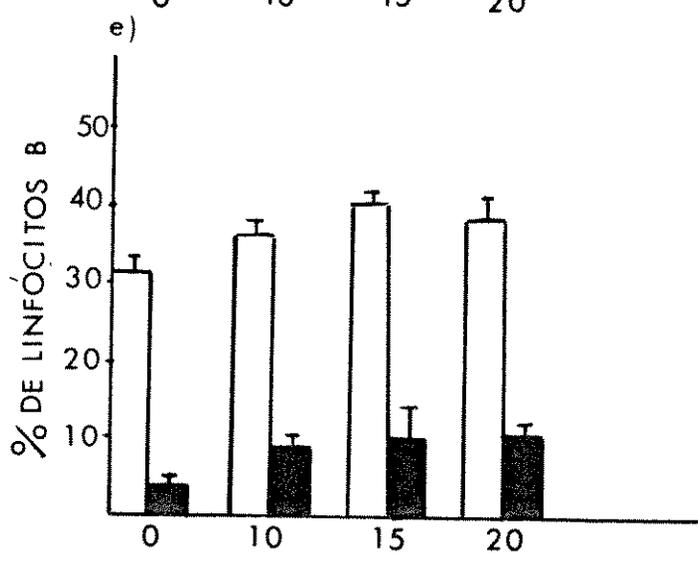
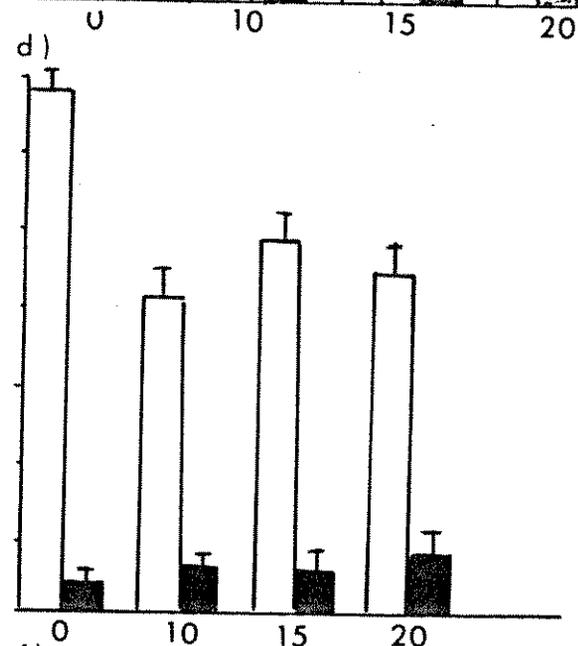
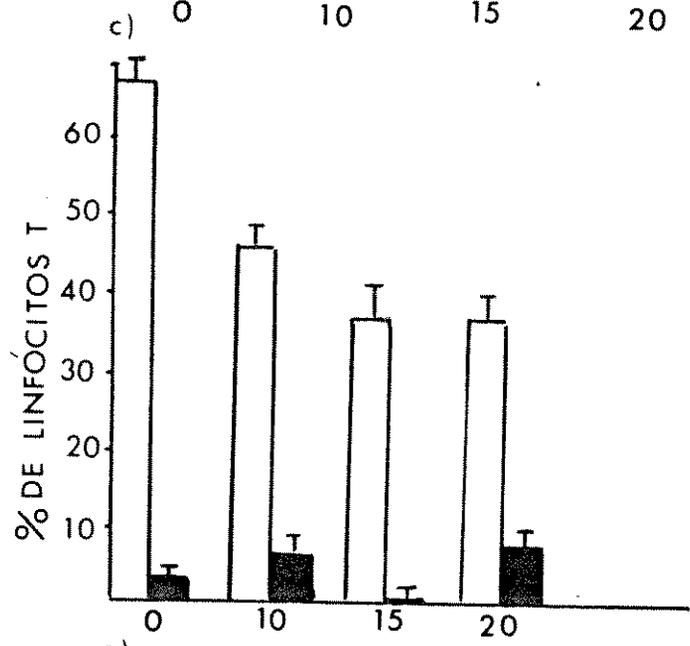
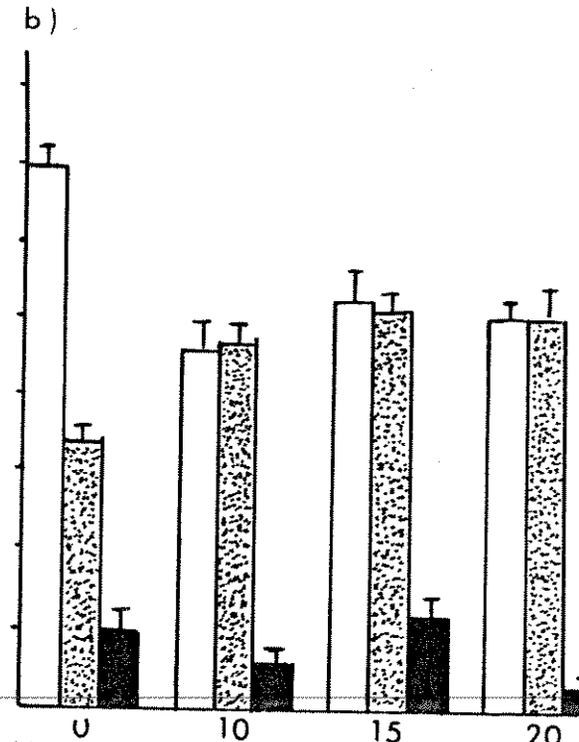
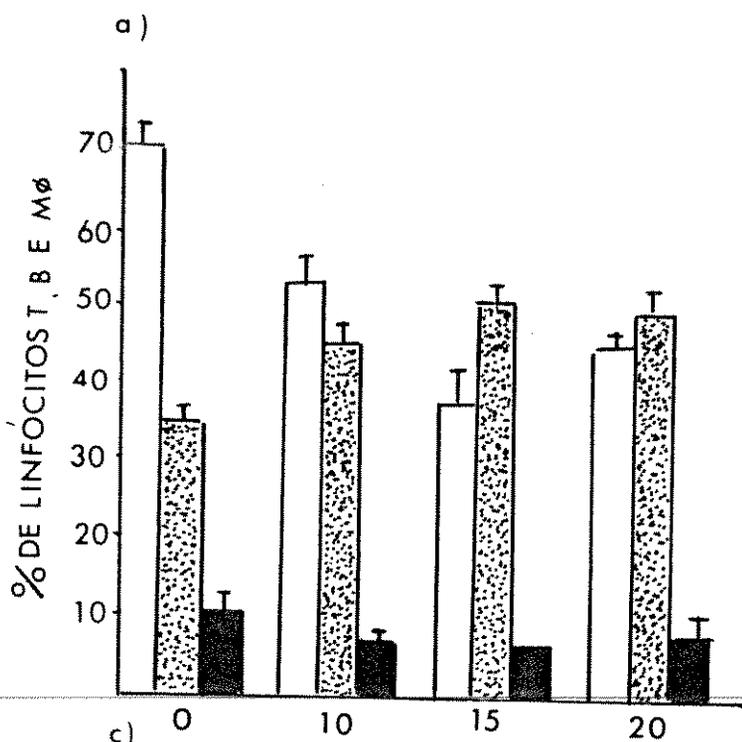
Como foi observado na linhagem Fl (C57Bl/10xCBA/J), nos camundongos CBA/J também ocorreram dois tipos de mar-

FIGURA 19 : PORCENTUAL DE LINFÓCITOS T (), B () e MACRÓFAGOS () NO GÂNGLIO POPLÍTEO DA PATA INOCULADA (a) E DA PATA CONTRALATERAL (b) EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM CBA/J.

PORCENTUAL DE LINFÓCITOS T MARCADOS EM "CAPPING" () OU EM ANEL () NO GÂNGLIO POPLÍTEO DA PATA INOCULADA (c) E DA PATA CONTRALATERAL (d) EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM CBA/J.

PORCENTUAL DE LINFÓCITOS B MARCADOS EM "CAPPING" () OU EM ANEL () NO GÂNGLIO DA PATA INOCULADA (e) E DA PATA CONTRALATERAL (f) EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM CBA/J.

- Cada ponto representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 4 gânglios.



DIAS DE INFECÇÃO

cação sobre a superfície de linfócitos T e B. Uma marcação é caracterizada por ocorrer integralmente sobre a membrana celular ,em forma de anel enquanto que a outra em forma de "capping" ,em regiões restritas.

Tanto no gânglio da pata inoculada como no contralateral a maior parte dos linfócitos T e B apresentaram marcação tipo "capping", antes ou após a infecção.

O percentual de linfócitos T e B marcados em "capping" no gânglio da pata inoculada e no contralateral , apresentaram uma evolução semelhante àquelas observadas quando são analisadas as populações como um todo. (Figura 19)

Em relação à população de linfócitos T marcados em anel, no gânglio da pata inoculada, ocorreu uma drástica redução percentual, no 15º dia de infecção (Figura 19c), o mesmo não ocorrendo no gânglio da pata contralateral que manteve seus níveis ligeiramente elevados. (Figura 19d) No entanto, após o 15º dia de infecção, o percentual destes linfócitos atingiu uma proporção idêntica nos dois gânglios.

Os linfócitos B marcados em anel apresentaram-se ligeiramente elevados durante o período estudado, em ambos os órgãos, atingindo um máximo de 10,6%, no gânglio da pata inoculada ,no 20º dia (Figura 19e) e 11,7 % ,no 10º dia, no gânglio da pata contralateral. (Figura 19 f)

Quando estas análises de populações celulares foram realizadas em números absolutos, observou-se que ocorre um aumento exacerbado de linfócitos no gânglio da pa -

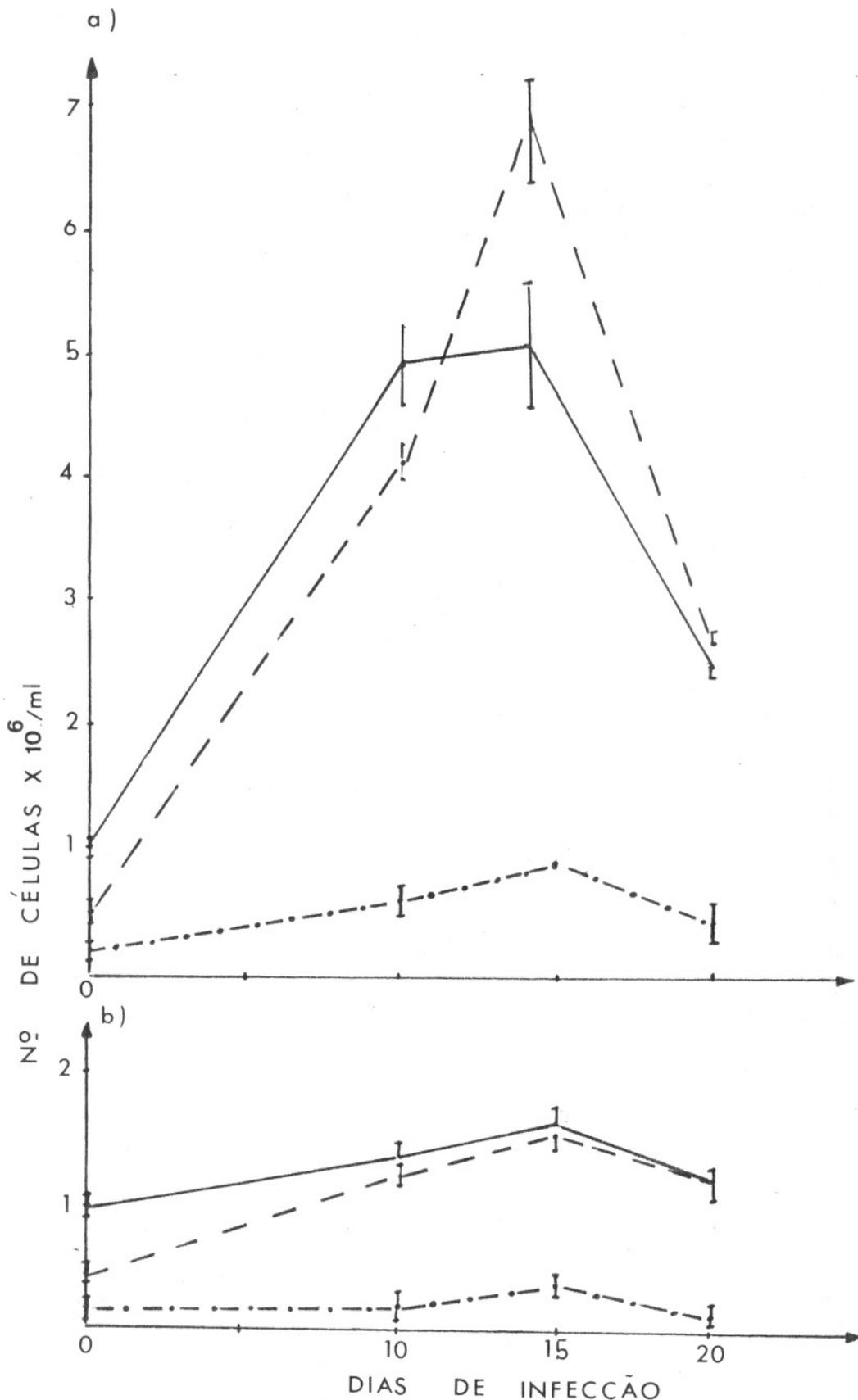


FIGURA 20: Número de linfócitos T (___), B(_ _ _) e macrófagos (. _ . _ .) em gânglios poplíteos de camundongos da linhagem CBA/J, durante a fase aguda da infecção. a) Gânglio da pata inoculada com 10^2 formas de T.cruzi . b) Gânglio da pata contralateral ã inoculada. Cada ponto representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 4 gânglios.

ta inoculada (Figura 20a), o mesmo não sendo observado no contralateral (Figura 20 b).

No gânglio da pata inoculada, observou-se que , até o 10º dia, ocorreu uma intensa e equilibrada proliferação das populações de linfócitos T e B, havendo após este período uma grande expansão dos linfócitos B. Por volta do 20º dia, o número de linfócitos das duas populações voltaram a se equilibrar.

No gânglio contralateral ocorreu uma discreta proliferação de linfócitos T e B, não havendo predomínio de uma população sobre a outra.

Linhagem C57Bl/10.

Nos camundongos desta linhagem, considerada de média resistência nas condições estudadas, também não foram observadas alterações significativas na população de macrófagos, tanto no gânglio da pata inoculada (Figura 21 a) como no contralateral (Figura 21 b).

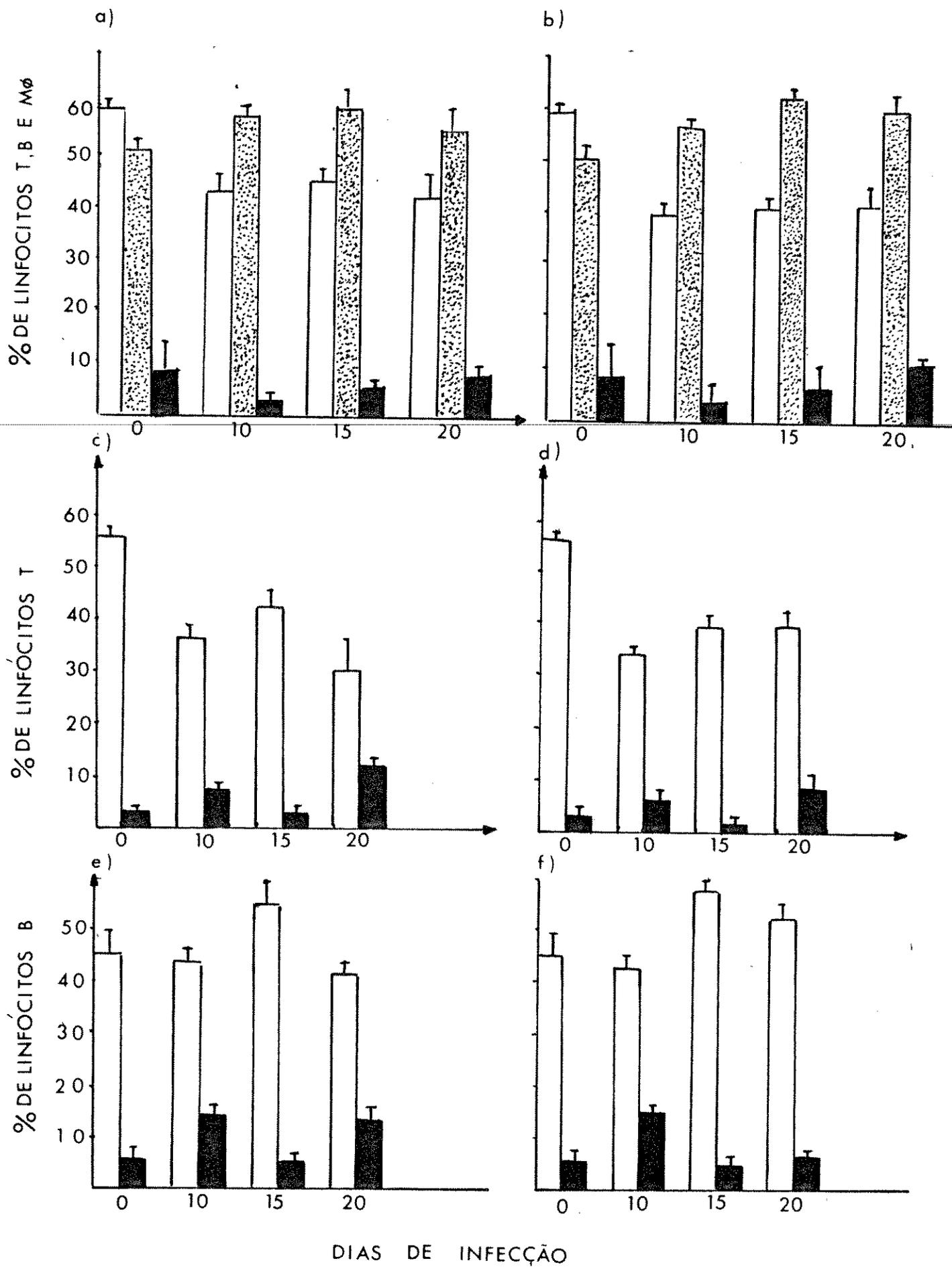
Durante a fase aguda, nos dois tipos de gânglios, foi observado um declínio porcentual de linfócitos T. No entanto, este declínio não foi tão exacerbado como nas duas outras linhagens, atingindo níveis de 43,5% e 41,0%, nos gânglios da pata inoculada (Figura 21a) e seus contralaterais (Figura 21 b), respectivamente, entre o 10º e 20º dia de infecção. Em relação aos linfócitos B, ocorreu um aumento na

FIGURA 21: PORCENTUAL DE LINFÓCITOS T () , B ()
E MACRÓFAGOS () NO GÂNGLIO POPLÍTEO DA
PATA INOCULADA (a) E DA PATA CONTRALATERAL (b) EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57B1/10.

PORCENTUAL DE LINFÓCITOS T MARCADOS EM "CAPPING"
() OU EM ANEL () NO GÂNGLIO DA PATA
INOCULADA (c) E DA PATA CONTRALATERAL (d)
EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM C57B1/10.

PORCENTUAL DE LINFÓCITOS B MARCADOS EM " CAPPING"
() OU EM ANEL () NO GÂNGLIO DA PATA
INOCULADA (e) E DA PATA CONTRALATERAL (f) EM
CAMUNDONGOS C57B1/10.

- Cada ponto representa a média aritmética \pm
desvio-padrão de 4 gânglios.



proporção destas células, atingindo um máximo de 59,5% no gânglio da pata inoculada (Figura 21 a) e 62,7% ,no contralateral (Figura 21 b),no 15º dia de infecção.

Em relação às subpopulações de linfócitos T e B, observou-se que a maioria da população é constituída de células marcadas em "capping", seguindo o mesmo padrão porcentual das populações analisadas como um todo (Figura 21).

As populações de células T marcadas em anel sofreram alterações principalmente no 20º dia de infecção, quando aumentaram para 12% ,no gânglio da pata inoculada (Figura 21 c) e 8,5%,no contralateral, (Figura 21 d) após a diminuição sofrida no 15º dia.

Em relação aos linfócitos B, a população marcada em anel aumentou seus níveis percentuais de 5,3% para 14,2% e 13,2% ,no gânglio da pata inoculada, no 10º e 20º dia de infecção . (Figura 21 e) No gânglio contralateral, este aumento atingiu um porcentual de 14,7 ,no 10º dia e 7,0% ,no 20º dia (Figura 21 f).

Quando estas populações foram analisadas em número absoluto ,observou-se que os linfócitos T e B sofreram um aumento gradual atingindo níveis máximos entre o 10º e o 15º dia, no gânglio da pata inoculada (Figura 22 a). No entanto ,estas alterações foram menos pronunciadas quando comparadas às observadas em camundongos Fl(C57Bl/10 X CBA/J) e CBA/J (Figuras 17 e 20). No gânglio da pata contralateral, foi observado que quase não existem alterações no número

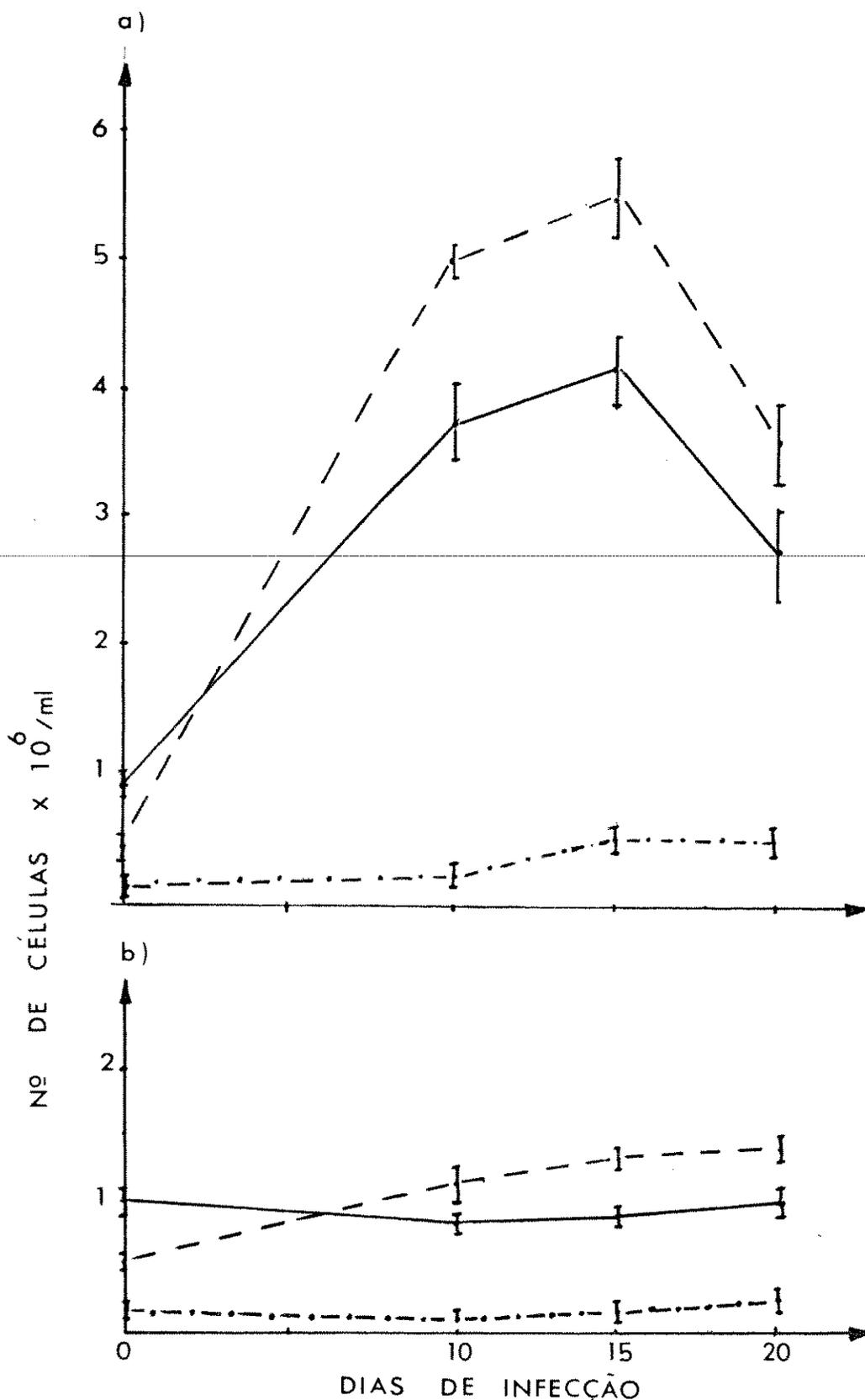


FIGURA 22: Número de linfócitos T (___), B (___) e macrófagos (..) em gânglios poplíteos da linhagem C57B1/10, durante a fase aguda da infecção. a) Gânglio da pata inoculada com 10^2 formas de *T. cruzi*. b) Gânglio da pata contralateral não inoculada. Cada ponto representa a média aritmética \pm desvio-padrão de 4 gânglios.

destes linfócitos. (Figura 22 b) Apesar deste fato, é importante salientar que ocorre, neste gânglio, um predomínio de linfócitos B, neste período, o que também foi observado no gânglio diretamente estimulado pelo parasita.

DISCUSSÃO

O envolvimento das células linfóides na resposta imune ao T. cruzi e sua relação com os mecanismos de resistência e imunopatologia tem sido objeto de estudo e controvérsia, nos diferentes centros de pesquisa que se empenham no estudo da doença de Chagas. Neste sentido, tem se utilizado modelos experimentais "in vitro" com técnicas de cultura de linfócitos e macrófagos e / ou "in vivo" através do estudo de animais isogênicos, principalmente camundongos.

A utilização destes modelos implica, individualmente em limitações inerentes à própria metodologia. Se por um lado o sistema "in vitro" permite um maior controle

sobre as variáveis envolvidas, o sistema "in vivo" reproduz mais fidedignamente o processo natural, mantendo as características do microambiente, fundamentais no desencadeamento dos processos fisiológicos.

O estudo "in vivo" nas linhagens isogênicas de camundongos tem sido eficiente porque seus sistemas genético e imunológico são os mais conhecidos dentre os modelos experimentais e além disso, na doença de Chagas, reproduzem em termos parasitêmicos as fases aguda e crônica da infecção que ocorre num "continuum" de resistência/susceptibilidade. (Trischmann et al. 1978)

Apesar do estabelecimento destes modelos experimentais, ainda não são conhecidos fatores que influenciam o desenvolvimento da infecção natural, dentre os quais o número de formas infectantes inoculadas pelo hospedeiro invertebrado. No entanto, tem sido sugerido que o uso de doses subletais pode reproduzir em camundongos, com o uso de certas cepas, características histológicas, eletrocardiográficas e imunopatológicas mais próximas às de pacientes humanos. (Laguens et al. 1981)

Quanto à via de escape, não é recente a observação de que a inoculação de parasitas através da pele ou de membranas mucosas causa reações inflamatórias locais e linfadenite regional aguda (Köberle, 1968) sugerindo um envolvimento inicial de gânglios linfáticos periféricos. Apesar dos poucos trabalhos relativos à evasão do parasita (Köberle, 1961), mais recentemente Bijowsky e colaboradores (1984) tem

sugerido que o sistema linfático atua como disseminador do parasita, em condições naturais.

Embora haja evidência da importância do acometimento inicial dos gânglios linfáticos periféricos e de sua relação com o desencadeamento da resposta imune, a maioria dos modelos experimentais tem utilizado a via intraperitoneal como a via de inóculo do parasita. Sabe-se que esta via propicia uma ativação de linfócitos, principalmente a nível de baço (Zatz e Lance, 1971) além de um contato prévio com células da cavidade peritoneal o que não reproduz exatamente a infecção natural. Dentro deste contexto, torna-se propício um modelo que utilize a via subcutânea, a qual estimula diretamente os gânglios linfáticos periféricos (Hall e Morris, 1965; Dresser et al. 1970; Zatz e Lance, 1971).

Estas considerações tornam-se relevantes quando se tem em mente que os gânglios linfáticos estão principalmente relacionados com retenção antigênica e produção de anticorpos (Nossal e Ada, 1971), enquanto que o baço, além destas funções, atua sobre a manutenção e remoção de eritrócitos, plaquetas e leucócitos mais velhos ou danificados (Weiss, 1972).

As funções diferenciadas tanto do baço quanto dos gânglios linfáticos tornam-se mais evidentes quando se considera que existem diferenças anatômicas, estruturais e nas proporções celulares (Raff e Wortis, 1970; Raff, 1971; Gutmann e Weissman, 1972; Hoffmann - Fezer et al. 1976; Meyer et al. 1979) destes órgãos, apesar da principal célula do sis

tema - o linfócito - ser extremamente dinâmica, permitindo -
lhe uma contínua circulação pelo organismo.

Dentro deste contexto, optamos no presente tra -
balho pela inoculação de uma baixa dose de parasitas atra -
vés do coxim plantar, por via subcutânea, propiciando um mode -
lo mais próximo do natural no que se refere ao acometimento
de gânglios periféricos e à reprodução das fases aguda e crô -
nica da infecção.

A inoculação dos parasitas através do coxim plan -
tar, por via subcutânea, mostrou ser eficiente desde que le -
va à estimulação do gânglio poplíteo que é muito pouco ati -
vado, em condições normais. Este gânglio geralmente sofre um
recrutamento restrito de linfócitos a menos que esteja dre -
nando um local estimulado antígenicamente (Hall et al. 1962).
Além disso, a existência de um gânglio poplíteo contralateral,
não diretamente estimulado pelo parasita, pode ser objeto de
estudos comparativos em relação ao gânglio que drena a pata
inoculada. Nesse sentido, nosso objetivo, usando este modelo
experimental, é comparar os eventos imunológicos, a nível de
gânglio poplíteo, em linhagens isogênicas de camundongos de
diferentes graus de resistência /susceptibilidade ao T. cruzi.

Neste modelo experimental, o atraso no dia do pi -
co parasitêmico, nas três linhagens, e o aumento não-signifi -
cativo do número de parasitas, quando comparado com os resulta -
dos obtidos por via intraperitoneal (Corsini et al. 1980a) in -
dica que a organização estrutural do gânglio poplíteo retar -
da o aparecimento dos parasitas no sangue e o dia do pico de

parasitemia, não impedindo ,no entanto, a disseminação do parasita.

Apesar do retardo no dia do pico parasitêmico ter sido atribuído à via de inoculação , não podemos excluir também a possibilidade deste fato ter ocorrido devido a variações intralinhagem da cepa Y, que propiciam o aparecimento do pico parasitêmico entre o 11º e 13º dias (Araújo e Neves, 1978).

A análise da mortalidade, durante 20 dias, nas 3 linhagens também sugere que não ocorrem diferenças marcantes entre o modelo aqui descrito e o de inoculação intraperitoneal. (Corsini et al. 1980a) Estas características, no entanto, não encontram confirmação na literatura, sendo usualmente descrita, após inoculação subcutânea, uma infecção mais severa que aquela causada pela inoculação intraperitoneal. (Kierszenbaum e Howard, 1976; McHardy , 1977)

As diferenças que poderiam ocorrer nos níveis parasitêmicos de camundongos infectados por estas duas vias tornam-se mais questionáveis em vista da ausência de um ritmo circadiano no ciclo de T. cruzi , constatada pelas enormes variações no número de parasitas circulantes, em um mesmo animal, no espaço de poucas horas. (Sherlock, 1984) Este fato explica, em parte, a heterogeneidade dos níveis parasitêmicos apresentados por diferentes animais de uma mesma linhagem isogênica, no mesmo período de infecção, como tem sido observado por nós e outros autores. (Loureiro, 1985)

Em relação às alterações dos gânglios envolvi -

dos na infecção, os resultados sugerem que independentemente do grau de resistência /susceptibilidade, existe uma resposta mais acentuada no órgão que drena a região de inoculação quando comparado com o seu contralateral. Esta resposta é evidenciada principalmente através de alterações de peso, número e proporção das populações celulares.

O efeito do contato inicial dos antígenos de T. cruzi com as células imunocompetentes do órgão drenante foi evidenciado pelas maiores alterações do peso deste órgão em relação ao gânglio contralateral. Em relação a este tipo de alteração, devido a grande variabilidade individual de cada animal, consideramos as tendências do aumento de peso dos gânglios e não os valores absolutos.

O fator desencadeante do aumento de peso dos gânglios pode ser associado à presença de antígenos no local da infecção, como tem sido sugerido para outros antígenos. (Rowley et al. 1972; Ford, 1975). Apesar de, em nossos estudos, ocorrer a ausência de formas íntegras do parasita no local, o antígeno desencadeador do processo, durante o período pré-patente da infecção, poderia ser formas tripomastigota inviáveis ou viáveis, porém de carga elétrica mais baixa (Souto -Padrón et al. 1984) que poderiam ser mais facilmente destruídas pelo macrófago. Outra hipótese a ser considerada seria a sensibilização de células imunocompetentes através de antígenos secretados ou liberados da superfície do parasita (Araújo, 1976; Gottlieb, 1977), ao passar pelo gânglio.

Estas considerações sugerem que os macrófagos

destes gânglios linfáticos, quando em contato com antígenos de T. cruzi liberariam um "fator de recrutamento de linfócitos", como tem sido evidenciado após inoculação de outros antígenos particulados (Vadas et al.1979; Vadas et al.1981):

Portanto, as alterações de peso nos gânglios poplíteos, nas fases pré-patente e aguda da infecção, podem estar relacionadas ao aumento do influxo de linfócitos do "pool" recirculante (Drayson et al.1981; Hay e Cahill, 1982) como tem sido descrito em outros sistemas.

A estimulação do gânglio drenante ao T. cruzi difere daquela ocasionada por outros complexos antigênicos (Hay, 1982 ; Drayson et al.1981), inoculados pelo coxim plantar. Este fato ocorre desde que o parasita é capaz de ser disseminado através da corrente sanguínea, sendo fagocitado (Nogueira e Cohn, 1976; Nogueira et al.1980) ou penetrando ativamente (Kipnis et al.1979; Dvorak e Hyde, 1973) nestas células e aí proliferando. Este período pré-patente e sua liberação tardia na circulação explica o exacerbamento dos níveis proliferativos celulares, entre o 10º e 15º dias, nas 3 linhagens estudadas.

Nos camundongos da linhagem CBA/J, a relação positiva entre o aumento de peso e o número de células (Figura 9a e 11a) sugere que as alterações de peso no gânglio drenante se deve principalmente à retenção de células do "pool" recirculante ou provenientes de proliferação celular local. Esta mesma relação observada nos gânglios contralaterais, (Figura 9b e 11c), embora menos intensa sugere que o parasita

recruta um número menor de células neste local e este, provavelmente, ocorre no período em que os seus níveis são mais elevados no sangue.

A análise dos resultados em camundongos C57Bl/10 (Figura 10 e 11b) e F1(C57Bl/10 X CBA/J) (Figura 8 e 11c), no entanto, sugerem que a elevação do peso dos gânglios de drenagem, nestas linhagens, não está exclusivamente relacionada com o aumento no número de células, ocorrendo provavelmente um acúmulo de produtos celulares provenientes de macrófagos e linfócitos. Nos gânglios contralaterais, os resultados sugerem um menor acúmulo de células (Figura 8, 10 e 11).

Em resumo, podemos concluir que em gânglios poplíteos de camundongos resistentes, após recrutamento e proliferação celular local, ocorre um maior acúmulo de produtos celulares do que o observado em linhagem susceptível à infecção.

Como tem sido descrito que liberação de imunoglobulinas na corrente sanguínea se dá alguns dias após a expansão máxima de clones de linfócitos (White, 1967) é provável que o acúmulo destes produtos, além dos produzidos por linfócitos T e macrófagos, sejam os responsáveis pelo aumento de peso após o ápice no número de células, observado em linhagens resistentes.

Além disso, reforçam nossos dados, trabalhos "in vitro" com linhagem susceptível, que demonstram a redução dos níveis de linfocinas e na velocidade de resposta de células esplênicas imune ao parasita (Nogueira et al. 1981), em

bora atinjam níveis idênticos aos de animais resistentes em fases tardias da infecção. (Krassner et al. 1982).

Analisando a população de macrófagos durante a infecção pelo T. cruzi foi evidente que estas células, nos gânglios poplíteos, não sofrem parasitismo evidente como tem sido observado em macrófagos do baço, fígado e medula óssea (Melo e Brener, 1978). Estes dados vão de encontro aos de Deutschländer e colaboradores (1978) que não observaram parasitas em gânglios ilíacos, após inoculação subcutânea, pelo coxim plantar. Oliveira (1982) também não encontrou formas do parasita em gânglios mesentéricos, após inoculação intraperitoneal, confirmando nossa hipótese de não adaptação do parasita às células macrofágicas dos gânglios linfáticos, independentemente da via de inoculação e do número de parasitas.

Estas considerações sugerem que as células macrofágicas de gânglio poplíteo são fisiologicamente distintas daquelas encontradas no baço, fígado e medula, não permitindo a proliferação dos parasitas (comunicação pessoal - J. Kloetzel) ou não havendo, nestas células, receptores de superfície que favoreçam o tropismo do parasita (Alcântara e Brener, 1978).

Embora estas células tenham papel importante na contenção dos níveis parasitêmicos (Kierszenbaum et al. 1974; Trischmann et al. 1978), nossas observações não demonstraram alterações quantitativas nesta população celular. As reduções percentuais não significativas das células macrofágicas, observada em algumas linhagens, provavelmente se devem à diluição destas células durante a expansão dos linfócitos e

não à sua redução real . A manutenção do número de macrófagos nos gânglios linfáticos drenantes pode ser explicada pela rara proliferação local destas células em respostas inflamatórias . (Weir,1984)

Tem sido descrito que a população macrofágica , que varia de 5 a 15%,em gânglios linfáticos é extremamente heterogênea,envolvendo células acessórias,com diferentes características citológicas,antigênicas,atividade endocítica e de adesão. (Steinman e Cohn ,1974;Veldman,1970;Silberberg - Sinakin e Thorbecke,1980; Tew et al.1982).

Estas células acessórias não foram distinguidas dos macrófagos,no presente trabalho,desde que são de morfologia complexa (Schnezlein et al.1985;Szakal et al.1985),sendo facilmente destruídas em técnicas de suspensões celulares simples. Além disso,estas não proliferam rapidamente e nem sofrem aumento considerável após estimulação antigênica (Steinman e Cohn,1974),não comprometendo nossos resultados.

Na infecção pelo T. cruzi,em camundongos suscetíveis (C3H/He) e resistentes (C57Bl/6), Tarleton e Kuhn (1983) observaram elevação de seis vezes o número normal de macrófagos no baço. Este fato pode ser explicado desde que no baço ocorre o estabelecimento de formas amastigota enquanto que nos gânglios o mesmo não é observado. Isto sugere que o recrutamento de macrófagos pode ocorrer apenas onde os parasitas se estabelecem. Esta hipótese é reafirmada pelo fato de ocorrerem alterações na proporção de células esterase -não específica apenas no baço,embora após a inoculação

intraperitoneal o primeiro contato se deu com células desta cavidade (Wirth e Kierszenbaum, 1984).

Apesar de nossas observações não terem sido dirigidas a alterações fisiológicas destas células, não podemos descartar a possibilidade destas ocorrerem a nível de diferenciação e maturação, como tem sido observado em células do baço, sangue e peritônio (Wirth e Kierszenbaum, 1984). Uma das mais significativas alterações tem sido o aumento de células Ia+ (Behbehani et al. 1981; Wirth e Kierszenbaum, 1984) durante as fases aguda e crônica da infecção, que em associação com antígenos ativam linfócitos T resultando na secreção de fatores regulatórios da resposta imune (Norcross, 1984; McDevitt, 1984).

Em nosso trabalho, o envolvimento de linfócitos T na infecção pelo T. cruzi, foi evidenciado, tanto nas linhagens susceptíveis quanto nas resistentes através de seu aumento numérico, principalmente durante a fase aguda. Desde que as infecções estimulam no hospedeiro uma resposta imune primária, os linfócitos T são provavelmente, na sua grande maioria, oriundos do "pool" recirculante (Ford, 1975).

Analisando-se particularmente os linfócitos T, em cada linhagem, sugere-se que os camundongos F1 (C57Bl/10XCBA/J) apresentam os seus níveis semelhantes àqueles da linhagem parental susceptível - CBA/J - havendo um maior recrutamento destas células, na infecção, quando comparado com a linhagem resistente - C57Bl/10 (Figuras 17 e 20).

Estes resultados podem sugerir que os camundon-

gos F1(C57Bl/10 X CBA/J) se comportam de maneira semelhante aos da linhagem parental CBA/J ,em relação aos níveis de linfócitos T. É interessante notar , neste sentido, que camundongos normais da linhagem CBA/J apresentam um percentual de linfócitos T maior que aquele observado em camundongos da linhagem C57Bl/10 e da F1(C57Bl/10 X CBA/J), nas mesmas condições.

A sugestão de que os linfócitos T possam participar da resposta imune ao parasita foi evidenciada através do aumento dos níveis parasitêmicos em camundongos da linhagem CBA/J, após inoculação de soro anti-linfócito T (dados não apresentados). Uma vez que o antisoro foi produzido com células de camundongos CBA/J e não foi absorvido, existe a possibilidade de uma ação supressora ter ocorrido sobre outras populações celulares ,na linhagem homóloga. Estudos mais detalhados utilizando-se o soro absorvido e em diferentes dosagens poderão tornar mais clara a atividade deste antisoro sobre a resposta nestas três linhagens.

Apesar de recentemente ter sido descrita a existência de um fator estimulatório derivado de plaquetas, em soros normais humanos e de camundongos, que atuaria no aumento da resposta de células T (Katz et al.1985), os nossos controles (dados não apresentados) utilizando soro normal de coelho não sugerem indícios de que este processo estaria ocorrendo. Este fato pode ser explicado pela menor atividade deste fator em animais não -imunossuprimidos (Katz et al. 1985), pela diferença entre as vias e período de inóculo do

soro normal ou pela inexistência deste fator no soro de coelho.

Nossas observações de que há um envolvimento de linfócitos T no início da infecção vai de encontro aos resultados obtidos por outros autores que também evidenciaram um aumento nos níveis parasitêmicos e na mortalidade de camundongos congenitamente atímicos (Trischmann et al.1978 ; Kierszenbaum e Pienkowski,1979) ou após administração de soro anti-linfócito T (Roberson e Hanson,1973;Vilches et al.1973) ou timentomia (Behbehani,1971;Schmunis et al.1971). No entanto, apenas linfócitos T de animais sobreviventes da fase aguda são ativos na proteção contra a infecção. (Kuhn e Durum,1975; Burgess e Hanson ,1979; Reed,1980 ;Corsini e Stellini Jr,1980; Trischmann ,1984)

As alterações dos níveis de linfócitos T ,tanto em linhagens resistentes quanto em susceptível,indicam que estas ocorrem antes da liberação dos parasitas ,tornando-se acentuada mesmo quando estes se apresentam em baixo número na circulação. Estes dados sugerem que o parasita é um potente estimulador de linfócitos T,sendo isto mais evidente nos camundongos da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J) que atingem um número máximo de linfócitos T,no 10º dia de infecção. Nas duas outras linhagens,embora o número máximo não tenha sido atingido no 10º dia,as alterações até o 15º dia não foram exacerbadas ,reafirmando um maior estímulo de linfócitos T anterior à liberação máxima dos parasitas na circulação.

As diferenças quantitativas na população total de linfócitos T entre as linhagens estudadas, no presente trabalho, não permitem concluir que estas possam estar relacionadas com o grau de resistência /susceptibilidade.

No entanto, nossos dados apoiam a hipótese da participação de linfócitos T na contenção dos níveis parasitêmicos no período inicial de fase aguda, reduzindo a dose infectiva do parasita até a resposta humoral ser montada, como proposto por alguns autores (Corsini et al. 1980b; Trischmann, 1983 e 1984).

A participação dos linfócitos T, mesmo em animais susceptíveis, é corroborada pelo fato de que nestes há um controle dos níveis parasitêmicos no início da fase aguda enquanto que em camundongos nu/nu (Trischmann et al. 1978) e BXH - 2 (Trischmann, 1983) o mesmo não ocorre.

Os mecanismos pelos quais as subpopulações de linfócitos T atuariam neste período da infecção não tem sido estabelecidos mas é sugerida a participação de linfócitos T citotóxicos contra formas do parasita (Burgess e Hanson, 1979; Kierszenbaum, 1979; Ribeiro dos Santos e Hudson, 1980). Esta possível atuação citotóxica tem sido observada "in vitro" em células esplênicas na ausência de soro imune (Okabe et al. 1980).

Apesar da metodologia empregada, em nosso trabalho não permitir a caracterização de subpopulações de linfócitos T, observamos em camundongos normais e infectados a

existência de dois tipos de marcação que podem representar duas populações de linfócitos T.

Estes dois tipos de marcação sugerem graus diferentes de maturação destas células, que é habitualmente correlacionada à expressão do antígeno de membrana - Thy 1.2 . Este antígeno é encontrado em maior densidade sobre a superfície de células tímicas, sofrendo uma gradativa diminuição de sua expressão à medida que estas migram para a periferia. (Fathmann et al.1975).

Dentro deste contexto, a maioria dos linfócitos T recrutados, durante a infecção e que apresentam marcação do tipo "capping" poderiam ser linfócitos T maduros, do "pool" recirculante, com menor densidade de Thy 1.2 e maior expressão de Lyt (Ledbetter et al.1980). Estes dados são confirmados pelo mesmo tipo de marcação em anel observado na maioria das células tímicas. (dados não apresentados)

A proliferação destas células tímicas e sua migração para órgãos linfóides secundários, após administração de antígeno, tem sido descrita em outros modelos experimentais mas ainda é desconhecido o estímulo sistêmico que possa induzir tal fenômeno (Durkin et al.1978). Estas células tímicas de fenótipo Ly 1,2,3+ são descritas como precursoras de células T supressoras que requerem células T auxiliares para se diferenciarem totalmente (Anderson et al.1982).

Nas três linhagens estudadas, a observação de um pico de linfócitos T anterior ou concomitante ao aumento má

ximo do número de linfócitos B sugere que dentre a população de linfócitos T poderia existir uma grande proporção de linfócitos T auxiliares.

A atuação de linfócitos T auxiliares tem sido confirmada pela redução da resposta imune humoral ao parasita após depleção de linfócitos T (Trischmann e Bloom, 1980; Scott, 1981 b). A existência destas células T auxiliares específicas para T. cruzi tem sido evidenciada principalmente no 10º dia de infecção. (Burgess et al. 1981).

Neste presente trabalho, tanto em animais normais quanto em infectados, nas três linhagens, foram também evidenciados dois tipos de marcação de populações de linfócitos B.

Na literatura, diferentes tipos de marcação detectados através de imunofluorescência, inicialmente, foram descritos como artefato da técnica (Pernis et al. 1971). No entanto, mais recentemente, diferentes densidades de imunoglobulinas de superfície tem sido observadas e correlacionadas com graus de maturidade dos linfócitos B (Sidman e Unanue, 1975).

Como observado em nosso trabalho, alguns autores tem descrito em baço de camundongos, células com imunoglobulinas distribuídas de maneira restrita, em forma de "capping" ou integralmente por toda a superfície da membrana, sugerindo funções distintas, durante a resposta imune, para estes dois tipos de linfócitos B. (Mason et al. 1977; Mason et al. 1980) Outros autores, embora não tenham estudado a distribui

ção de imunoglobulinas sobre a superfície de linfócitos B tem correlacionado a menor densidade destas imunoglobulinas à maturidade celular (Sidman e Unanue, 1975; Scher et al. 1976).

Mais recentemente, McKearn e Rosenberg (1985) tem descrito que células pré-B possuem imunoglobulina citoplasmática, enquanto que células B imaturas teriam grande densidade de imunoglobulina de superfície, tendendo esta a se reduzir com a maturação. Por outro lado, correlação de maturidade com densidade intermediária a alta de imunoglobulina de superfície também tem sido sugerida por Dighiero et al. 1980.

Estas hipóteses contraditórias tem sido correlacionadas aos diferentes padrões genéticos das linhagens estudadas (Dighiero et al. 1980), no entanto, nossas observações não sugerem diferenças significativas que possam ser vinculadas a este fator, pois as três linhagens apresentaram diferenças proporcionais semelhantes das duas populações.

Dentro deste contexto, sugerimos que os linfócitos B, com marcação em "capping" poderiam ser células maduras, constituindo a maioria da população, antes ou durante a infecção, enquanto que as células com maior densidade de imunoglobulina de superfície seriam células B imaturas ou pré-B, que não apresentaram variações significativas durante o período estudado. No entanto, nossos resultados não permitem afirmar que a população de células com maior densidade de imunoglobulina é composta de imunoglobulina somente de superfície ou também de citoplasma.

Quando foi analisada a cinética de linfócitos B totais, os resultados sugeriram que até o 10º dia de infecção, período que antecede a liberação de um grande número de parasitas na circulação, não ocorre aparentemente distinção entre os níveis destas células em linhagens resistentes e susceptíveis. Após este período, o pequeno aumento no número de células B, em linhagens resistentes comparado com os níveis mais elevados, destas células, em linhagem susceptível sugere que, frente ao mesmo estímulo, ocorrem diferentes graus de resposta.

De acordo com estes dados, uma das hipóteses a ser considerada seria a de que em linhagem susceptível haveria uma deficiência nos mecanismos relacionados aos linfócitos T, o que induziria uma maior liberação de parasitas na corrente circulatória, havendo uma maior ativação da população de células produtoras de imunoglobulinas. Este fato é corroborado pela produção de linfócitos T citotóxicos em períodos tardios (15º dia) na linhagem BALB/c, quando seria esperado que estas células fossem ativas em fase anterior à liberação máxima de parasitas na circulação (Ribeiro dos Santos e Hudson, 1980)

Outra hipótese seria a de que, em linhagem susceptível, ocorreria uma maior ativação de células produtoras de imunoglobulinas sem, no entanto, função anticorpo.

Esta idéia é sugerida pela descrição de que, em camundongos das linhagens CBA/J e C3H/He, há um retardo no aparecimento de células produtoras de anticorpos a partir

de células produtoras de imunoglobulinas. (Kovatchev et al . 1983), durante a resposta imune a diversas proteínas, quando comparado com os camundongos da linhagem C57Bl/6.

Na infecção pelo T. cruzi, esta idéia é reafirmada pelo fato de que a susceptibilidade de camundongos "maus respondedores" (Braz, 1981) e C3H/He (Tarleton e Kuhn , 1983) não está relacionada à ausência da resposta humoral mas aos baixos níveis de anticorpos e ao retardo na sua produção. (Braz , 1981) Em camundongos C3H/He, este retardo na produção de anticorpos tem sido correlacionado aos altos níveis de anticorpos naturais, quando comparados com os camundongos C57Bl/6 (Tarleton e Kuhn, 1983).

No entanto, apesar da sugestão de um baixo nível de anticorpos presentes em linhagens susceptíveis, há evidências de sua atuação pela queda dos níveis parasitêmicos como observado em linhagens resistentes (Corsini et al. 1980a).

Esta possível proliferação de um grande número de células produtoras de imunoglobulinas sem função anticorpo vai de encontro às observações de ativação policlonal de linfócitos B (Ortiz-Ortiz, 1980; Lima et al. 1985) descrita em linhagens susceptíveis - A/J e C3H/He - apesar desta não ocorrer de forma tão evidente como na tripanossomíase africana (Corsini et al. 1977; Pearson et al. 1978). Esta ativação policlonal na infecção pelo T. cruzi tem sido descrita como dependente de célula T auxiliar associada à capacidade mitogênica do parasita (Lima et al. 1985).

Outra hipótese a ser considerada para explicar os altos níveis de linfócitos B, em linhagem susceptível po-

de ser sugerida pelas diferenças encontradas na relação entre linfócitos B e células T marcadas em anel, no período de transição entre fase aguda e crônica, nas três linhagens.

Apesar de não ter sido realizado um estudo das subpopulações de linfócitos T, durante a infecção, a observação de que o declínio de linfócitos B coincide com o aumento de linfócitos T com marcação em anel (provavelmente células recém-recrutadas do timo), na linhagem F1 (C57B1/10 X CBA/J), vai de encontro à descrição de que células tímicas, de caráter supressor, tendem a aumentar até o término da resposta imune (Anderson et al. 1982)

Em camundongos susceptíveis- CBA/J- a diminuição destas células tímicas coincidentes com os maiores níveis de linfócitos B, confirmam estas idéias e sugerem uma deficiência a nível de recrutamento de timócitos para o gânglio de drenagem. Este provável desequilíbrio sugerido nos camundongos susceptíveis, apesar de reestabelecido no final da fase aguda, não seria suficiente para eliminar as consequências do processo anterior.

A deficiência de pelo menos uma subpopulação de linfócitos T em linhagem susceptível, tem sido sugerida desde que resposta de hipersensibilidade retardada (DTH) em camundongos da linhagem C3H/He, durante a infecção, encontra-se exacerbada enquanto que em F1 (C57B1/10 X CBA/J) esta é normal (Corsini et al. 1980)

A diminuição de células recém-recrutadas do ti

mo em camundongos C57Bl/10 e o controle da fase aguda, nestes animais, sugere que outras subpopulações de linfócitos T ou de outras células supressoras possam estar envolvidas neste processo de supressão.

Neste sentido, tem sido descrita a atuação de macrófagos supressores (Odaly et al. 1984; Rowland e Kuhn, 1978), substâncias séricas supressoras (Cunningham et al. 1978; Cunningham et al. 1980 a e b) além dos linfócitos T supressores (Ramos et al. 1979).

Alguns autores tem atribuído a supressão de respostas mitogênicas de linfócitos T, em camundongos resistentes à infecção - C57Bl/10 e F1 (C57Bl/10 X CBA/J) - à células T supressoras, enquanto que em camundongos susceptíveis - C3H/He - o mesmo não ocorre, sendo descrito um bloqueio metabólico destas células, induzido pelo parasita (Lalonde et al. 1985).

De acordo com estas observações sugerimos que os camundongos da linhagens susceptíveis seriam mais sensíveis aos processos imunopatológicos produzidos pelas imunoglobulinas, dada à sua resposta imune humoral mais exacerbada. Nas linhagens resistentes a ocorrência dos mesmos processos não é descartada mas pelo fato da resposta não se apresentar tão acentuada, estes ocorreriam em menor intensidade e em períodos posteriores, proporcionando ao animal condições de manter em equilíbrio seu organismo, durante a fase aguda.

Confirmam esta hipótese trabalhos "in vivo", que tem demonstrado ,em camundongos C57Bl/10, a perda de neurônios cardíacos concomitante ao pico parasitêmico e à presença de anticorpos anti-T. cruzi e complemento sobre fibras musculares ,ao redor de ninhos do parasita (Ribeiro dos Santos e Hudson,1981).

Estes fatos sugerem a ocorrência de processos imunopatológicos desencadeados pela lise de tripomastigotas na presença se anticorpos e complemento (Krettli et al.1979) e à ruptura de pseudocistos com desintegração de amastigotas (Köberle,1968),com posterior adsorção de antígenos parasitários à células hospedeiras. Estas seriam destruídas por citotoxicidade mediada por granulócitos ou por lise mediada por anticorpos (Ribeiro dos Santos e Hudson,1980;Lopez et al.1983)

Em contraste com os resultados por nós descrito em gânglio poplíteo,alguns autores tem descrito,em baço de camundongos CBA/J a depleção porcentual e absoluta de linfócitos T com concomitante aumento de linfócitos B,após inoculação de cepa reticulotrópica,no caso Tulahuen (Hayes e Kierszenbaum,1981;Kierszenbaum e Budzko,1982).Com cepa miotrópica - Brazil- Tarleton e Kuhn (1983) tem observado,em baço de camundongos de linhagens resistentes e susceptíveis, que a população de linfócitos T mantém -se inalterada enquanto que ocorre uma redução absoluta de linfócitos B.

Em termos porcentuais,nossos resultados de depleção porcentual de linfócitos T ,mais acentuada no gân -

glio de drenagem de camundongos das linhagens Fl(C57Bl/10 X CBA/J) e CBA/J, coincide com os dados de outros autores mas, na realidade, reflete não uma redução real nesta população mas um aumento proporcional dos linfócitos B, frente ao estímulo do parasita.

As nossas hipóteses sobre a interrelação células B e T são apenas especulativas. Em trabalho futuro pretendemos abordá-las, com técnicas específicas, numa tentativa de elucidar melhor estes pontos.

Estes resultados controversos sugerem a existência de diferenças nos níveis de resposta dependendo da via de inoculação, da cepa do parasita e dos órgãos linfóides diretamente relacionados com este primeiro contato parasita-hospedeiro. Outra hipótese, menos provável, seria a de uma dicotomia da resposta imune em diferentes órgãos linfóides descrita por Burgess e Hanson (1979).

Em resumo, este trabalho procurou elucidar alguns aspectos importantes da relação entre as populações celulares induzidas pela infecção e a resistência/susceptibilidade existentes nestes modelos experimentais. Por outro lado, também suscitou algumas questões que surgem como perspectivas de novos conhecimentos nesta área de pesquisa. Uma destas questões se refere à função das subpopulações de linfócitos T na regulação da resposta imune ao T. cruzi e a outra se refere às possíveis diferenças entre as imunoglobulinas produzidas pelas três linhagens de diferentes graus de resistência à infecção.

No entanto, muito ainda nos resta a conhecer acerca dos mecanismos de interação entre o T. cruzi e seus hospedeiros, apesar de quase 80 anos de pesquisa básica em Doença de Chagas e toda a sofisticação alcançada pelas técnicas disponíveis. É preciso ao mesmo tempo, considerar que este processo de interação encontra-se em plena evolução, e em nosso país, esta ocorre dentro de um contexto social, onde a maior pressão ambiental é a precariedade dos sistemas de habitação, sanitário e educacional.

RESUMO E CONCLUSÕES

O presente trabalho teve como principal objetivo a análise das alterações nas populações celulares de gânglios poplíteos induzidas durante infecção pelo T.cruzi e sua relação com os diferentes graus de resistência/susceptibilidade das linhagens isogênicas de camundongos . O objetivo secundário foi a adaptação, às nossas condições, de uma metodologia sensível para a detecção das populações de linfócitos T e B.

As principais conclusões de trabalho estão abaixo relacionadas.

- A obtenção do complexo PAP, em nosso laboratório, permitiu a padronização de uma técnica mais sensível, com a utilização de altas diluições dos soros anti-linfócito T e anti-imunoglobulinas e a conseqüente redução de reações inespecíficas. O soro anti-linfócito T produzido evidenciou células T com diferentes distribuições do antígeno Thyl.2, contra o qual foi produzido. O soro de coelho anti-imunoglobulinas detectou células B com diferentes padrões de distribuição de imunoglobulinas de superfície, principalmente da classe IgG e cadeias leves de outras classes de imunoglobulinas.

- As principais alterações de gânglios poplíteos, nas três linhagens, evidenciadas através do peso, número de células e proporções de linfócitos T e B foram muito mais acentuadas no gânglio de drenagem do que no contralateral.

- O aumento de peso observado em gânglios poplíteos da linhagem CBA/J ocorreu devido ao aumento no número de células recrutadas durante a infecção, enquanto que nas linhagens resistentes este aumento foi correlacionado a este fator e ao provável acúmulo de produtos celulares, induzidos pela infecção.

- As principais populações celulares recrutadas nos gânglios poplíteos, durante a infecção, foram linfócitos T e B, não ocorrendo alterações significativas na população de macrófagos, nas três linhagens estudadas.

- As alterações no número de linfócitos B, nas três linhagens foram semelhantes até o 10º dia. Entre o 10º e 15º dias, quando os níveis de parasitas no sangue tornaram-se mais elevados, as linhagens F1 (C57Bl/10 X CBA/J) e C57Bl/10 apresentaram um aumento discreto no número destas células, enquanto que na linhagem CBA/J este aumento foi mais exacerbado.

- Na linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J), o número de linfócitos T e B sofreu uma redução após a fase aguda, mantendo-se, principalmente os linfócitos B, em níveis elevados até o 45º dia de infecção.

- Durante a fase aguda, principalmente no gânglio de drenagem da linhagem F1 (C57Bl/10 X CBA/J), foi observado um aumento no percentual de linfócitos T com distribuição em anel do antígeno Thy 1,2, provavelmente recém-recrutados do timo, enquanto que nas linhagens parentais houve um declínio no número destas células.

- As reduções percentuais de linfócitos T, evidenciadas principalmente em camundongos F1 (C57Bl/10 X CBA/J) e CBA/J, não reproduziram uma redução real no número de linfócitos T mas sim um aumento proporcional de linfócitos B.

- A inoculação de 10^2 formas de T. cruzi, pelo coxim plantar, via subcutânea, demonstrou que não ocorrem alterações

significativas nos níveis parasitêmicos, no dia do pico de parasitemia e na mortalidade de camundongos das linhagens F1 (C57Bl/10 X CBA/J), C57Bl/10 e CBA/J, quando comparado com os resultados de inoculação intraperitoneal, descritos na literatura.

Como conclusão geral, podemos sugerir que , independentemente do grau de resistência/susceptibilidade, existe um recrutamento de linfócitos T e B no gânglio de drenagem nas três linhagens estudadas, embora na linhagem CBA/J, ocorra uma resposta mais exacerbada, principalmente a nível de linfócitos B.

6. BIBLIOGRAFIA

- ABRAHAMSOHN, I. A. ,BLOTTA, M. H. S. L. & CUROTTO, M. A.
Specific cutaneous hypersensitivity responses in mice
infected or immunized with Trypanosoma cruzi. Parasite
Immunol., 5: 237-48, 1983.
- ALCÂNTARA, A. & BRENER, J. The "in vitro" interaction of
Trypanosoma cruzi bloodstream forms and mouse peritoneal
macrophages. Acta Tropica, 35: 209-19, 1978
- ALVES, M. J. M. & COLLI, W. Agglutination of Trypanosoma cruzi
by concanavalin A. J.Protozool., 21: 575-78, 1974
- ANDERSON, A. O. ;ANDERSON, N. D. & WHITE, J. D. Lymphocyte
locomotion, lymphatic tissues and lymphocyte circulation
in the rat. In: SHAY, J. B. Animal models of
Immunological process . New York, Academic Press, 1982
p. 25-90
- ANDRADE, Z. A. Patologia do sistema excito-condutor do co
ração na miocardiopatia chagásica. Rev.Pathol.Trop.,
3: 367-428, 1974
- ANDREWS, N. W. & COLLI, W. Adhesion and interiorization of
Trypanosoma cruzi in mammalian cells. J.Protozool., 29:
264-69, 1982
- ARAÚJO, F. G. Immunology of Chagas' disease. I-Circulating
antigens in mice experimentally infected with Trypanosoma
cruzi. Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo., 18: 433-39, 1976

- ARAÚJO, F. G. & NUNES, R.M. B. Immunology of Chagas'disease
III- Absorption of human chagasic sera with epimastigotes
of different strains of Trypanosoma cruzi. Rev.Inst.Med.
S.Paulo., 20: 315-317, 1978
- ARAÚJO, F. G. ,NASCIMENTO, E. & MORATO, M. J. F. Immunization
and enhancement properties of the circulating of antigens of
Trypanosoma cruzi. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 72: 534
- 36, 1978
- BECKER, P. F. L. Acute accidental Chagas' disease (by trans
fusion with blood of chagasic donor). Rev.Inst.Med.Trop.
S.Paulo., 17: 187-98, 1975
- BEHBEHANI, M. K. Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi infection
in X- irradiated and in thymectomized mice. Trans.Roy.
Soc.Trop.Med.Hyg., 65: 265, 1971
- BEHBEHANI, M. K. ,PAN, S. C. & UNANUE, E. R. Marked increase
in Ia-bearing macrophages during Trypanosoma cruzi infection
Clin.Immunol.Immunopathol., 19: 190-195, 1981
- BIJOWSKY, A. T. , MILDOR, R. V. ,ABRAHAMSOHN, I. A. ,SENHORINI,
I. L. & MARIANO, M. The influence of lymphatic drainage in
experimental Trypanosoma cruzi infection. Acta Tropica.,
41: 207- 214, 1984
- BITTENCOURT, A. L. ,BARBOSA, H. S. ,SANTOS, I. & SODRÉ,
Incidência da transmissão de doença de Chagas em partos
prematuros na Maternidade Tsylla Balbino (Salvador-BA).
Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo., 14: 131-34, 1972

- BLOOM, B. R. Games parasites play: how parasites evades immune surveillance. Nature., 279: 21, 1979
- BONGERTZ, V. ,HUNGERER, K. D. & GALVÃO - CASTRO, B. Trypanosoma cruzi: circulating antigens. Mem.Inst. Oswaldo Cruz., 76: 71-82, 1978
- BRAZ, R. F. S. Resistência na infecção pelo Trypanosoma cruzi (Chagas,1909). I- A importância da resposta humoral no período pré-patente da infecção experimental em camundongos.. Tese de Mestrado. Depto. de Microbiologia e Imunologia. I.B. - UNICAMP - Campinas-S.P.,1981
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo., 4: 389-96, 1962
- BRENER, Z. & CHIARI, E. Observações sobre a fase crônica da doença de Chagas experimental no camundongo. Rev.Inst. Med.Trop.S.Paulo., 5: 128-32, 1963
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi. Ann. Trop.Med.Parasit., 59: 19-26, 1965
- BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of Trypanosoma cruzi in the blood stream of normal and immune mice. Ann.Trop.Med.Parasit., 63: 215-220, 1969
- BRENER, Z. & ANDRADE, Z. A. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Guanabara Koogan, 1979
- BRENER, Z. Immunity to Trypanosoma cruzi. Adv.Parasitol. 18: 247-91, 1980.

- BUDZKO, D. B. ,PIZZIMENTI, M. C. & KIERSZENBAUM, F. Effects of complement depletion in experimental Chagas' disease: immune lysis of virulent blood forms of Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 11: 86-91, 1975
- BURGESS, D. E. & HANSON, W. L. Adoptive transfer of protection against Trypanosoma cruzi with lymphocytes and macrophages. Infect.Immun., 25: 838-43, 1979
- BURGESS, D. E. , KUHN, R. E. & CARLSON, K. S. Induction of parasite helper T-lymphocytes during Trypanosoma cruzi infections in mice. J.Immunol., 127(5): 2092-95, 1981.
- CAMARGO, M. E. & TAKEDA, G. K. F. Diagnóstico de laboratório . In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. A. Trypanosoma cruzi e doença de Chagas. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, 1979 p.175-198
- CASTELO BRANCO, A. Z. C. L. Proteção mediada por IgG em camundongos infectados com Trypanosoma cruzi. Tese de Mestrado. Depto. de Bioquímica e Imunologia-ICB-UFMG.,1978
- CERISOLA, J. A. Chemoterapy of Chagas' disease in man. In: " Chagas' disease PAHO " Scientific Pub. nº347 p.35-47, 1977.
- CHAGAS, C. Estado atual da trypanosomiase americana. Rev. Biol.Hyg., 5: 58-64, 1934
- CHAGAS FILHO, C. Um documento histórico. Ciência e Cultura. 31(Supl.): 23-33, 1979

- CHAPMAN Jr., W. L. ,HANSON, W. L. & WARTS, V. B. The influence of gonadectomy of host on parasitemia and mortality of mice infected with Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 61(2): 213-16, 1975
- CHAVES, J. ,NASCIMENTO, O. M. ,SOUZA, H. B. W. T. ,IRULEGUI, I. & VAZ, C. C. Deposição de complexos imunes na doença de Chagas experimental. Abstracts 12- Abstracts of the VIII Meeting in Basic Research in Chagas' disease-Caxambu-M.G., 1980.
- CHESS, Q. ,ACOSTA, A. M. ,SETHI, J. K. & SANTOS-BUCH, C. A. Reversible acquisition of a host cell surface membrane antigen by Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 40(1): 299-302, 1983
- CLINTON, B. A. ,ORTIZ-ORTIZ, L. ,GARCIA, W. ,MARTINEZ, T & CAPIN, R. Trypanosoma cruzi: early responses in infected mice. Exp.Parasitol., 37: 417-25, 1975
- CORSINI, A. C. ,OLIVEIRA, O. L. P. & COSTA, M. G. Unimpairred delayed type hipersensitivity in mice infected with Trypanosoma cruzi strain Y. Z.Parasitenkd., 61: 179 - 185, 1980a.
- CORSINI, A. C. ,COSTA, M. G. ,OLIVEIRA, O. L. P. ,CAMARGO , I. J. B. & STELLINI Jr., A. Susceptibility of inbred mice to Trypanosoma cruzi strain Y. Rev.Inst.Med.Trop. S.Paulo., 22(4): 192-96, 1980b
- CORSINI, A. C. & STELLINI Jr., A. Immune T cells control Trypanosoma cruzi infections. Experientia., 37: 904-6, 1981

- CRANE, M. S.^t J. & DVORAK, J. A. Influence of monosachari-
des on the infection of vertebrates cells by Trypanosoma
cruzi and Toxoplasma gondii. Mol.Bioch.Parasitol., 5:
333-41, 1982
- CULBERTSON, J. T. & KOLODNY, M. H. Acquired immunity in
rats against Trypanosoma cruzi. J.Parasitol. 24: 83-90,
1938
- CUNNINGHAM, D. , CRAIG, W. & KUHN, R. Reduction of comple
ment levels in mice injected with Trypanosoma cruzi.
J.Parasitol. 64: 1044-49, 1978.
- CUNNINGHAM, D. S. ; BENAVIDES, G. R. & KUHN, R. E. Diffe-
rences in the regulation of humoral responses between
mice infected with Trypanosoma cruzi and mice administered
Trypanosoma cruzi-induced supressor substance. J.Immunol.
125: 2317, 1980a
- CUNNINGHAM, D. S. & KUHN, R. E. Trypanosoma cruzi-induced
supressor substance. Regulatory activity. Immunogenetics,
10: 557, 1980b
- DEUTSCHLÄNDER, N. ,VOLLERTHUN, R. & HUNGERER, K. -D. Histo-
pathology of experimental Chagas' disease in NMRI-mice a
long term study following paw infection. Tropenmed.
Parasitol., 29: 323-29, 1978
- DIGHIERO, G. ,BODEGA, E. ,MAYSNER, R. & BINET, J. L. Indivi
dual cell by cell quantitation of lymphocyte surface mem -
brane Ig in normal and CLL lymphocytes and during ontogeny
of mouse B lymphocytes by immunoperoxidase assay. Blood,
55: 93-100, 1980

- DRAYSON, M. T. ,SMITH, M. E. & FORD, W. L. The sequences of changes in blood flow and lymphocytes influx to stimulated rat lymph nodes. Immunology., 44: 125-33, 1981
- DRESSER, D. W. , TAUB, R. N. & KRAUTZ, A. R. The effect of localized injection of adjuvant material on the draining lymph nodes. II- Circulating lymphocytes. Immunology., 18: 663-70, 1970
- DURKIN, H. G. ,CARBONI, J. M. & WAKSMAN, B, H. Antigen - induced increase in migration of large cortical thymocytes (regulatory cells ?) to the marginal zone and red pulp of the spleen. J.Immunol., 121(3): 1075-81,1978.
- DVORAK, J. A. & HYDE, T. P. Trypanosoma cruzi: interaction with vertebrate cells in vitro. I- Individual interaction at cellular and subcellular levels. Exp.Parasitol.,34: 268- 83, 1973
- EY, P. L. ,PROSE, S. J. & JENKIN, C. R. Isolation of pure IgG1, IgG2a and IgG2b immunoglobulins from mouse serum using Protein A- Sepharose. Immunochemistry., 15: 429-36, 1978
- FATHMAN, C. G. ,SMALL, M. ,HERSENBERG, L. A. & WEISSMAN, I. L. Thymus cell maturation - II. Differentiation of three "mature" subclasses in vivo. Cell.Immunol.,15: 109, 1975
- FORD, W. L. Lymphocyte migration and immune response. Prog.Allergy., 19: 1-59, 1975

- GOBLE, F. C. Studies on experimental Chagas' disease in mice in relation to chemotherapeutic testing. J.Parasitol. 37: 408, 1951
- GOTTLIEB, M. A carbohydrate-containing antigen from Trypanosoma cruzi and its detection in the circulation of infected mice. J.Immunol. 119: 465-70, 1977
- GRABAR, P. & BURTIN, P. Immunoelktrophoretische Analyse. Elsevier, Amsterdam, 1964
- GUERREIRO, C. & MACHADO, A. Da reação de Bordet e Gengou na molesta de Carlos Chagas como elemento de diagnóstico. Brasil Med., 23: 225-6, 1913
- GUTMANN, G. A. & WEISSMAN, I. L. Lymphoid tissue architecture . Experimental analysis of the origin and distribution of T and B cells. Immunology., 23: 465, 1972
- HALL, J. G. & MORRIS, B. The output of cells in lymph from the popliteal node of sheep. Q. J.Exp.Physiol.Cogn.Med.Sci., 47: 360, 1962
- HALL, J. G. & MORRIS, B. The immediate effect of antigens on the output of a lymph node. Br.J.Exp.Pathol., 46: 450, 1965
- HANSON, W. L. DEVLIN, R. F. & ROBERSON, E. L. Immunoglobulins levels in a laboratory acquired case of human Chagas' disease. J.Parasitol., 60: 532-33, 1974
- HANSON, W. L. Immune response and mechanisms of resistance in Trypanosoma cruzi . In : "Chagas' disease PAHO" Scientific Publications nº 347 p. 22-34, 1977

- HAY, J. B. & CAHILL, N. P. Lymphocytes migrations patterns in sheep . In: HAY, J. B. Animals models of Immunological processes. London, Academic Press, 1982 p.97-130
- HAYES, M. M. & KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' disease: kinetics of lymphocytes responses and immunological control of the transition from acute to chronic Trypanosoma cruzi infection. Infect.Immun., 31: 1117-24, 1981
- HOARE, C. A. The trypanosomes of mammals. A zoological monograph. Oxford and Edinburgh, Blackwell Scientific Publications, 1972 p. 364
- HOFFMANN- FEZER, G. ,RODT, H. ,EULITZ, M. & THIERFELDER, S. Immunohistochemical identification of T- and B-lymphocytes delineated by the unlabeled antibody enzyme method. I- Anatomical distribution of Θ - positive and Ig-positive cells in lymphoid organs of mice. J.Immunol.Methods., 13: 261-70, 1976
- IRULEGUI, I. ,CHAVES, J. , FERRI, R. G. ,SOUZA, W. T. ,Souza, H. B. W. T. & CASTILHO, E. A. Conversion of the C₃ complement in mice infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst.Med.Trop. S.Paulo., 22: 62-68, 1980
- IRULEGUI, I. ,YAMASHIRO, E. ,CASTILHO, E. A. & BRITO, T. The complement system and the inflammatory response in experimental Chagas' disease. Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo., 24: 349-52, 1982
- KATZ, I. R. ,HOFFMANN, M. K. ,ZUCKER, M. B. ,BELL, M. K. & THORBECKE, G. J. A platelet derived immunoregulatory serum factor with T cell affinity. J.Immunol.,134(5): 3199-203, 1985

- KIERSZENBAUM, F. ,KINETCH, E. , BUDZKO, D. B. & PIZZIMENTI, M. C. Phagocytosis : a defense mechanisms against infection with Trypanosoma cruzi. J.Immunol.,112: 1839-1844, 1974
- KIERSZENBAUM , F. & HOWARD, J. G. Mechanisms of resistance against experimental Trypanosoma cruzi infection:the importance of antibodies and antibody-forming capacity in the Biozzi high and low responder mice. J. Immunol. 116 (5): 1208-11, 1976.
- KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKY, M. M. Thymus -dependent control of host defense mechanisms against Trypanosoma cruzi infection. Infect.Immun., 24: 117-20, 1979
- KIERSZENBAUM, F. Antibody-dependent killing of blood forms of Trypanosoma cruzi by human peripheral blood leucocytes. Am.J.Trop.Med.Hyg., 28: 965-68, 1979
- KIERSZENBAUM, F. & HAYES, M. M. Evaluation of lymphocytes responsiveness to polyclonal activators during acute and chronic experimental Trypanosoma cruzi infection. Amer.J.Trop.Hyg., 29(4): 708-10, 1980
- KIERSZENBAUM, F. On evasion of Trypanosoma cruzi from the host immune response. Lymphoproliferative response to trypanosomal antigen during acute and chronic experimental Chagas' disease. Immunology., 44: 641, 1981
- KIERSZENBAUM, F. ,GOTTLIEB, C. A. & BUDZKO, D. B. Antibody -independent natural resistance of birds to Trypanosoma cruzi infection. J.Parasitol., 67:656-60, 1981.

- KIERSZENBAUM, F & BUDZKO, D. B. Trypanosoma cruzi: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in absence of supressor T cells. Parasite Immunol. 4: 441-541, 1982
- KIERSZENBAUM, F. & LIMA, M. F. Susceptibility of insect-borne metacyclic forms of Trypanosoma cruzi to antibody-mediated mechanisms of destruction. Am.J.Trop.Med.Hyg., 32(6): 1236-41, 1983
- KIPNIS, T. C. ,CALICH, V. L. G. & DIAS DA SILVA, W. Active entry of bloodstream forms of Trypanosoma cruzi into macrophages. Parasitology., 78: 89-98, 1979
- KIPNIS, T. C., JAMES, S. L. ,SCHER, A. & DAVID, J. R. Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi. II - Antibody-dependent killing of bloodstream forms by mouse eosinophils and neutrophils. Am.J.Trop.Med.Hyg., 30(1): 47-53, 1981
- KLOETZEL, J. ,CAMARGO, M. E. & GIOVANNINI, V. L. Antigenic differences among epimastigotes, amastigotes and trypomastigotes of Trypanosoma cruzi. J.Protozool., 22: 259-61, 1975.
- KÖBERLE, F. & ALCÂNTARA, F. G. Mecanismos da destruição neuronal do sistema nervoso periférico na moléstia de Chagas. Hospital., 57: 1057-1062, 1960.
- KÖBERLE, F. Patologia y anatomia patológica de la enfermedad de Chagas. Bol.Ofic.Sanit.Panamer., 51: 404-28, 1961.
- KÖBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: the pathology of American trypanosomiasis. Adv.Parasitol., 6: 63- 116, 1968.

- KOLODNY, M. H. Studies on age resistance against Trypanosomes infections. III- The influence of age upon the immunological responses of rats to infection with Trypanosoma cruzi . Am.J.Hyg., 31: 1-8, 1940.
- KOVATCHEV, D. ,TERNYNCK, T. ,GUENET, J. L. & AVRAMEAS, S. Strains differences in the immune response of mice to horseradish peroxidase. Immunology., 48: 367-75, 1983.
- KRASSNER, S. M. ,GRANGER, B. ,MORROW, C. & GRANGER, G. In vitro release of lymphotoxin by spleen cells from C3H/He and C57Bl/6 mice infected with Trypanosoma cruzi. Amer.J.Trop.Med.Hyg., 31(6): 1080-89, 1982
- KRETTLI, A. U. & BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in Trypanosoma cruzi infections. J.Immunol., 116: 755-60, 1976
- KRETTLI, A. U. Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomastigotas sanguíneos de camundongos infectados com Trypanosoma cruzi. Tese- Universidade Federal de Minas Gerais. , 1978.
- KRETTLI, A. U. ,CARRINGTON, P. W.& NUSSENSWEIG, R. S. Membrane -bound antibodies of bloodstream Trypanosoma cruzi in mice: strain differences in susceptibility to complement mediated lysis. Clin.Exp.Immunol., 3: 1-8, 1979
- KRETTLI, A. U. Antibodies to Trypanosoma cruzi in experimental and human infections. Afr.J.Clin.Exp.Immunol., 3: 327-345, 1982.
- KUHN, E. & CASSIDA, G. W. Cytophilic antibodies in experimental Chagas'disease. J.Parasitol., 67(6): 807-12, 1981

- LALONDE, R. G. , ALI- KHAN, Z. & TANOWITZ, H. B. Trypanosoma cruzi: regulation of mitogenic responses during infection in genetically resistant and susceptible inbred mouse strains . Exp.Parasitol., 59: 33-43, 1985
- LAGUENS, R. P. ,MECKERT, P. C. & CELPI, R, J. Chronic Chagas' disease in the mouse. I- Eletrocardiographic and morphological patterns of cardiopathy. Medicina(B.Aires)., 41: 35-40, 1981.
- LEDBETER, J. A. ,ROUSE, R. V. ,MICKLEM, H. S. & HERSENBERGER, L. A. T cell subsets defined by expression of Ly 1,2,3 and Thy 1 antigens. Two parameters immunofluorescence and cytotoxicity analisys with monoclonal antibodies modifies current views. J.Exp. Med. , 152: 280-95, 1980
- LIMA PEREIRA, F. E. Observações sobre a imunodepressão durante a fase aguda da infecção do camundongo albino pelo Trypanosoma cruzi. Ph.D. Thesis. Un.Fed.M.G., 1978
- LIMA, M. R. D'. ,JOSKOWICZ, J. ,COUTINHO, A. KIPNIS, T. C. & EISEN, H. Very large and isotypically atypical polyclonal plaque-forming cell responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. Eur.J.Immunol., 15: 201-203, 1985
- LOPEZ, A. F. ,RIBEIRO DOS SANTOS, R. & SANDERSON, C. J. Antibody-dependent cytotoxicity of Trypanosoma cruzi antigen-coated cell lines by eosinophils and neutrophils. Parasite Immunol., 5: 77-84, 1983
- LOUREIRO, I. V. de M. Evolução da infecção experimental por Trypanosoma cruzi em camundongos passivamente imunizados. Tese de Mestrado. Depto de Microbiologia e Imunologia, UNICAMP. ,1985

- MAGARINO TORRES, C. B. Patogenia de la miocarditis cronica em "la enfermedad de Chagas"- V Reunião de la Sociedad Argentina de Patologia Regional del Norte. 2:902-16, 1929.
- MALECKAR, J. R. & KIERSZENBAUM, F. Inhibition of mitogen - induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of Trypanosoma cruzi. J.Immunol., 130: 908-11, 1983
- MASON, D. Y. ,LABAUME, S.& PREUD' HOMME, J. -L. The detection of membrane and cytoplasmic immunoglobulins in human leucocytes by immunoperoxidase staining. Clin.Exp.Immunol. 29: 413-21, 1977
- MASON, D. Y. ,LEONARD, R. C. F. ,LAURENT, G. & GOURDIN, M. F. Immunoperoxidase staining of surface and intracellular immunoglobulin in human neoplastic lymphoid cells. J Clin. Pathol., 33: 609-16, 1980.
- MARSDEN, P. D. , SEAH, S. K. ,MOTT, K. E. ,PRATA, A. & PLATT, H. Immunoglobulins in Chagas' disease. Am.J.Trop.Med.Hyg., 73: 157-61, 1970.
- McDEVITT, H. O. Speculation on how Ia-antigens (Ir genes) influence the specificity of the immune responses. Ann.Immunol. (Inst.Pasteur) 135 D (3): 227-236, 1984
- McHARDY, N. Passive immunization of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum . Tropen,Parasitol., 28: 195-201, 1977.
- McKEARN, J. P. & ROSENBERG, N. Mapping cell surface antigens on mouse pre-B cell lines. Eur.J.Immunol., 15: 295-98, 1985

- MELO, R. C. & BRENER, Z. Tissues tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J.Parasitol., 64: 475-82, 1978.
- MEYER, E. M. ,SCHLAKE, W. & GRUNDMAN, E. Comparative histologic, histochemical and histomorphometric studies of normal young BALB/c mice. Path.Res.Pract., 164: 141-56, 1979
- MILES, M. A. Trypanosoma cruzi:epidemiology. In: Perspectives in Trypanosomiasis Research" John Wiley Chichester, 1982, p.1-15
- MUNIZ, J. & FREITAS, G. Contribuição para o diagnóstico da doença de Chagas pelas reações de aglutinação e fixação do complemento. Mem.Inst.Oswaldo Cruz., 41: 303-33, 1944
- NATHAN-LARRIER, L. Infections a trypanosomes et voies de pénétration des virus. Bull.Soc.Pathol.Soc., 14: 537 , 1921.
- NERY- GUIMARÃES, F & LAGES, H. A. A refratariedade das aves ao Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi.II-A refratariedade das galinhas desde o nascimento,persistência da refratariedade após bursectomia;infecções em ovos embrioados. Mem.Inst.Oswaldo Cruz., 70: 97-107, 1972
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi: mechanisms of entry and intracellular fate in mammalian cells. J.Exp.Med., 143: 1402-20, 1976
- NOGUEIRA, N. , GORDON, S & COHN, Z. Trypanosoma cruzi:modification of macrophage function during infection. J.Exp.Med., 146: 157-71, 1977

- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi: "in vitro" induction of macrophage microbicidal activity. J.Exp.Med 148: 288-300, 1978.
- NOGUEIRA, N. ,CHAPLAN, S. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi : factors modifying ingestion and fate of blood form trypanomastigote. J.Exp.Med., 152: 447-51, 1980.
- NOGUEIRA, N. ,ELLIS, J. ,CHAPLAN, S. & 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
- NORCROSS, M. A. A synaptic basis for T-lymphocyte activation. Ann.Immunol. (Inst.Pasteur.) 135 D(2):113-31, 1984
- Nossal, G. J. V. & ADA, G. L. In: Antigens,lymphoid cells and the immune response. New York, Academic Press,1971 p. 79-82
- O'DALY, J. A. ,SIMONIS, S. ,ROLO, N. & CABALLERO, H. Suppression of humoral immunity and lymphocytes responsiveness during experimental Trypanosoma cruzi infection. Rev.Inst.Med. Trop.S.Paulo., 26 (2): 67-77, 1984
- OKABE, K. , KIPNIS, T. C. ,CALICH, V. L. G. & DIAS DA SILVA, W. Cell-mediated cytotoxicity to Trypanosoma cruzi : I -Antibody-dependent cell mediated cytotoxicity to trypanomastigote bloodstream forms. Clin.Immunol.Immunopathol. 16: 344-53, 1980.

- OLIVEIRA, O. L. P. Imunossupressão na infecção pelo Trypanosoma (Schisotrypanum) cruzi (CHagas,1909). II-Alterações em órgãos linfóides e não linfóides de camundongos (CBA/H X C57Bl/10)Fl. Tese de mestrado, Depto de Microbiologia e Imunologia- UNICAMP, 1982.
- ORTIZ_ORTIZ, L. , PARKS, D. E. , RODRIGUEZ, M. & WEIGLE, W. O. Polyclonal B lymphocyte activation during Trypanosoma cruzi infection. J.Immunol., 124(1): 121-24, 1980
- OUCHTERLONY, O. Diffusion in gel methods for immunological analysis. Prog.Allergy., 5: 78, 1958
- PEREIRA DA SILVA, C. H. & NUSSENSWEIG, V. Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin.Biol.S.Paulo., 20: 191-201, 1953
- PERNIS, B. ,TORNI, L & AMANTE, L. Immunoglobulins as cell receptors. Ann.N.Y.Acad.Sciences., 190: 420-31, 1971
- PHILLIPS, N. R. Experimental studies on the quantitative transmission of Trypanosoma cruzi: Considerations regarding the standardization of materials. Ann.Trop.Med. Parasitol., 54: 60 ,1960.
- PIZZI, T. ,AGOSTIN, M. ,CHRISTEN, R. HOECKER, G. & NEGHEME, A. Estudios sobre imunobiologia de las enfermedades parasitarias . I-Influencia de la constitucion genetica de las lauchas a la infección experimental por Trypanosoma cruzi. Bol.Inform.Parasit.Chil., 4: 48-9, 1949.
- POSTAN, M. DVORAK, J. A. & McDANIEL, J. P. Studies of Trypanosoma cruzi clones in inbred mice. I- A comparison of C3H/HEN⁻ mice with two clones isolated from a common source. Amer.J.Trop.Med.Hyg., 32(3): 497-506, 1983

- RAFF, M. C. & WORTIS, H. H. Thymus dependence of θ -bearing cells in the peripheral lymphoid tissues of mice. Immunology., 18: 931-42, 1970
- RAFF, M. C. T an B lymphocytes in mice studied by using antisera against surface antigenic markers. Am.J.Pathol. 65: 467- 78, 1971
- RAMOS, C. , LAMOYI, E. ,FEOLI, M. RODRIGUEZ, M. ,PEREZ, M.& ORTIZ-ORTIZ, L. Trypanosoma cruzi: immunosuppressed response to different antigens in the infected mice. Exp. Parasitol., 45: 109-99, 1978
- RAMOS, C, , SCHÄDTLER-SIWON, I. & ORTIZ-ORTIZ, L. Supres- sor cells present in the spleens of Trypanosoma cruzi-in- fected mice. J.Immunol., 122(4): 1243-47, 1979
- RANGEL, H. A. ,ARAÚJO, P. M. F. ,CAMARGO, I. J. B. ,BONFITTO, M. ,REPKA, D. ,SAKURADA, J. K. & ATTA, A. M. Detection of a proteinase common to epimastigote, trypomastigote and amastigote of different strain of Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasit., 32: 87-92, 1981
- RAVELLI, S. S. , AMERIO; N. , VALENTI, H. S. ,BALBERREY, H. & MORINI, J. Enfermedad de Chagas' cronica en la rata. Caracteristicas serológicas, electrocardiográficas e histo- patologicas. Medicina (B. Aires) 40: 69-76, 1980.
- REED, S. G. ,LARSON, C. L. & SPEER, C. A. Supression of cell-mediated immunity in experimental Chagas'disease. Z.Parasitenkd. , 52: 11-7, 1977

- REED, S. G. ,LARSON, C. L. & SPEER, C. A. Contact sensitivity responses in mice infected with Trypanosoma cruzi. Infect.Immun., 22(2): 548-54, 1978
- REED, S. G. Adoptive transfer of resistance to acute Trypanosoma cruzi infection with T-lymphocyte enriched spleen cells. Infect.Immun., 28(2):404-10, 1980
- REED, S. G. ,DOUGLAS, I. G. & SPEER, C. A. Surface interactions between macrophages and Trypanosoma cruzi. Amer. J.Trop.Med.Hyg., 31(4): 723-29, 1982
- REPKA, D. , CAMARGO, I. J. B. ,SANTANA, E. M. ,CUNHA , W.M. T. ,de SOUZA, O. C. ,SAKURADA, J. K. & RANGEL, H. A. Surface antigenic determinants of epimastigote forms common to trypomastigote and amastigote forms of different strains of Trypanosoma cruzi. Tropenmed.Parasit., 31: 239- 46, 1980.
- RIBEIRO DOS SANTOS,R. & HUDSON, L. Trypanosoma cruzi:binding of parasite antigens to mammalian cell membranes. Parasite Immunol., 2(1): 1-10, 1980.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. & HUDSON, L. Denervation and the immune response in mice infected with Trypanosoma cruzi. Clin.Exp.Immunol., 44: 349-54 , 1981
- ROBERSON, E. L. & HANSON, W. L. Trypanosoma cruzi:effects of anti-thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. Exp.Parasitol., 34: 168-80, 1973

- RODT, H. ,THIERFELDER, S & EULITZ, M. Anti-lymphocytic antibodies and marrow transplantation . III- Effect of heterologous anti-brain antibodies on acute secondary disease in mice. Eur.J.Immunol., 4: 25-9, 1974
- 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, 1983.
- ROWLAND, E. C. & KUHN, R. E. Suppression of cellular responses in mice during Trypanosoma cruzi infection. Infect.Immun., 20(2): 393-97, 1978
- ROWLEY, D. A. , GOWANS, J. L. ,ATKINS, R. C. FORD, W. L. & SMITH, M. E. The specific selection of recirculating lymphocytes by antigens in normal and pre-immunized rats. J.Exp.Med., 136: 499, 1972
- SADIGURSKY, M. , ACOSTA, A. M. & SANTOS_BUCH, C. A. Muscle sarcoplasmic reticulum antigen shared by a Trypanosoma cruzi clone. Am.J.Trop.Med.Hyg., 31: 934, 1982
- SANTOS- BUCH, C . A. American trypanosomiasis:Chagas'disease. Int.Rev.Exp.Pathol., 19: 63, 1979.
- SASSEN, & PLATSE, F. V. Detection and spontaneous alteration of lymphocytes antigen on slide smears. Med.Microbiol.Immunol., 168: 129-37, 1980
- SCHER, I. ,SHARROW, S. O. ,WISTARJE, R. ASOFSKY, R. & PAUL, W. E. B- lymphocyte heterogeneity:ontogenetic development and organ distribution of B-populations defined by their density of surface immunoglobulin. J.Exp.Med.,114: 494-506, 1976.

- SCHMUNIS, G. H. ,GONZALEZ- CAPPA, S. M. ,TRAVERSA, O. C. & YANOVSKY, J. The effect of immunodepression due to neonatal thymectomy on infections with Trypanosoma cruzi in mice. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 65: 89-94, 1971
- SCHNEZLEIN, C. T. ,KOSCO, M. H. ,SZAKAL, A. K. & TEW, J. G. Follicular dendritic cells in suspension: identification, enrichment and initial characterization indicating immune complex trapping and lack of adherence and phagocytic activity. J.Immunol., 134(3): 1360-68, 1985
-
- SCORZA, C. & SCORZA, J. Acute myocarditis in rats inoculated with Trypanosoma cruzi: study of animals sacrificed between the fourth and twenty-ninethy day after inoculation. Rev.Inst.Med.Trop.S.Paulo., 14: 171-77, 1972
- SCOTT, M. T. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice: specific supressor cells in chronic infection. Immunology., 44: 409-17, 1981 a
- SCOTT, M. T. The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection. Parasite Immunol., 3: 209-18, 1981b.
- SCOTT, M. T. & MOYES, L. ⁷⁵Se- methionine labelled Trypanosoma cruzi blood trypomastigote:opsonization by chronic infection serum facilitates killing in spleen and liver. Clin. Exp.Immunol., 48:754-57, 1982
- SEAH, S. Delayed hypersensitivity in Trypanosoma cruzi infection. Nature., 225: 1256-57, 1970.

- SEAH, S. K. , MARSDEN, P. D. ,VOLLER, A. & PETTITT, L. E.
Experimental Trypanosoma cruzi infection in Rhesus monkeys: the acute phase. Trans.Roy.Soc.Trop.Med.Hyg., 68: 63-9, 1974.
- SHERLOCK, I. A. Parasitemia constante durante 24 horas consecutivas na infecção experimental por Trypanosoma cruzi. Rev.Soc.Bras,Med.Trop., 17: 137-144, 1984
- SIDMAN, c. L. & UNANUE, E. R. Development of B-lymphocytes I- Cell populations and a critical event during ontogeny. J. Immunol., 114(6): 1730-35, 1975
- SILBERBERGER- SINAKIN, I. & THORBECKE, G. F. The Langerhans cell. In: "The Reticuloendothelial System. A comprehensive treatise. N.York, Plenum Press, 1980 p.555.
- SOUTO- PADRÓN, T, CARVALHO, T. V. CHIARI, E & de SOUZA, W. Further studies on the cell surface charge of Trypanosoma cruzi . Acta Tropica., 41: 215-25, 1984
- STEINMAN, R. M. & COHN, Z. A. Identification a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. III-Functional properties in vivo. J.Exp.Med., 139:1431-46, 1974.
- STERNBERGER, L. A. ,HARDY, P. H. ,CUCULIS, J. J. & MEYER, H. G. The unlabeled antibody-enzyme method of immunocytochemistry. Preparation and properties of soluble antigen - antibody complex (Horseradish peroxidase-antihorseradish peroxidase) and its use in identification of spirochetes. J.Histochem.Cytochem., 18: 315, 1970.

- STERNBERGER, L. A. The unlabeled enzyme method. In:
STERNBERGER, L. A. . "Immunochemistry" ,Prentice Hall Inc.
1974, 129-171.
- SZAKAL, A. K. ,GIERENGER, R. L. ,KOSEO, M. H. & TEW, J. G.
Isolated follicular dendritic cells:cytochemical antigen
localization ,Normarski, SEM and SEM morphology. J.
Immunol., 134(3): 1349-59, 1985
- SZARFMANN, A. , COSSIO, P. M. ,ARANA, R. M. ,URMAN, J.
KRENTZER, E. , LAGUENS, R. P. ,SEGALL, A. & COARASA, L.
Immunological and immunopathological studies in congeni-
tal Chagas' disease. Clin.Immunol.Immunopathol., 4:489
- 99, 1975
- SZARFMANN, A. , TERRANOVA, V. P. ,RENNARD, S. I. FOIDART, J.
M. , LIMA, M. F. , SCHEINMAN, I. J. & MARTIN, G. R.
Antibodies to laminin in Chagas' disease. J.Exp.Med.,
155: 1161, 1982
- TAFURI, W. L. Alterações ultraestruturais dos componentes
muscular,intersticial e nervoso do coração,esôfago e in-
testinos na doença de Chagas experimental e humana. Tese
U. F.M.G. , 1974.
- TAMASHIRO, W. M. S. C., REPKA, D. ,SAKURADA, J. K. ,
CAMARGO, I. J- B. , ARAÚJO, P. M. F. ,ATTA, A. M. &
RANGEL, H. A. Trypanosoma cruzi: surface antigenic de-
terminants. Z.Parasitenkd., 69: 425-34, 1983
- TANOWITZ, H. B. ,MINATO, N. ,LALONDE, R & WITTNER, M.
Trypanosoma cruzi: correlation of resistance and suscep-

tibility in infected inbred mice with the "in vivo" primary antibody response to sheep red blood cells. Exp. Parasitol., 52: 233-42, 1981

TARLETON, R. L. & KUHN, R. E. Changes in cell populations and immunoglobulin-producing cells in spleen of mice infected with Trypanosoma cruzi: correlations with parasite-specific antibody response. Cell.Immunol., 80: 392-404, 1983.

TEIXEIRA, A. R. L. ,TEIXEIRA, M. L. & SANTOS- BUCH, C. A. The immunology of experimental Chagas' disease in man . IV- The production of lesions in rabbits like those of chronic Chagas' disease in man. Am.J.Pathol., 80: 163-180, 1975

TEIXEIRA, A. R. L. Immunoprophylaxis against Chagas' disease. In : Immunity to blood parasites of animals and man. N. York, Plenum ,1977 p. 243-280

TEIXEIRA, A. R. L. ,TEIXEIRA, G. ,MACEDO, V . & PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. J.Clin.Invest., 62: 1132-41, 1978

TEW, J. G. , THORBECKE, J. G. & STEINMAN, R. M. Dendritic cells in the immune response: characteristics and recommended nomenclature (a report from the Reticuloendothelial Society Committee on Nomenclature). J.Reticuloendothel.Soc. 31: 371 , 1982

- TREJOS, A. GODY, G. A. ,GREENBLAT, G & CEDILLOS, R. Effects of temperature on morphologic variation of Schizotrypanum cruzi em tissue culture. Exp.Parasitol., 13: 211-18,1963
- TRISCHMANN, T. , TANOWITZ, H. , WITTNER, M. & BLOOM, O. Trypanosoma cruzi: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. Exp.Parasitol. 45: 160-68, 1978.
- TRISCHMANN, T. M. & BLOOM, B. Trypanosoma cruzi: ability of T-cell enriched and -depleted lymphocyte population to passively protect mice. Exp.Parasitol., 49: 225-32,1980.
- TRISCHMANN, T. M. & 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(4): 1953-57, 1983.
- TRISCHMANN, T. M. Role of cellular immunity in protection against Trypanosoma cruzi in mice. Parasite Immunol., 6: 561- 70, 1984.
- TSHUDI, E. J., ANZIANO, D. F. & DALMASSO, A. P. Lymphocyte transformation in Chagas' disease. Infect.Immun., 6: 905-908, 1972
- VADAS, P. ,WASI, S. ,MOVAT, H. Z. & HAY, J. B. A novel , vasoactive product and plasminogen activation from afferent lymph cells draining chronic inflammatory lesions. Proc. Soc.Exp.Biol., 161: 82, 1979

- VADAS, P. , WASI, S. ,MOVAT, H. Z. & HAY, J. B. Extracel-
lular phospholipase A₂ mediates inflammatory hyperemia.
Nature. (London), 293: 583, 1981
- VELDMAN, J. E. Histopathology and electron microscopy of
the immune response. Acad.Thesis, Groningen The
Netherlands, 1970.
- VIANA, G. Contribuição para o estudo da anatomia patolo-
gica da "Moléstia de Carlos Chagas" (Esquizotripanoze hu-
mana ou tireoidite parasitaria). Mem.Inst.Oswaldo Cruz
3: 276-93, 1911.
- VILCHES, M. ,KATZIN, A. ,GOLFERA, H. & SCHMUNIS, G. A.
The effect of heterologous anti-thymocyte serum upon
the course of infection with Trypanosoma cruzi in mice.
Z. Tropen.Parasitol., 24: 279, 1973
- WEIR, D. M. Macrophage signal recogniton. Agents and
Actions., 15(1/2): 2-11, 1984
- WEISS, L. The Cells and Tissues of the Immune System: struc-
ture, functions ,interactions, Prentice Hall, 1972.
- WHITE, R. G. Immunological functions of lymphoreticular
tissues . In: GELL, P. G. H. & COOMBS, R. R. A. Clini-
cal Aspects of Immunological. Oxford and Edinburgh, Scien-
tific Publications, 1967, p.334-68.
- W.H.O. Immunology of Chagas' disease. Bull.W.H.O. 50:
459-472, 1974.
- WILLIAMS, D. M. & REMINGTON, J. S. Effect of human monocy-
tes and macrophages on Trypanosoma cruzi. Immunology.,
32: 19-23, 1977.

- WIRTH, D. M. & KIERSZENBAUM, F. Variations in expression of markers by populations of adherent cells from Trypanosoma cruzi-infected mice. J. Protozool., 31(1): 147-51, 1984.
- WOOD, J. N. , HUDSON, L. JESSEL, T. M. & YAMAMOTO, M. A monoclonal antibody defining antigenic determinants on subpopulations of mammalian neurons and Trypanosoma cruzi parasites. Nature., 296: 34-8, 1982
- WRIGHSTMANN, R. ,KRASSNER, S. & WATSON, J. Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Infect. Immun., 36: 637-44, 1982.
- YANOVSKY, J. F. & ALBADO, E. Humoral and cellular responses to Trypanosoma cruzi infection. J. Immunol., 109: 1159-61, 1972.
- ZATZ, M. M. & LANCE, E. M. The distribution of ⁵¹Cr - labelled lymphocytes into antigens-estimated mice. Lymphocyte trapping. J. Exp. Med., 134: 224, 1971
- ZENIAM, A & KIERSZENBAUM, F. Trypanosoma cruzi: differences in cell surface interaction of circulating (Trypomastigote) and culture (epimastigote) forms with macrophages. J. Parasitol., 69(4): 660-65, 1983.