


IVANA VIEIRA DE MELLO LOUREIRO <sup>MT</sup>

Este exemplar corresponde a Redação final da Tese defendida pela Sra. Ivana Vieira de Mello Loureiro e aprovada pela Comissão julgadora.

Campinas, 21/3/85

  
Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para a obtenção do Título de Mestre em Imunologia

EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL POR  
TRYPANOSOMA CRUZI EM CAMUNDONGOS PASSIVAMENTE  
IMUNIZADOS

ORIENTADOR: PROF. DR. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL

CAMPINAS

1985

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

Ao leitor

... são comparáveis à aranha, que  
edifica uma casa.

Alcorão, XXIX, 40.

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

1. A Universidade Federal do Espírito Santo pela oportunidade de crescimento profissional.
2. Ao Biotério Central da UNICAMP pelo fornecimento dos camundongos e em especial aos grandes amigos Denise Vaz Macedo e José Augusto R. Barbosa pela seriedade profissional e alegria de viver, que lhes é peculiar, com que me apoiaram a concluir este trabalho.
3. Ao Laboratório de Estatística da UNICAMP pela realização da análise estatística e em especial ao Prof. Sebastião Amorim cuja orientação inovou os métodos estatísticos utilizados e reinterpreto os resultados.
4. A Regina Célia N. Almadovar, Luís Aparecido Milan e José Roberto Zorzatto, alunos da Pós-Graduação da Estatística, sem os quais a realização das análises e programas computacionais não teriam sido possíveis.
5. À Professora Daria Repka pelo apoio em momentos muito difíceis.
6. Aos Professores Débora Queiroz Tavares e Fausto Edmundo Lima Pereira pela valiosa ajuda na análise dos cortes histológicos.

7. Aos Professores e colegas do curso de Pós-Graduação da UNICAMP pela convivência proporcionada.
8. Ao Persival, pela colaboração na correção deste trabalho.
9. À Elenir Aparecida Rezende e Wanda Ligia Siqueira pelo excelente trabalho de datilografia do texto. À Sueli Ferreira de Bem pelos desenhos e amizade.

S U M Á R I O

1.	INTRODUÇÃO . . . . .	1
2.	MATERIAL E MÉTODOS . . . . .	20
	2.1. ANIMAIS . . . . .	20
	2.2. <u>Trypanosoma cruzi</u> . . . . .	21
	2.3. DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE TRIPOMASTIGOTAS . . . . .	21
	2.4. INOCULAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM TRIPOMASTOGOTAS SAN- GUÍNEAS . . . . .	21
	2.5. DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE PARASITEMIA . . . . .	22
	2.6. OBTENÇÃO DE SORO ANTI- <u>Trypanosoma cruzi</u> . . . . .	22
	2.7. DELINEAMENTO EXPERIMENTAL . . . . .	23
	2.8. ANÁLISE ESTATÍSTICA . . . . .	23
	2.9. PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS . . . . .	23
3.	RESULTADOS . . . . .	25
	3.1. RELAÇÃO ENTRE DOSE DE PARASITAS INOCULADA E TEMPO DE APARECIMENTO DO PICO DE PARASITEMIA . . . . .	25
	3.2. RELAÇÃO ENTRE A DOSE DO INÓCULO E O NÍVEL DE PARA- SITEMIA . . . . .	29
	3.3. RELAÇÃO ENTRE A DOSE DO INÓCULO E O TEMPO DE SO- BREVIVÊNCIA À INFECÇÃO . . . . .	33
	3.4. AÇÃO DO SORO ANTI- <u>Trypanosoma cruzi</u> SOBRE A EVOLU- ÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL . . . . .	37
4.	DISCUSSÃO . . . . .	52
5.	RESUMO E CONCLUSÕES . . . . .	68
6.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS . . . . .	71

Í N D I C E      D E      T A B E L A S

TABELA I	- RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE PARASITAS INOCULADOS E O TEMPO DE APARECIMENTO DO PICO DE PARASITEMIA . . . . .	26
TABELA II	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE PARASITAS INOCULADOS E O TEMPO DE APARECIMENTO DO PICO PARASITÊMICO . . . . .	27
TABELA III	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA REGRESSÃO DA CORRELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE PARASITAS INOCULADOS E O TEMPO DE APARECIMENTO DO PICO PARASITÊMICO . .	28
TABELA IV	- CORRELAÇÃO ENTRE O TEMPO DE APARECIMENTO DO PICO DE PARASITEMIA (D) E O NÍVEL DE PARASITEMIA (D). . . . .	29
TABELA V	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA PARA TESTE DE IGUALDADE ENTRE GRUPOS DE ANIMAIS INOCULADOS COM O MESMO NÚMERO DE PARASITAS EM DIAS DIFERENTES . .	30
TABELA VI	- RELAÇÃO ENTRE O NÚMERO DE PARASITAS INOCULADOS E NÍVEL DE PARASITEMIA. . . . .	32
TABELA VII	- ANÁLISE DE VARIÂNCIA DA RELAÇÃO ENTRE O NÍVEL DE PARASITEMIA E O NÚMERO DE PARASITAS INOCULADOS . . . . .	32
TABELA VIII	- VALORES DE LAMBDA ESCOLHIDOS PARA AS DIFERENTES DOSES . . . . .	34

TABELA IX	- VALORES DA MÉDIA E DO DESVIO PADRÃO CALCULADAS À PARTIR DE LAMBDA IGUAL A (-1,3) . . . . .	35
TABELA X	- INTERVALO DE CONFIANÇA PARA O TEMPO MÉDIO DE SOBREVIDA NAS DIFERENTES DOSES . . . . .	36
TABELA XI	- RELAÇÃO ENTRE O LOGARÍTIMO DO NÚMERO DE PARA- SITAS INOCULADOS E A ESPERANÇA DE SOBREVIDA À INFECCÃO EM DIAS . . . . .	37
TABELA XII	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> SOBRE O TEMPO DE APARECIMENTO DO PICO DE PARASITEMIA . . . . .	39
TABELA XIII	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> SOBRE O NÍVEL DE PA RASITEMIA . . . . .	40
TABELA XIV	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> NA ESPERANÇA DE SO- BREVIDA DOS ANIMAIS INOCULADOS COM $10^5$ TRIPO- MASTIGOTAS . . . . .	41
TABELA XV	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> NA ESPERANÇA DE SO BREVIDA DOS ANIMAIS INOCULADOS COM $10^2$ FORMAS TRIPOMASTIGOTAS. . . . .	42
TABELA XVI	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> , DILUIDO 1/10 e 1/100, SOBRE O NÍVEL DE PARASITEMIA. . . . .	43
TABELA XVII	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> , DILUIDO 1/10 e 1/100, SOBRE O TEMPO DE SOBREVIDA À INFECCÃO . . . . .	44
TABELA XVIII	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> NOS DIFERENTES PE- RÍODOS DA INFECCÃO EXPERIMENTAL . . . . .	46
TABELA XIX	- AÇÃO DO SORO ANTI- <u>T.cruzi</u> NOS DIFERENTES PE RÍODOS DA INFECCÃO EXPERIMENTAL SOBRE O TEM PO DE SOBREVIDA À INFECCÃO . . . . .	47



## 1. I N T R O D U Ç Ã O

A Tripanosomíase Americana é uma doença provocada por parasitas da família dos Tripanosomatidae, espécie Trypanosoma cruzi, habitante natural dos intestinos de insetos triatomídeos hematófagos (Hemiptera, Reduviidae), vulgarmente conhecidos como "barbeiros". Este vetor, hospedeiro invertebrado, coloniza casas de sapê, que apresentam irregularidades nas paredes, permitindo aos triatomídeos se esconderem em seu interior e saírem à noite para sugarem o sangue dos moradores, hospedeiros vertebrados. Nesta ocasião, eliminam pelas fezes e urina as formas infectantes, tripomastigotas metacíclicas, que se desenvolverão, causando a Doença de Chagas. Como se vê, esta doença pode ser facilmente eradicada por medidas de caráter sócio-econômico que melhorem as condições habitacionais das populações estabelecidas nas áreas

endêmicas.

A existência de inúmeros trabalhos de pesquisa sobre o assunto, caracterizando um interesse científico sobre o ciclo biológico do T.cruzi nos hospedeiros vertebrados, pode ser explicada por várias razões, dentre as quais se destaca a certeza de que, embora seja possível sanear as zonas infestadas, não é possível, enquanto houver vetores e meio ambiente para o seu cultivo, extinguir completamente uma espécie viva da face da Terra.

Este fato tem despertado a preocupação dos pesquisadores no sentido de melhor dominar os mecanismos e ciclo vital do parasita e do desenvolvimento da patogenia, para, desta forma, poderem atuar mais eficazmente no combate à inevitável instalação do parasitismo.

Seria um sonho crer na possibilidade de erradicação da parasitose. Entretanto, através de manipulações nos mecanismos de defesa do hospedeiro ou de mutações dirigidas dos parasitas, bem como da resultante dos dois aspectos seja possível, se efetuar um controle imunológico através da vacinação. Isto, é claro, não dispensa, antes pressupõe, uma correta política nacional de saúde pública e o saneamento básico das áreas endêmicas.

O outro destaque dentre as motivações para o estudo da Doença de Chagas encontra-se no fato do T.cruzi servir como modelo experimental para se estudar desde a biologia molecular até os mecanismos específicos e inespecíficos de resistência,

passando pelo discernimento entre o peso dos fatores genéticos e imunológicos na defesa do hospedeiro.

Pode-se determinar as diferenças entre as cepas do T.cruzi segundo os aspectos morfológicos das formas sanguíneas, o comportamento em meios de cultura, o perfil parasitêmico e a mortalidade em camundongos (Brener, 1965; Brener & Chiari, 1963; Brener, 1967). Como exemplo de amostras cujo comportamento ocupam extremos na escala da diversidade do microorganismo, estão as cepas Y e CL (Brener, 1965, 1977). Dentre os estudos físico-químicos e biológicos mais recentes do T.cruzi, encontram-se pesquisas relacionadas à heterogeneidade dos parâmetros detectáveis nas cepas dos T.cruzi estocadas, (isoenzima, endonuclease restritiva e cinética de crescimento), responsabilizando as pressões seletivas induzidas no laboratório sobre o "pool" de gens originais encontrados no parasita mãe estocado. O potencial de diversificação genética do T.cruzi parece ser imenso, pois Dvorak et al. (1982) determinaram a quantidade total de DNA de diferentes amostras do parasita, bem como de clones descendentes de uma mesma amostra, mostrando variações intra-específicas e interclonais. Por outro lado, nem sempre as alterações observadas neste parasita, são determinadas pelos gens, principalmente no que se refere às características antigênicas das camadas mais externas da membrana citoplasmática. Os estudos taxonômicos dos microorganismos, de um modo geral, levam em consideração as estruturas das camadas mais internas, em consequência da pressão seletiva de agentes que atacam a superfície das camadas mais externas (anticorpos, enzimas e bacteriófagos) (Davies et al., 1973).

A superfície das diferentes formas do T.cruzi, deve conter elementos geneticamente determinados e adsorvidos do meio ambiente. Antígenos adquiridos pelo parasita foram observados por Repka et al. (1980) ao detectar imunoglobulina bovina sobre a superfície de epimastigotas cultivadas em meio de cultura acelular. Chess et al. (1983) demonstraram a adsorção reversível de antígenos do Sarcoma XOS aos T.cruzi, cultivados nestas células.

Dentre as estruturas geneticamente determinadas podem-se citar os antígenos glicoprotêicos que são comuns às três formas do parasita: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas (Snary, 1980; Repka et al., 1980). Nogueira et al. (1981) demonstraram a presença de uma glicoproteína de 90.000 -M<sub>r</sub>, presente nas formas sanguíneas, enquanto as formas epimastigotas e tripomastigotas de cultura acelular, expressavam uma glicoproteína de 75.000 -M<sub>r</sub>, na superfície. Cabendo a glicoproteína de 90.000 - M<sub>r</sub>, uma função anti-fagocítica. Portanto, a adaptação ao organismo do vertebrado exige uma modificação de sua superfície que permite ao parasita escapar aos mecanismos de resistência do hospedeiro. Krettli & Pontes de Carvalho (1983) demonstraram que a cepa Y, clone Btry, contém receptores de membrana para C<sub>3</sub>, e que estes representam um mecanismo de escape do T.cruzi. Neal & McHardy (1977) compararam a virulência de tripomastigotas metacíclicos e sanguíneas, mostrando que as formas sanguíneas são ligeiramente mais virulentas. Brener (1974) observou um aumento da virulência das cepas FL, Berenice e PMN, após 8 anos de cultivo em camundongos, sem no entanto apresentarem alterações na curva de parasitemia, nem

perderem a capacidade de reinfestar hospedeiros invertebrados. Contudo, uma das maiores provas da flexibilidade adaptativa do T.cruzi, encontra-se na resistência adquirida pelos epimastigotas, nos hospedeiros vertebrados, à ação lítica do complemento pela via alternativa. Demonstrou-se inclusive, que o destrave para a transformação de uma forma em outra pode estar dissociada da modificação morfológica em si, que ocorre durante o desenvolvimento do ciclo biológico (Sher et al, 1983). Por dedução deste estudo, pode-se concluir que o processo de diferenciação durante o ciclo reprodutivo do T.cruzi deve ser parte de um processo de sobrevivência às agressões do meio ambiente hospedeiro.

É evidente que a evolução da doença no vertebrado depende não só da natureza do microorganismo como também do hospedeiro vertebrado. No que diz respeito ao hospedeiro vertebrado, estudos com a cepa Brasil, bem como com a cepa Y, demonstraram que existe um "contínuum" de resistência natural à infecção em camundongos, abrangendo espectro que compreende desde forte resistência encontrada nos camundongos (CBA x C57BL) F<sub>1</sub>, passando por uma resistência moderada nos C57BL, intermediária nos BALB/c, até alcançar animais de grande susceptibilidade como os CBA, C<sub>3</sub>H, A/J (Trischmann et al., 1978; Corsini et al., 1980).

A patogenicidade de uma amostra tem sido medida pelo nível de parasitemia e porcentagem de mortes. Habitualmente, os animais resistentes apresentam baixos níveis parasitêmicos e índices de mortalidade, enquanto os animais sensíveis apresentam altos níveis parasitêmicos e de mortalidade (Pizzi et al., 1949; Trischmann

et al., 1978). É preciso lembrar, contudo, que tanto o nível de parasitemia quanto o índice de mortalidade podem depender da dose inoculada (Trischmann et al., 1978). Por outro lado, deve-se acentuar que o nível de parasitemia comporta uma variabilidade muito grande de... indivíduo para outro, o que torna questionáveis, do ponto de vista de significância estatística, algumas comparações.

O nível de parasitemia deve resultar de um mecanismo de controle que é determinado geneticamente, uma vez que existem raças com altos níveis parasitêmicos e outras com baixos níveis parasitêmicos (Wrightsmann et al., 1982). Estes autores, utilizando animais congênicos, mostraram que este controle, independe dos gens localizados no locus H-2.

Ao contrário do que ocorre com o mecanismo de controle da parasitemia, onde não foi possível demonstrar uma participação dos gens do locus H-2, parece não haver dúvida da importância dos gens deste locus na sobrevivência à infecção. Wrightsmann et al. (1982; 1984), Trischmann & Bloom (1982) observaram que dentre os animais congênicos B10., o haplotipo -s (B10 -S), e dentre os congênicos BALB/., do haplotipo -k (BALB/ .K), apresentaram os maiores índices de sobrevivência e mortalidade ao serem infectados com as cepas Peru e Brasil, respectivamente. O conjunto destes dados aponta para uma ausência de correlação entre a parasitemia e a mortalidade. Em concordância com esta hipótese Wrightsmann et al. (1982) observaram um mesmo tempo de sobrevida à infecção em camundongos de linhagens produtoras de altos níveis parasitêmicos e baixos níveis parasitêmicos, quando inoculados com a mesma dose de

parasitas da cepa Peru. Brener (1977) estudando as variações intra específicas de T.cruzi, mostrou que a cepa Y apresentava um pequeno pico parasitêmico no 5º dia e outro, maior, no 7º dia pós-infecção, seguido por declínio brusco: enquanto a cepa CL, mostrava um perfil parasitêmico gradual e progressivo, sem ocorrência de decréscimo no número de formas sanguíneas. Muito embora a parasitemia da cepa Y tenha sido controlada, o número de dias requerido para a morte de 50% dos animais foi de  $10,7 \pm 0,46$ , enquanto para a amostra CL, foi de  $16,0 \pm 1,0$ , o que significa que, a cepa Y foi mais virulenta do que a cepa CL, o que corrobora a interpretação de independência entre a resistência à parasitemia e à mortalidade.

A resistência está relacionada ao Sistema Imunológico, como indicam os experimentos de timectomia neonatal em animais infectados com T.cruzi (Schmunis et al., 1971), tratamento com soro anti-imunológico (Rodriguez et al., 1981), esplenectomia (Brener & Krettli, 1979; Trischmann et al., 1978), irradiação (Hanson 1976, 1977), tratamento com sílica para bloquear o funcionamento dos macrófagos (Trischmann et al., 1978), ou descomplementação (Budzko, 1975), os quais exacerbaram a infecção pelo T.cruzi. As defesas naturais podem ser maiores ou menores dependendo do padrão genético do animal hospedeiro; entretanto, o comportamento da curva parasitêmica ou o perfil parasitêmico será o mesmo para as linhagens de alta parasitemia ou de baixa parasitemia, quando são infectadas com a mesma amostra de T.cruzi (Trischmann et al., 1978; Wrightsmann et al., 1982).

A infecção por T.cruzi tem uma fase aguda que, se seguida para uma fase crônica, pode evoluir de maneira inaparente (forma indeterminada) para uma das formas crônicas da doença, quais sejam, cardiopatia ou megavisceras.

A fase aguda se caracteriza por uma parasitemia que habitualmente atinge um pico, a partir do qual o número de parasitas do sangue, começa a declinar. Esta observação pode ser feita, mesmo no caso dos animais sensíveis, que embora consigam controlar o nível de parasitemia, morrem alguns dias depois do pico parasitêmico.

O controle da infecção representado pelo desaparecimento dos parasitas da circulação e por uma sobrevivência à infecção, também dependem, ao que tudo indica, da presença de anticorpos específicos. Kierszenbaum & Howard (1976) demonstraram que camundongos Biozzi, maus produtores de anticorpos, apresentam níveis parasitêmicos e mortalidade mais elevados do que os camundongos Biozzi bons produtores de anticorpos.

Na fase aguda, além dos anticorpos, outros elementos têm sido implicados como responsáveis pela proteção contra a Tripanosomíase Americana, tais como, células citotóxicas naturais, macrófagos, complemento, eosinófilos, polimorfonucleares (Kipnis et al., 1981; Hatcher, 1982; Nogueira et al., 1980; Krettli & Nuzssenzweig, 1977). Não há dúvida de que vários destes elementos se encontram alterados durante a fase aguda



Hayes & Kierszenbaum (1981) Kierszenbaum (1981) Maleckar & Kierszenbaum (1983) demonstraram que o período agudo da infecção em CBA, apresentou depressão da resposta linfoproliferativa de células B e T em presença de mitógenos (LPS), (PHA), (antígenos de T.cruzi), bem como uma esplenomegalia, sem que o número de células B, aumentassem percentualmente. A depressão dos linfócitos B e T, ao estímulo mitogênico, nesta fase, não é consequência da ação do linfócito T supressor, e sim a um fator do T.cruzi, e a depressão quantitativa das células T (Kierszenbaum, 1981; Kierszenbaum & Budzko, 1982; Maleckar & Kierszenbaum, 1983; 1984; Tarleton et al., 1983).

A influência destes fenômenos na quantidade e especificidade dos anticorpos não está demonstrado. Sabe-se, no entanto, que os títulos de anticorpos encontrados na fase aguda, em CBA infectado com a cepa Tulahuén, são muito menores do que na fase crônica; o seu funcionamento como mediador de reações de citotoxicidade (ADCC) entretanto, apresenta a mesma qualidade nos dois períodos (Kierszenbaum & Gharpure, 1983).

Parece oportuno investigar a importância da função da célula citotóxica natural durante esta fase da infecção uma vez que as células do Sistema Imunitário, linfócitos B e T encontram-se deprimidos de maneira funcional e quantitativa, respectivamente (Hayes & Kierszenbaum, 1981). Hachter (1982) demonstrou que durante as primeiras 48 horas após a inoculação do T.cruzi em camundongos C<sub>3</sub>H (He) ou C57BL/6, há um aumento significativo de células citotóxicas naturais, e que esta fase inicial de atividade

citotóxica, é seguida, após 16 a 19 dias da infecção, por células citotóxicas,  $Thy\ 1^+$  e  $NK^-$ . A imunodepressão quantitativa e funcional dos linfócitos T, nos CBA (Hayes & Kierszenbaum, 1981), infectados com a cepa Tulahuén, é detectada já no 5º dia pós - infecção (Kierszenbaum & Budzko, 1982) e provavelmente a resistência desta fase é realizada por anticorpos (Rodriguez et al., 1981) e por células citotóxicas naturais (James et al., 1982). Apesar do papel intermediário dos anticorpos na efetivação das reações de citotoxicidade, quem completa a destruição do microorganismo é a célula citotóxica, seja ela uma célula citotóxica natural, um fagócito mononuclear ou polimorfonuclear.

Outro fator considerado importante para o controle da infecção consiste no Sistema do Complemento. Experiências in vitro indicam que o complemento só age sobre o tripomastigota quando em presença de anticorpos e que a ativação do sistema é feita, predominantemente, pela via alternativa (Krettli, 1978; Kierszenbaum & Howard, 1976; Budzko et al., 1975; Krettli et al., 1979). Krettli (1978) mostrou in vitro que a lise de tripomastigotas sanguíneas, mediada por complemento humano, não era obtida quando os parasitas utilizados eram colhidos a) durante a fase ascendente da curva parasitêmica, b) de animais inoculados com baixas doses, c) de camundongos inoculados com determinadas cepas (CL), d) ou ainda quando os parasitas eram originários de camundongos irradiados. Estes experimentos demonstram que a presença de anticorpos específicos anti-T.cruzi era fundamental para a efetivação da lise pelo sistema de complemento humano normal, in vitro (Krettli, 1978). Os anticorpos são produzidos in vivo, após algum

tempo da infecção, através da estimulação imunogênica, a partir de um determinado número de tripomastigotas sanguíneas. O fato do animal não contar com anticorpos líticos na fase ascendente do pico parasitêmico, segundo Krettli (1978) põem em dúvida o mecanismo de lise como sendo fundamental para o controle da parasitemia nesta fase (ressalve-se que a capacidade lítica do soro de camundongos, é 50% menor do que a do soro humano normal). Por outro lado, Rodriguez et al. (1981) demonstraram, in vivo, em camundongos tratados com soro anti- $\mu$ , depletados de IgM e IgG2b, que o complemento foi ativado através da detecção de baixos níveis de complemento ativados pela via alternativa, em placas hemolíticas, na 2ª semana de infecção, atingindo o máximo de atividade na 6ª semana. Este dado significa que, in vivo, o anticorpo opsonizante, não é necessário para que ocorra a lise.

Numa tentativa de verificar o comportamento dos fenômenos imunitários que ocorrem durante a fase aguda, Tarleton & Kuhn (1983) estudaram a correlação da mudança na população de células totais, de células produtoras de imunoglobulinas, linfócitos T, e macrófagos de baço, com a cinética de produção de IgG, IgM e IgA, em camundongos resistentes (C57BL) e sensíveis (C3H), infectados com T.cruzi. Demonstraram que nos camundongos infectados houve uma estimulação policlonal, antecedendo ou coincidindo com a elevação de anticorpos específicos para o T.cruzi, mas que, no entanto, os animais C3H apresentaram um tempo lag maior para a produção de anticorpos do que os C57BL/6, bem como apresentavam um número mais alto de anticorpos "naturais" anti-T.cruzi, do que os C57BL/6. No que se refere à classe de imunoglobulinas, as IgM apresentaram níveis máximos no 49º dia pós-infecção e se

mantiveram elevadas durante todo o período crônico. Enquanto as IgG, em camundongos resistentes, se apresentaram em maior quantidade, mais cedo, no 42º dia, mantendo os níveis em "platô" até o fim da experiência. Por outro lado, os animais sensíveis morreram no período em que os níveis de IgM e IgG estavam em elevação. O fato mais interessante deste estudo foi o registro do rebaixamento do número absoluto e percentual das células produtoras de imunoglobulinas, durante a fase aguda da infecção, além de uma elevação no número de macrófagos, sem, no entanto, haver modificações quantitativas nas células T em camundongos resistentes, enquanto que nos C3H não houve alterações nos níveis de células produtoras de imunoglobulinas até o pico parasitemico, mas sim um rebaixamento percentual no período que precede a morte, bem como uma elevação do número de macrófagos e de células T. Contudo, há discordância entre estes achados e os resultados obtidos por Kierszenbaum 1981, que detectou depressão absoluta e percentual dos linfócitos T, em CBA portador da infecção aguda.

Face aos dados existentes sobre a depressão de células T e B durante a fase aguda da infecção (Hayes & Kierszenbaum, 1981) é pouco provável que estas células tenham papel destacado na transição da fase aguda para a fase crônica. Igualmente pode-se questionar os papéis dos anticorpos e do complemento, nesta fase, uma vez que os animais esplenectomizados ou descomplementados são capazes de controlar o nível de parasitemia.

Considerando que tem sido demonstrado um aumento do número de células fagocitárias em camundongos C3H e C57BL

neste período, é possível que estas células tenham um papel destacado nesta fase de transição, caracterizada por um declínio do pico parasitêmico e início da recuperação quantitativa dos linfócitos T e da atividade funcional linfoproliferativa dos linfócitos T e B, em CBA ( Hayes & Kierszenbaum, 1981; Tarleton & Kuhn, 1983). Em concordância com estas hipóteses, James et al. (1982) demonstraram que os macrófagos de animais sensíveis não eram tripanostáticos durante a fase aguda, atividade esta, presente nos macrófagos de camundongos resistentes, C57BL. Behbehani et al (1981) compararam a quantidade de antígenos associados com a região I do MHC (Major Histocompatibility Complex), (Ia), presentes nos macrófagos peritoneais de camundongos normais e infectados com T.cruzi, encontrando-os em apenas 10% dos primeiros e em 50 a 100% dos macrófagos de animais infectados por T.cruzi. Esta conversão de Ia negativos para Ia positivo sugere uma ativação da cooperação entre macrófagos e células T, numa fase em que os linfócitos T aumentam quantitativamente (Hayes & Kierszenbaum 1981).

O T.cruzi, uma vez fagocitado pelo macrófago, pode escapar do fagossoma e se multiplicar no citosol (Nogueira & Cohn 1977). Tem-se demonstrado que os macrófagos provenientes de animais cronicamente infectados apresentam uma atividade tripanostática e, em presença de linfócitos T específicos ou de linfocinas, esses macrófagos exercem uma nítida ação tripanosomicida (Nogueira & Cohn 1978 ; 1979). Contudo, Alcântara & Brener (1980) não observaram atividade tripanostática nos macrófagos de animais cronicamente infectados, bem como nos fagócitos ativados com tio glicolato, muito embora apresentassem maior índice de fagocitose .

No que se refere à fase aguda, os macrófagos apresentam-se morfológicamente ativados, *in vitro*; entretanto, não se tem informações conclusivas sobre a sua atividade, durante esta fase (Alcântara, 1979).

O período crônico é caracterizado por apresentar níveis parasitêmicos subpatentes, passíveis de detecção somente através de hemocultura e xenodiagnóstico. Experimentalmente, a fase crônica, pode ser demonstrada em camundongos de linhagens naturalmente resistentes, inoculadas com doses baixas de cepas altamente virulentas (Corsini et al., 1980) ou de animais sensíveis, desde que estes sejam infectados com pequenos inóculos de amostra pouco virulenta (Hayes & Kierszenbaum, 1981), ou por tratamento efetuado com droga que inibe ou erradica o parasita (Krettli & Brener, 1976).

Tem-se demonstrado que, durante a fase crônica, o animal apresenta uma maior resistência específica ao T.cruzi. Contudo, é durante esta fase que aparecem no homem as lesões cardíacas e em vísceras ocas que podem levá-lo à morte. A etiopatogenia destas lesões ainda está mal esclarecida, acreditando alguns, como Koberle (1968), que elas tenham sido iniciadas no período agudo da infecção, enquanto outros, como Teixeira e Santos-Buch (1974), sugerem que elas são consequência de fenômenos de autoimunidade, desencadeados pela infecção. Fredereci et al. (1964) demonstraram em C<sub>3</sub>H que as lesões inflamatórias do coração são mais extensas na fase crônica, enquanto que o parasitismo é mais intenso durante o período agudo da infecção.

A transição da fase aguda para a crônica, certamente depende dos mecanismos de defesa desenvolvidos no hospedeiro. Tem sido demonstrado que, nesta transição, observa-se uma recuperação das funções do Sistema Imunitário que estavam alteradas durante o período agudo da infecção. Hayes & Kierszenbaum (1981) demonstraram uma recuperação funcional das células B, coincidindo com o aumento quantitativo dos linfócitos T durante a fase crônica em CBA infectado com a cepa Tulahuên, bem como Tarleton & Kuhn (1983) mostraram em linhagens C57BL uma recuperação quantitativa de linfócitos B, e elevação acima do normal, em termos relativos e absolutos, dos linfócitos T nos camundongos portadores da infecção crônica, com cepa Brasil. Estes últimos autores documentaram ainda um aumento do número de macrófagos durante as fases da infecção, retornando aos valores normais no 105º dia de infecção.

O equilíbrio da relação parasita-hospedeiro, durante o período crônico, pode ser quebrado através de tratamento com imunodepressores, Raio X, soro antitimócito, ou por infecções concomitantes com outros protozoários (Hayes & Kierszenbaum, 1981; Hanson et al., 1976, 1977; Krettli, 1977).

O tratamento com ciclofosfamida facilita o desenvolvimento de reação cutânea mediada pela imunidade celular (DTH) a diversos antígenos; entretanto, Abrahamsohn et al (1981) não detectaram este fenômeno em animais infectados por T.cruzi. Da mesma forma, Scott (1981a) demonstrou supressão da hipersensibilidade cutânea retardada aos antígenos de T.cruzi em animais (CBA x C57BL) F1 previamente inoculados com células T obtidas de baço

de animais cronicamente infectados. Os animais que apresentam esta depressão de hipersensibilidade retardada aos antígenos do T. cruzi apresentam uma reatividade normal ao DNFB e ao KLH (Corsini et al., 1980; Scott 1981b), o que indica que a supressão é específica. Este fato, aparentemente, contradiz a hipótese segundo a qual as lesões histopatológicas da fase crônica podem ser consequência de uma reação de hipersensibilidade retardada, na qual linfócitos T, especificamente sensibilizados para os antígenos de T. cruzi, reagiriam com os antígenos teciduais (Teixeira et al., 1975b). Portanto, se, por um lado, admite-se que o linfócito T suprime a resposta cutânea tardia aos antígenos do T. cruzi, fica difícil admitir-se, por outro lado, que a reação do DTH seja responsabilizada pelas lesões orgânicas do coração (Teixeira et al., 1978). Na realidade, existem poucos dados conclusivos sobre o papel do linfócito T durante a fase crônica. O tratamento com soro antitimócito não alterou a relação parasita-hospedeiro (Hoff 1975); entretanto, experiências utilizando transferência adotiva de células esplênicas de camundongos crônicos depletados de linfócitos T protegeram parcialmente os receptores, ao se observar um prolongamento dos níveis altos de parasitemia (Scott 1981b), sem, no entanto, alterar a esperança de sobrevivência. Este autor sugere que as células T auxiliam no controle dos níveis do pico parasitêmico, assim como demonstra outras funções referentes ao linfócito T, indiretamente, em experiências que mostram um papel auxiliar da célula T na produção de anticorpos anti-T. cruzi. Por exemplo, células esplênicas de animais crônicos depletadas de linfócitos T não produziram anticorpos e apresentaram resposta anamnésica pobre à estimulação antigênica secundária do T. cruzi, quando transferi-



das para animais irradiados (Scott 1981a).

O papel dos anticorpos durante a fase crônica da infecção por T.cruzi parece ser de importância fundamental no mecanismo de defesa. Culbertson & Kolodny (1938) e Kolodny (1939) demonstraram através transferência passiva de soro imune de ratos crônicos proteção contra uma cepa virulenta do T.cruzi. Posteriormente, Kagan & Norman (1961, 1962) observaram proteção contra cepa virulenta de T.cruzi, através de inoculação anterior à infecção do soro imune crônico, obtido pela infecção com cepas avirulentas do protozoário. Kierszenbaum & Howard (1976) mostraram proteção efetiva dos camundongos Biozzi, baixo produtores de anticorpos, através da transferência passiva de plasma imune, diariamente, entre os dias 2 e 17 da infecção. Krettli & Brener (1976) observaram proteção contra a infecção por T.cruzi pela transferência passiva de soro de animais cronicamente infectados inoculados 1 hora antes da infecção. Esta proteção só foi observada quando era utilizado soro obtido de animais com 7 a 22 semanas de infecção, não se observando alteração da infectividade quando se utilizava soro de animais com 4 semanas de infecção. Por outro lado, McHardy (1977)<sup>b</sup> obteve resultados de proteção com transferência passiva de soro obtido na 4ª e 6ª semanas de infecção e inoculados após 24 horas da infestação com a cepa Tulahuén ou Y.Castelo Branco (1978) demonstrou que a atividade protetora do soro imune crônico estava relacionada à IgG. Takerara et al. (1981) demonstraram que os anticorpos protetores eram predominantemente IgG2 e preferencialmente localizados na subclasse IgG2b.

As experiências de Scott (1981a) demonstraram que a transferência de células B de animais cronicamente infectados para animais irradiados protegeram o receptor de uma dose letal de parasitas, enquanto que a transferência de frações de células T e de macrófagos não protegeram. Contudo, a inter-relação das funções destes três tipos de células durante a fase crônica pode-se deduzir a partir dos trabalhos de Scott (1981a, 1981b) e Nogueira & Cohn (1979). Estes últimos autores mostraram que macrófagos presentes no peritônio de animais infectados com T.cruzi apresentam-se apenas tripanostáticos, mas ao receberem uma dose antigênica secundária, em presença de linfócitos T específicos, anti-T.cruzi, tornavam-se tripanosomicidas. Alcântara (1979) observou que soro hiperimmune anti-T.cruzi, aumentava de duas vezes o índice de fagocitose, tanto pelos macrófagos normais como pelos macrófagos de animais cronicamente infectados, sem, no entanto, se observar atividade tripanostática in vitro. Nogueira & Cohn (1980), discordaram que o macrófago de animal crônico não seja tripanostático.

Em resumo, a proteção decorre da função interligada destas três células. O linfócito T funcionaria como auxiliar do linfócito B na produção de anticorpos específicos anti-T.cruzi (Scott 1981a), os quais facilitariam a fagocitose dos parasitas pelos macrófagos. Estes macrófagos poderão apresentar uma atividade tripanostática ou tripanosomicida de acordo com seu grau de ativação que é regulado pelo linfócito T (Nogueira & Cohn, 1977; Mackaness, 1970).

O papel do anticorpo na evolução da infecção não está esclarecido, não existindo informações seguras de como ele age durante a infecção. Com o objetivo de obter informações a este respeito, procuramos investigar, no presente trabalho, a evolução da infecção em animais passivamente imunizados, procurando avaliar a ação do soro imune anti-T.cruzi, sobre os seguintes parâmetros da infecção: nível de parasitemia no pico; tempo de evolução da infecção necessário para atingir o pico parasitêmico; e esperança de sobrevivência à infecção.

## 2. M A T E R I A L    E    M É T O D O S

### 2.1 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos isogênicos CBA de ambos os sexos, com três meses de idade (18 a 25g), criados no Biotério Central da UNICAMP. Alguns animais foram cedidos pelo Dr. Thomaz Mota-Santos (Universidade Federal de Minas Gerais) e pelo Dr. Sylvio Thales Torres (Universidade Federal Fluminense), todos provenientes originalmente, do Jackson Laboratories (Bar Harbor, Maine).

Também foram utilizados camundongos (C57BL x CBA) F<sub>1</sub>, criados no Biotério Central da UNICAMP, de ambos os sexos e com três meses de idade.

## 2.2 - TRYPANOSOMA CRUZI

Para a realização destes experimentos, foi utilizada a cepa Y (Pereira da Silva & Nussenzweeig, 1953), cedidas por Z. Brener, através passagens sanguíneas sucessivas em camundongos Swiss 55. Durante a realização destes experimentos, a amostra foi mantida em camundongos CBA de três meses de idade por inoculação intraperitoneal (i.p.), a cada 7 dias, de  $10^5$  formas tripomastigotas.

## 2.3 - DETERMINAÇÃO DO NÚMERO DE TRIPOMASTIGOTAS

O número de tripomastigotas presentes numa amostra de  $5 \mu\text{l}$  de sangue, foi coletada com pipeta de hemoglobina previamente calibrada, e colocada em lâmina de microscópio sob lamínula de 22 x 22 mm. O número de parasitas foi avaliado conforme técnica descrita por Brener, 1962. Os campos microscópios da lamínula foram determinados com objetiva de 40 x. Os parasitas foram contados em 20 campos e o número encontrado multiplicado por 30.000, um fator de correção correspondente a  $1/30$  do total de campos microscópios da área da lamínula.

## 2.4 - INOCULAÇÃO DE CAMUNDONGOS COM TRIPOMASTIGOTAS SANGUÍNEOS

Tripomastigotas sanguíneos foram obtidos de camundongos CBA inoculados 7 dias antes via i.p. com  $10^5$  parasitas, através de sangramento pelo plexo braquial, sendo este sangue, coletado em recipientes contendo citrato de sódio a 3,8% e apresentando em média  $3.5 \times 10^6$  tripomastigotas por ml de sangue. O inó-

culo foi preparado a partir de sangue diluído em salina tamponada de maneira a conter  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ,  $10^5$  parasitas em 0,1 ml, para ser inoculado via i.p.

## 2.5 - DETERMINAÇÃO DO NÍVEL DE PARASITEMIA

Observou-se a quantidade de parasitas no sangue diariamente, após o período pré-patente, até aproximadamente dois dias após o pico de parasitemia, utilizando-se o método de Brener, 1962. Os resultados foram expressos em média aritmética e o respectivo desvio padrão do número de parasitas em 20 campos no dia do pico de parasitemia. Quando necessário, para normalizar a distribuição, os números de parasitas em 20 campos, foram transformados no respectivo logaritmo para a realização dos diferentes testes estatísticos.

## 2.6 - OBTENÇÃO DE SORO ANTI-T.cruzi

Para a obtenção de partidas de soro anti-T.cruzi, grupos de animais (C57BL x CBA) $F_1$ , em número predominante de fêmeas, foram inoculados com  $10^2$  formas tripomastigotas sanguíneas, via i.p., submetidos ao controle de infestação no 12º dia e sangrados na 6ª semana de infecção. Este sangue, após retração do coágulo era centrifugado a 100g durante 15 minutos e o soro era estocado em alíquotas de 2,5 ml, a -20°C. Para a realização das experiências foi utilizada a mesma partida. Contudo, para a repetição de alguns testes recorreu-se a uma segunda partida.

## 2.7 - DELINEAMENTO EXPERIMENTAL

De modo geral, as experiências foram levadas a efeito em grupos de 5 camundongos e os testes foram repetidos no mínimo três vezes.

A inoculação com formas tripomastigotas foi feita utilizando-se parasitas obtidos 15 minutos antes da infecção. Os diferentes grupos de animais, submetidos aos diversos tratamentos, bem como os seus respectivos grupos controles, foram mantidos no Biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, com ração e água à vontade numa temperatura ambiente que variou de 20<sup>o</sup> a 28<sup>o</sup>C.

## 2.8 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os diversos parâmetros observados nos grupos tratados, foram comparados com os seus respectivos controles, realizados no mesmo dia, utilizando-se análises estatísticas. Análises de variância: teste T de Student, teste F, teste de Tukey-Kramer e Teste de Hooker - Regressão linear e regressão de Box & Cox foram utilizados para os estudos de expectativa de sobrevivência à infecção e tempo de aparecimento do pico de parasitemia.

## 2.9 - PREPARAÇÕES HISTOLÓGICAS

O baço, fígado, coração, foram retirados de camundongos no 7<sup>o</sup> dia de infecção e 10, 7, 4 dias, 6 horas, após a inoculação do soro anti-T.cruzi, fixados em formol a 10% e proces

sados para coloração com Hematoxilina-Eosina, segundo técnica de Burke, Weymouth & Seibel (1972).



### 3. R E S U L T A D O S

Com a finalidade de estudar a evolução da infecção por Trypanozoma cruzi nos camundongos CBA, grupos de no mínimo cinco animais foram inoculados com diferentes doses do parasita procurando-se determinar, em seguida, o nível de parasitemia e o espaço de tempo, em dias, entre a inoculação do parasita e o aparecimento do pico de parasitemia (tempo de evolução necessário para atingir o pico parasitêmico) e a esperança de sobrevivência.

#### 3.1 - RELAÇÃO ENTRE NÚMERO DE PARASITAS INOCULADOS E TEMPO DE APARECIMENTO DO PICO DE PARASITEMIA

Os resultados apresentados na Tabela I mostram que na medida em que a dose inoculada aumentava se reduzia o tempo necessário para o aparecimento do pico de parasitemia.

TABELA I

Relação entre o número de parasitas inoculados e tempo de aparecimento do pico de parasitemia.

Nº de T.cruzi Inoculados	Nº de animais	Tempo de aparecimento do pico de parasitemia em dias		
		Média	D.P.	I.C.95%
$10^1$	67	12,97	1,36	(12,64 a 13,30)
$10^2$	44	11,66	1,29	(11,27 a 12,05)
$10^3$	14	10,71	1,98	(09,57 a 11,86)
$10^4$	15	8,67	1,29	(07,95 a 09,38)
$10^5$	16	7,56	1,15	(06,95 a 08,18)

D.P. (Desvio padrão)

I.C. (Intervalo de Confiança) 95% foi calculado a partir de uma normal padrão

$\bar{t} \pm s/n \cdot z_{0,025}$

$z_{0,025} = 1,96$

A análise de variância mostrou que as diferenças observadas entre as médias dos dias de pico, para as diferentes doses, eram estatisticamente significativas (Tabela II).

TABELA II

Análise de variância da relação entre o número de parasitas inoculados e tempo de aparecimento do pico parasitêmico.

Fonte de Variância	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média Quadrática	F
Fator	4	522,27	130,57	68,47
Erro	151	287,95	1,91	
TOTAL	155	810,22		

F - é significativa ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

A análise de regressão (Tabela III) mostrou a existência de uma função linear (Fig. I) entre o logaritmo da dose de parasitas inoculados e o dia do pico, expressada pela equação:

$$y = b - ax$$

onde  $y$  representa o tempo de pico de parasitemia e  $x$  o logaritmo do número de parasitas inoculados. Os valores de  $b$  e  $a$ , determinados empiricamente, foram, respectivamente,  $14,4 \pm 0,21$  e  $1,36 \pm 0,08$ .

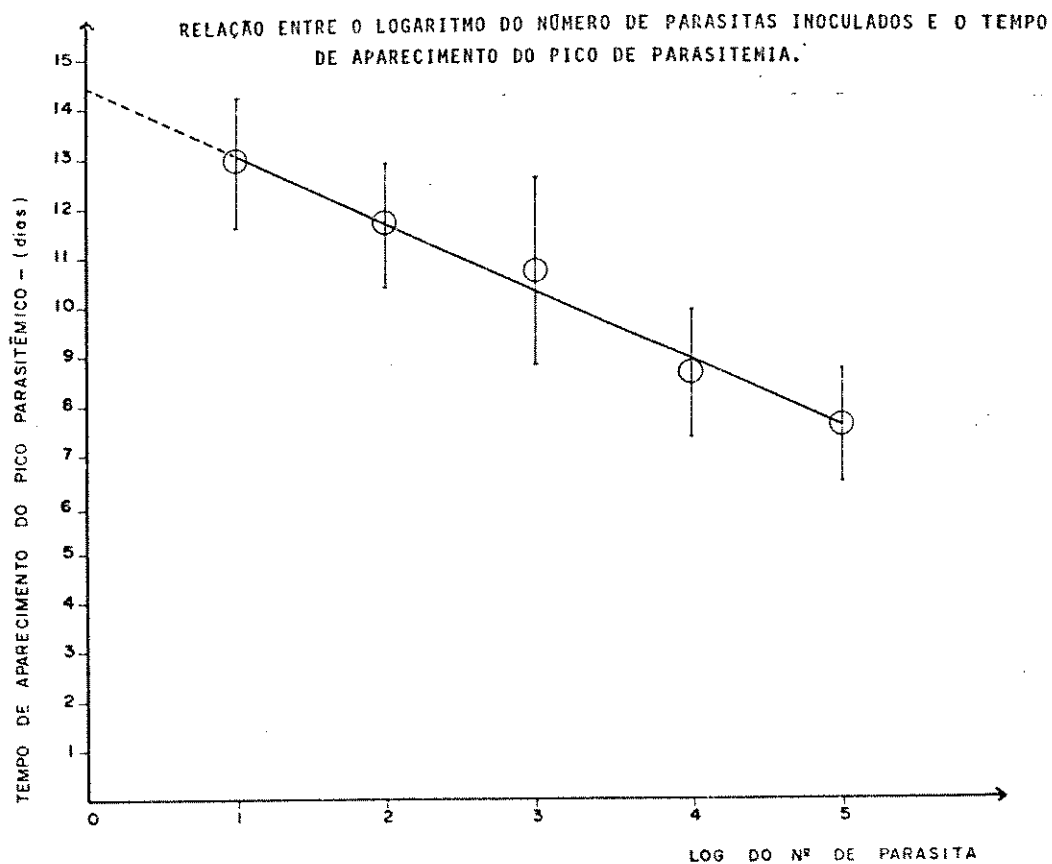
TABELA III

Análise de variância da regressão da correlação entre o número de parasitas inoculados e o tempo de aparecimento do pico parasitêmico.

Fonte de Variância	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média Quadrática	F*
Regressão				
Linear	1	518,60	518,60	274,39
Resíduo	154	291,62	1,89	
<hr/>				
TOTAL	155	810,22		

\*F - é significante ao nível de 5% ( $p < 0,05$ )

FIGURA I



### 3.2 - RELAÇÃO ENTRE A DOSE DO INÓCULO E O NÍVEL DE PARASITEMIA

Os animais inoculados com uma mesma dose de parasitas apresentaram uma pequena variação no tempo de aparecimento de pico de parasitemia e também uma ampla variação do nível de parasitemia determinado no dia do pico. A análise destes dados não nos permite rejeitar a hipótese de independência entre estas variáveis, a níveis normais (Tabela IV).

TABELA IV

Correlação entre o tempo de aparecimento do pico de parasitemia (D) e o nível de parasitemia (P).

Número de Tripo, Inoculados	Correlação D/P
$10^1$	- 0.178
$10^2$	0.021
$10^3$	- 0.367
$10^4$	- 0.477
$10^5$	0.420

Também não foram observadas diferenças estatísticas significativas nos resultados obtidos com diferentes grupos de cinco animais, submetidos a um mesmo tratamento experimental. Por esta razão, os dados obtidos nas diferentes experiências foram acumulados e acham-se apresentados na Tabela V.

TABELA V

Análise de variância para teste de igualdade entre grupos de animais inoculados com o mesmo número de parasitas\*, em dias diferentes.

Fonte de Variância	Graus de Liberdade	F**
Fator	3	3,20
Erro.	17	
Total	20	

\* Foram analisados quatro grupos de cinco animais inoculados com  $10^2$  parasitas

\*\*F - não é significativa ao nível de 5% ( $p > 0,05$ )

Os dados concernentes à relação entre a dose do inóculo e o nível de parasitemia no dia do pico, acham-se apresentados na Tabela VI, onde se pode verificar uma variação de parasitas no dia do pico em relação à dose. A análise de va-

riância feita com o teste F nos permite rejeitar a hipótese de independência entre os dados apresentados (Tabela VII). Utilizando-se o teste de Tukey-Kramer (Dunnet, 1980), para fazer comparações múltiplas entre os diferentes tratamentos ( $\mu_1$  a  $\mu_5$ ), foi possível mostrar que os grupos inoculados com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$  não diferem entre si num nível de significância de 5%, bem como os grupos inoculados com  $10^4$  e  $10^5$  não diferem entre si num nível de significância de 1%. Contudo, este último grupo diferiu significativamente dos quatro primeiros grupos ( $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$ ,  $10^4$ ), num nível de significância de 5%.

$$\frac{\hat{\mu}_1 \quad \hat{\mu}_2 \quad \hat{\mu}_3 \quad \hat{\mu}_4 \quad \hat{\mu}_5^*}{\quad}$$

$$\frac{\hat{\mu}_1 \quad \hat{\mu}_2 \quad \hat{\mu}_3 \quad \hat{\mu}_4 \quad \hat{\mu}_5^{**}}{\quad}$$

\* Ao nível de significância  $\alpha = 0,05$  ( $p < 0,05$ ) não se pode afirmar que exista diferença significativa entre  $\hat{\mu}_1$   $\hat{\mu}_2$   $\hat{\mu}_3$   $\hat{\mu}_4$

\*\*Ao nível de significância  $\alpha = 0,01$  ( $p < 0,01$ ) não se pode afirmar que exista diferença significativa entre  $\hat{\mu}_1$   $\hat{\mu}_2$   $\hat{\mu}_3$   $\hat{\mu}_4$  e entre  $\hat{\mu}_4$  e  $\hat{\mu}_5$ .

TABELA VI

Relação entre número de parasitas inoculados e nível de parasitemia

Nº de T.cruzi Inoculado	Nº de animais	Nível de parasitemia/ml <sup>2</sup> (x3x10 <sup>4</sup> )		
		Média	D.P.	I.C. 95%
10 <sup>1</sup>	67	96,37	82,1	( 76,3 a 116,4)
10 <sup>2</sup>	44	121,10	86,3	( 93,9 a 146,4)
10 <sup>3</sup>	14	90,20	54,7	( 58,6 a 121,8)
10 <sup>4</sup>	15	174,60	105,0	(116,3 a 232,9)
10 <sup>5</sup>	16	276,90	202,0	(169,4 a 384,4)

<sup>2</sup>Determinado no pico de parasitemia

D.P. desvio padrão

I.C. Intervalo de Confiança

TABELA VII

Análise de variância da relação entre o nível de parasitemia e o número de parasitas inoculados.

Fonte de Variância	Graus de Liberdade	Soma dos Quadrados	Média Quadrática	F
Fator	4	476.872	119.218	11,48*
Erro	151	1.568.663	10.388	
TOTAL	155	2.045.535		

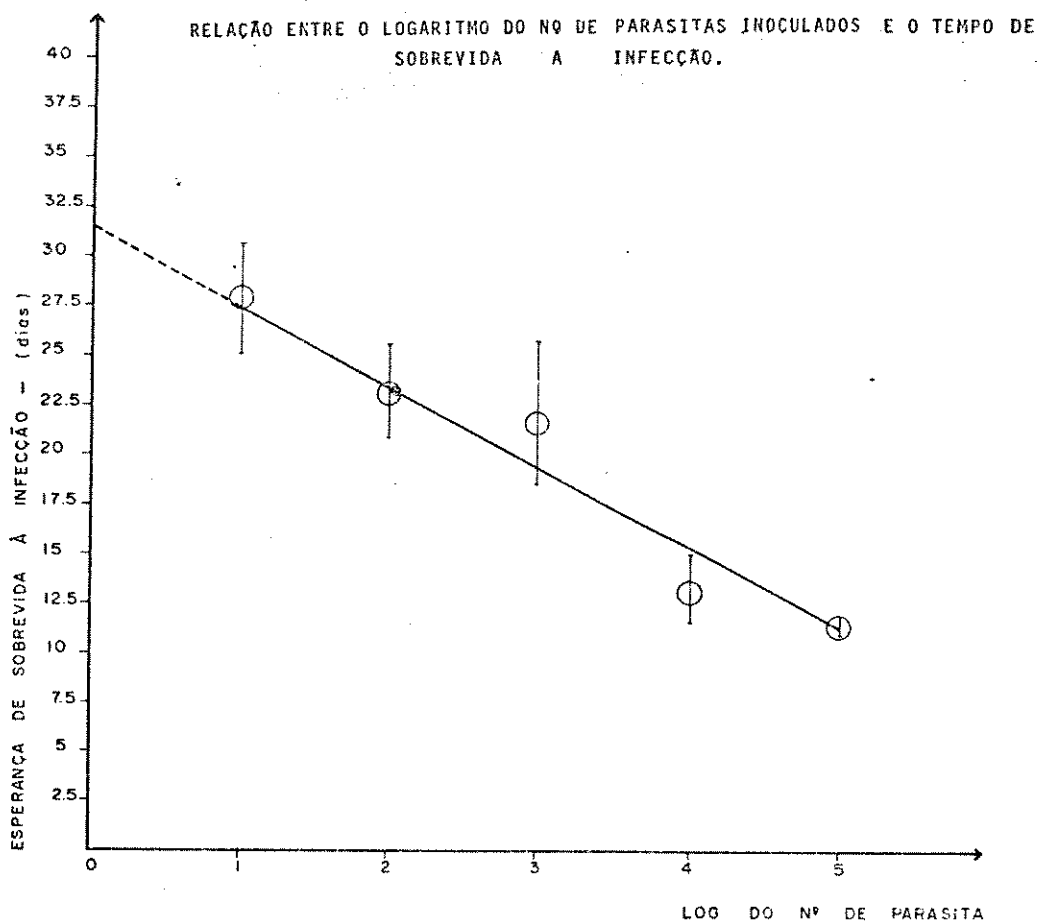
F - é significativa ao nível de 5%\*(p &lt; 0,05)



### 3.3 - RELAÇÃO ENTRE A DOSE DO INÓCULO E O TEMPO DE SOBREVIDA À INFEÇÃO

Os dados relativos à mortalidade acumulada dos grupos de animais inoculados com diferentes doses do parasita, resumido na Fig. II, mostram que a expectativa de sobrevivida está estreitamente relacionada com a dose do inóculo.

FIGURA II



A estimativa do tempo médio de sobrevivida e do respectivo desvio padrão, nas diferentes experiências, foi feita por máxima verossimilhança. Como os dados revelam um forte desvio

da normalidade após simples análise visual, eles foram submetidos a uma transformação, de acordo com a fórmula de Box & Cox,(1964):

$$x^{(\lambda)} = \frac{x - 1}{\lambda}$$

O lambda foi escolhido por uma maximização simultânea da função de verossimilhança dos dados transformados com respeito a lambda, média e desvio padrão usando um programa computacional interativo desenvolvido especialmente para este problema. Esta maximização foi feita independentemente para cada dose e os valores obtidos para lambda são dados na Tabela VIII.

TABELA VIII

Valores de lambda escolhidos para as diferentes doses

Logaritmo da Dose	1	2	3	4	5
Tamanho da Amostra	67	54	14	15	21
Lambda	-1,37	-1,36	-1,29	-2,32	-1,82

O lambda foi escolhido por maximização simultânea da função de verossimilhança.

Como vemos, os valores encontrados de lambda são bastante consistentes para as três primeiras doses, mas variam muito para as duas últimas, em consequência, talvez, do menor tamanho da amostra. Para tornar as estimativas comparáveis entre si, um lambda comum, igual a (-1,3), foi escolhido. As estimativas da média e do desvio padrão, para dada dose, são dadas na Tabela IX.

TABELA IX

Valores da média e do desvio padrão calculadas a partir de Lambda igual a (-1,3).

Logaritmo da dose	1	2	3	4	5
Média	0,7589	0,7562	0,7551	0,7422	0,7371
Desvio Padrão	0,005630	0,006182	0,005392	0,007873	0,003891

Os intervalos aproximados com 95% de confiança para a média são apresentados na Tabela X.

TABELA X

Intervalo de confiança para o tempo médio de sobrevivida nas diferentes doses.

Logaritmo da Dose	Intervalo de Confiança 95%
1	(0,7575244 a 0,7602756)
2	(0,7545175 a 0,7578825)
3	(0,7519873 a 0,7582127)
4	(0,7378396 a 0,7465604)
5	(0,7353288 a 0,7388712)

Após a transformação inversa, as estimativas da sobrevivida média, são mostradas na Tabela XI.

A recuperação dos valores em dia foi retirada da seguinte fórmula:

$$x = \sqrt[\lambda]{\frac{1}{1-y}}$$

sendo  $\lambda = -1,3$

$$x = \left( \frac{1}{1-y} \right)^{1/1,3}$$

TABELA XI

Relação entre o logaritmo do número de parasitas inoculados e a esperança de sobrevivida à infecção em dias.

Logaritmo da Dose	1	2	3	4	5
Nº de animais	67	44	14	15	16
Média (dias)	27,54	23,03	21,64	13,14	11,50
I.C. (95%)	(25,01 a 30,73)	(20,97 a 25,62)	(18,6 a 26,2)	(11,71 a 15,04)	(11,03 a 12,02)

#### 3.4 - AÇÃO DO SORO ANTI-T.cruzi SOBRE A EVOLUÇÃO DA INFECÇÃO EXPERIMENTAL.

Nos Grupos de animais inoculados por via endovenosa, com 0,25ml de salina, soro normal ou soro imune anti-T. cruzi e desafiados 60 minutos após com  $10^2$  ou  $10^5$  formas tripomastigotas, foram analisados os seguintes parâmetros: número de tripomastigotas do dia do pico, tempo de aparecimento do pico de parasitemia e esperança de sobrevivida à infecção.

Num segundo grupo de experiências, destinado a avaliar a ação do soro nos diferentes períodos de infecção, grupos de animais foram inoculados com 0,25 ml, via endovenosa, de soro imune anti-T.cruzi, em diferentes períodos de tempo, antes e após, o estímulo com  $10^5$  formas tripomastigotas. Neste grupo experimental além de se estudar o número de tripomastigotas no dia do pico, tempo de aparecimento do pico de parasitemia e esperança de sobrevivência, procurou-se também estudar os diferentes quadros histopatológicos de diferentes órgãos: fígado, baço, coração.

A comparação dos dados obtidos nos animais inoculados com salina e soro normal não mostrou ocorrência de diferenças significativas em qualquer dos parâmetros estudados.

Os dados apresentados na Tabela XII mostram que não houve alterações significativas no tempo de aparecimento do pico de parasitemia quando os animais eram tratados 60 minutos antes com soro imune, mesmo quando estimulados com  $10^2$  formas tripomastigotas.

TABELA XII

Ação do soro anti-T.cruzi sobre o tempo de aparecimento do pico de parasitemia.

Tratamento com soro	Nº de <u>T.cruzi</u> inoculado	Nº de camundongos	Tempo de aparecimento do pico de parasitemia (dias)
S. a-T.cruzi	$10^5$	15	8
S. Normal	$10^5$	21	7,2 $\pm$ 0,5
S.a-T.cruzi	$10^2$	09	13,1 $\pm$ 1,16
S.normal	$10^2$	10	11,5 $\pm$ 0,7

Diferenças altamente significativas foram observadas no nível de parasitemia dos animais tratados com este soro imune e estimulados com  $10^5$  parasitas ( $p < 0,01$ ) (Tabela XIII). Pode-se observar nesta tabela que o soro imune também exerceu uma ação sobre o nível de parasitemia dos animais inoculados e estimulados com  $10^2$  parasitas, embora esta diferença seja aparentemente menos marcante do que quando os animais estimulados com  $10^5$  parasitas.

TABELA XIII

Ação do soro anti-T.cruzi, sobre o nível de parasitemia

Tratamento com soro	Nº de T.cruzi inoculados	Nº de camundongos	Nº de tripomastigotas/ml, no dia do pico parasitêmico ( $\times 3 \times 10^4$ )	
S.a-T.cruzi	$10^5$	18	26,7* $\pm$	31,3
S.Normal	$10^5$	21	241,7 $\pm$	186
S.a-T.cruzi	$10^2$	10	44,8 $\pm$	34,6
S.Normal	$10^2$	10	86,3 $\pm$	51,9

\*p &lt; 0,01%

Diferenças altamente significativas ( $p < 0,01$ ) foram observadas na sobrevivência dos animais tratados com soro imune e respectivos grupos controles estimulados com  $10^5$  parasitas (Tabela XIV). Enquanto que os animais do grupo controle sobreviveram apenas 10 dias, os animais tratados com soro anti-T. cruzi sobreviveram 42 dias.



TABELA XIV

Ação do soro anti-T.cruzi, na esperança de sobrevivência dos animais inoculados com  $10^5$  tripomastigotas.

Logaritmo da dose	Soro anti-T-cruzi 5	Soro Normal 5
Amostra	18	21
Média	0,7633476	0,7341618
Média (em dias)	42,46*	10,75
I.C. 95%	(0,7586880 a 0,7680072)	(0,7353288 a 0,7388712)
I.C. 95% (em dias)	(27,11 a 142,114)	(11,03 a 12,02)

\*  $p < 0,01$

Também foram marcantes as diferenças no tempo de sobrevivência à infecção entre os animais tratados com soro imune e desafiados com a dose de  $10^2$  formas tripomastigotas e os animais controle, tratados com soro normal. (Tabela XV).

TABELA XV

Ação do soro anti-T.cruzi na esperança de sobrevivência dos animais inoculados com  $10^2$  formas tripomastigotas.

Log da dose	S.a- <u>T.cruzi</u> 2	S.Normal 2	S.a- <u>T.cruzi</u> 2	S.Normal 2
Amostra	4	5	5	5
Média		0,7563832	0,764325	0,7572436
Média (em dias)	53*	23,29	48,83 *	24,56
I.C. 95%		(0,7522639 a 0,7605025)	(0,7551100 a 0,7735400)	(0,7541201 a 0,7603671)
I.C. (em dias)		(18,80 a 31,35)	(21,65 a 53,95)	(20,55 a 30,98)

\*p < 0,01

O soro imune anti T.cruzi, diluído dez (10) e cem (100) vezes, não altera de forma significativa ( $p > 0,05$ ) o nível de parasitemia e a esperança de sobrevivência, conforme mostram os dados das Tabelas XVI, XVII, em relação ao controle, ou seja, aos animais tratados com soro normal.

TABELA XVI

Ação do soro anti-T.cruzi, diluído 1/10 e 1/100, sobre o nível de parasitemia.

Tratamento com soro	Nº de <u>T.cruzi</u> inoculado	Nº de camundongos	Nível de parasitemia/ml no pico parasitemico ( $\times 3 \times 10^4$ )	
			Média	Desvio Padrão
S.Normal	$10^2$	5	92,20	54,7
S.A- <u>T.cruzi</u>				
1/1*	$10^2$	5	22,00 *	30,8
1/10	$10^2$	5	171,20	173,0
1/100	$10^2$	5	266,00	156,0

\*  $p < 0,05$

TABELA XVII

Ação do soro anti-T.cruzi, diluído 1/10 e 1/100, sobre o tempo de sobrevivência à infecção.

	S.Normal	Soro a-T.cruzi		
	1/1	1/1*	1/10	1/100
Log.da dose	2	2	2	2
Amostra	5	5	5	5
Média	0,7572436	0,764325	0,7568361	0,7523009
Média (dias)	24,56	48,83*	23,93	18,83
I.C. 95%	(0,7541201 a 0,7603671)	(0,75511 a 0,77354)	(0,7511848 a 0,7624874)	(0,7468836 a 0,7577182)
I.C. (dias)	(20,55 a 30,98)	(21,65 a 53,95)	(17,93 a 38,23)	(15,21 a 25,33)

\*  $p < 0,05$

Os resultados obtidos num segundo grupo de experiências, quando animais foram inoculados em diferentes períodos de infecção (3 dias ou 60 minutos antes do estímulo), mostraram uma alteração significativa no nível de parasitemia e na esperança de sobrevivência, mas não no dia de aparecimento do pico de parasitemia.

Nos animais inoculados 3 ou 7 dias após o estímulo observou-se alterações significativas apenas no nível de parasitemia, não se tendo observado alterações na esperança de sobrevivência nem no dia do pico (Tabelas XVIII e XIX).

O exame histológico, realizado 7 dias após a infecção com Trypanosoma cruzi, dos diferentes grupos de tratamento mostrou que os animais tratados com soro imune anti-Trypanosoma cruzi, antes do inóculo, apresentavam apenas um pequeno número de ninhos de amastigotas nos diferentes órgãos examinados, ao passo que os animais que receberam o soro 7 dias após o inóculo ou que receberam apenas o soro normal apresentaram um maior número de ninhos de amastigotas no baço. Nos demais órgãos (baço e coração) o parasitismo foi sempre muito baixo, inclusive nos controles, o que dificulta a comparação.

O infiltrado inflamatório mononuclear, embora escasso no coração em todos os grupos, era mais frequentemente identificado nos animais que receberam soros imunes.

Estas experiências foram analisadas em relação aos resultados obtidos em camundongos tratados com soro normal de CBA, nas mesmas condições ambientais e realizadas no mesmo dia.

TABELA XVIII

Ação do soro anti-T.cruzi nos diferentes períodos da infecção experimental.

Tratamento	Nº de <u>T.cruzi</u> inoculado	Nº de camundongos	T.P. (dias)	Nº de <u>T.cruzi</u> /ml no pico parasitêmico (.3x10 <sup>4</sup> )
S.Normal	10 <sup>5</sup>	11	7,0 -	181,4 ± 59,7
<u>S.A-T.cruzi</u>				
3 dias antes	10 <sup>5</sup>	9	7,2 ± 0,44	21,3**± 9,62
60 minu- tos antes	10 <sup>5</sup>	5	8,0 -	19,4**± 9,10
3 dias depois	10 <sup>5</sup>	10	7,37 ± 0,51	50,00* ± 20,0
7 dias depois	10 <sup>5</sup>	10	6,30 ± 1,0	70,3* ± 20,9

\* p < 0,05

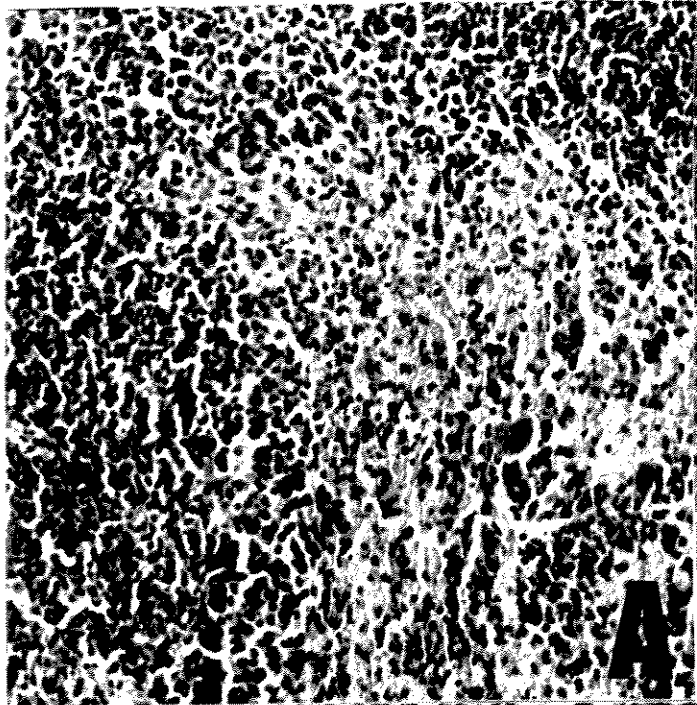
\*\* p < 0,01

T.P. = Tempo de aparecimento do pico de parasitemia.

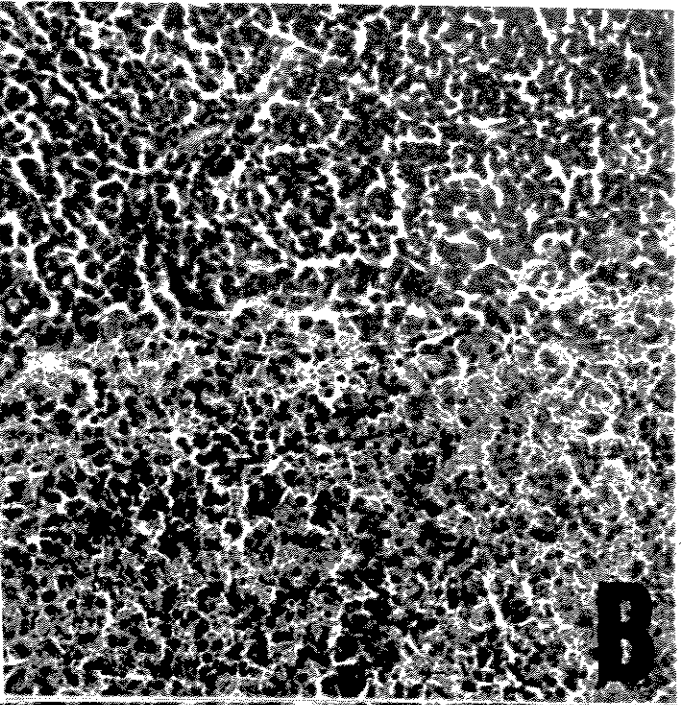
TABELA XIX

Ação do soro anti-T.cruzi nos diferentes períodos da infecção experimental sobre o tempo de sobrevivência à infecção.

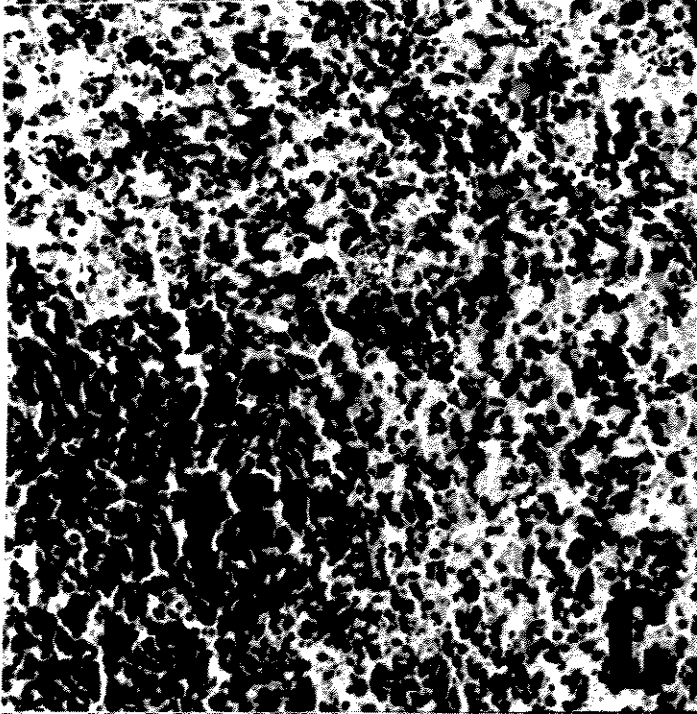
	Soro a- <u>T.cruzi</u> 3 dias antes	Soro a- <u>T.cruzi</u> 60' antes	Soro a- <u>T.cruzi</u> 3 dias depois	Soro a- <u>T.cruzi</u> 7 dias após	Soro Normal 60' antes
Log da dose	5	5	5	5	5
Amostra	9	5	10	10	11
Média	0,7633430	0,7700744	0,7435830	0,7405957	0,7396032
Média em dias	42.4398407	189.1687581	13.6823051	12.5705021	12.2453080
I.C.	(0,7544800 a 0,7722060)	(0,7505998 a 0,7895490)	(0,7414822 a 0,7456838)	(0,7384699 a 0,7427215)	(0,7374977 a 0,7417087)
I.C. em dias	(20.9390193 a 71.7466643)	(17.4960159 a 16.3673099)	(12.8783040 a 14.6119691)	(11.8967691 a 13.3389761)	(11.6154163 a 12.9597319)



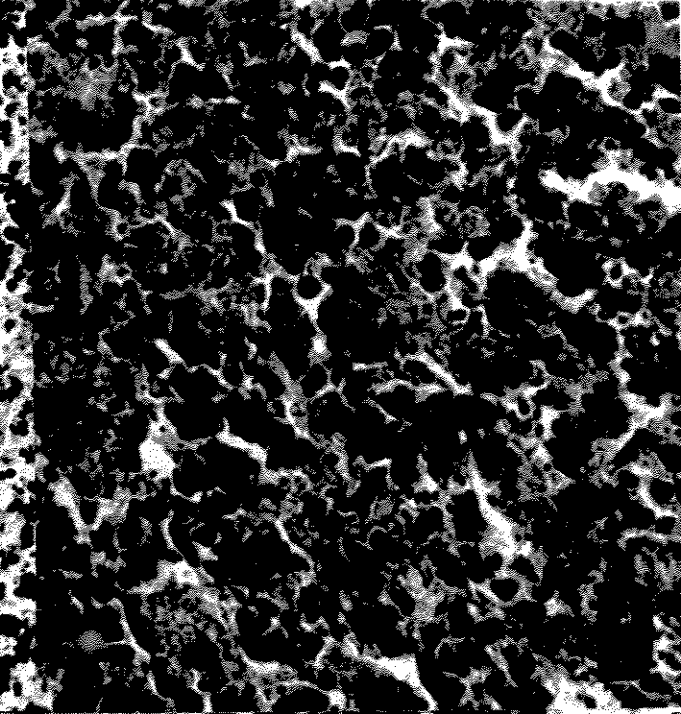
**A**



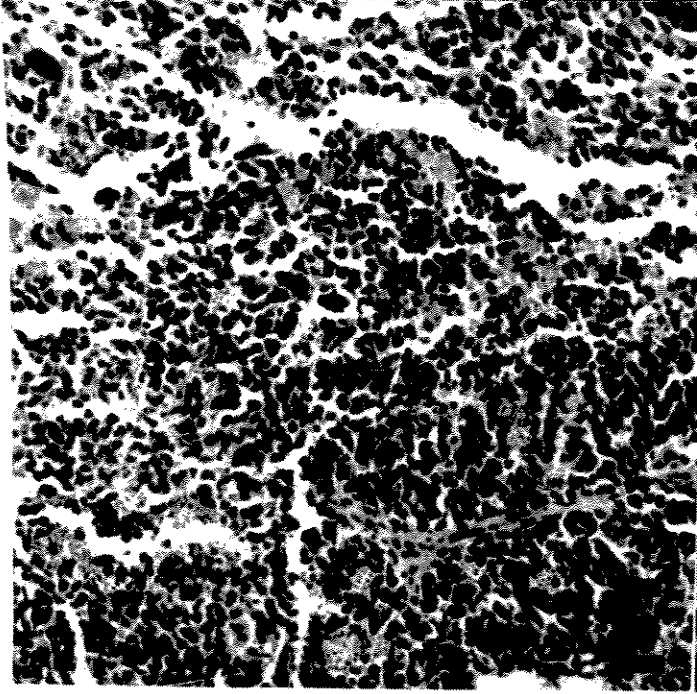
**B**



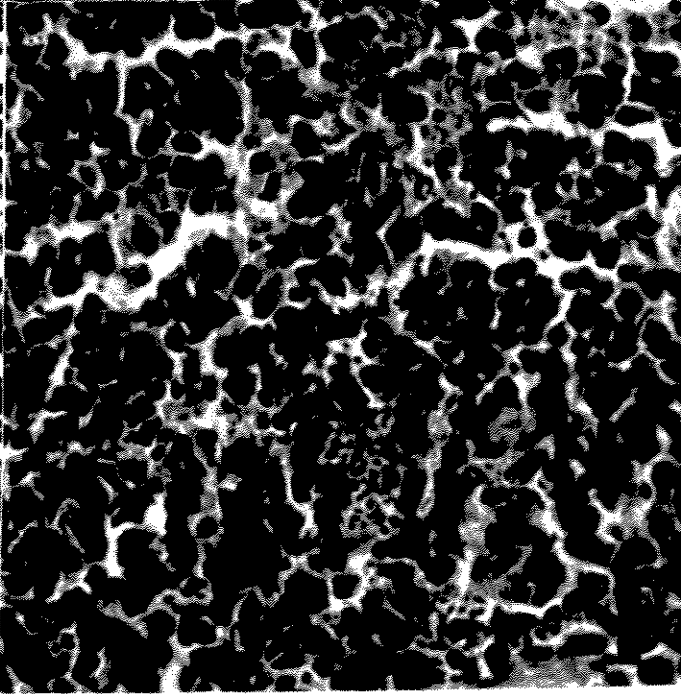
**A**



**B**



**A**



**B**



FIGURA 3 - BAÇO

A e B - Baço de CBA no 7º dia de infecção ( $10^5$  parasitas) tratados com soro anti-Trypanosoma cruzi 60 minutos antes do inóculo. Ausência de amastigotas no campo (A = objetiva 6,3X; B = objetiva 16X).

C e D - Baço de CBA no 7º dia de infecção ( $10^5$  parasitas) tratado com soro anti-Trypanosoma cruzi no pico parasitêmico, 7º dia. Notar a presença de ninhos de amastigotas. (C = objetiva 16X; D = objetiva 40X).

E e F - Baço de CBA no 7º dia de infecção ( $10^5$  parasitas) tratado com soro normal de CBA 60 minutos antes do inóculo. Notar os diversos ninhos de amastigotas. (E = objetiva 16X; F = objetiva 40X).

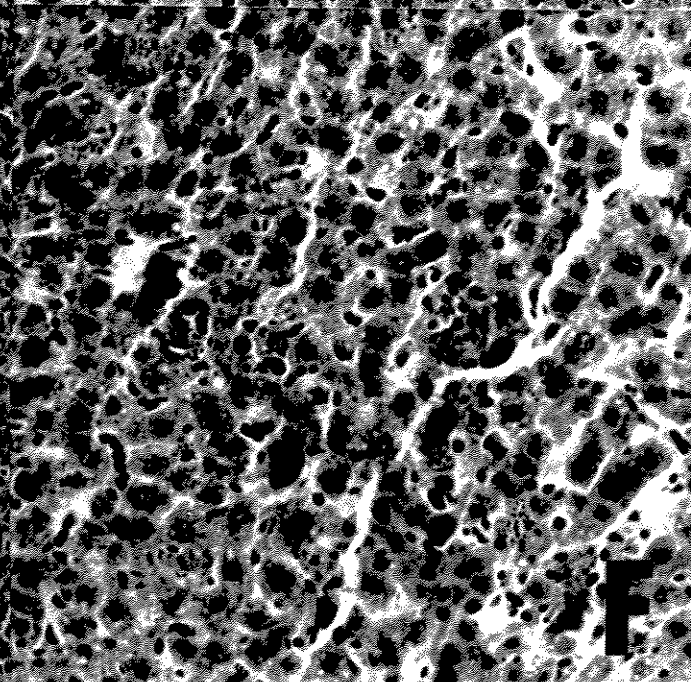
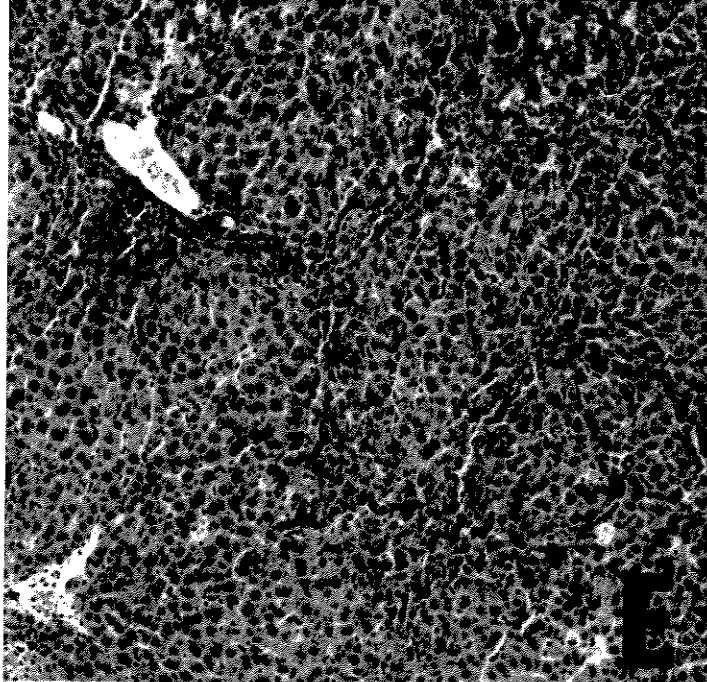
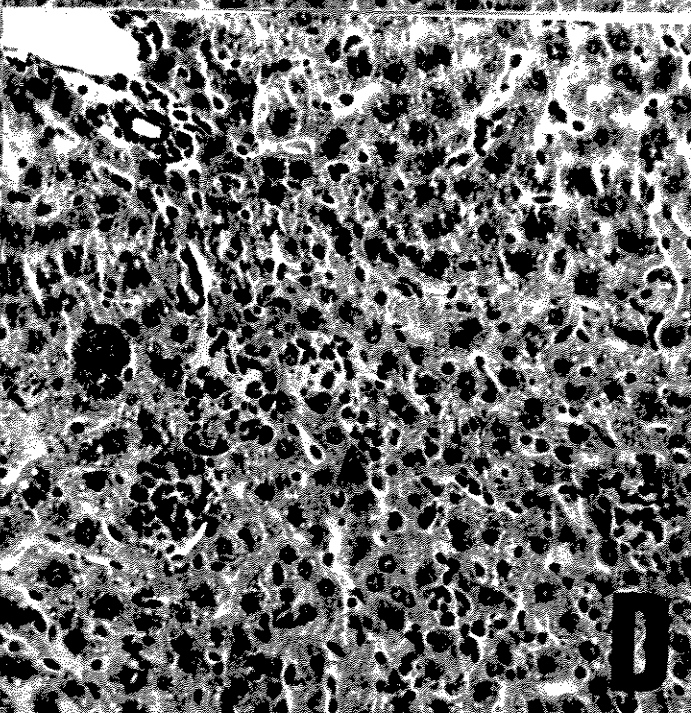
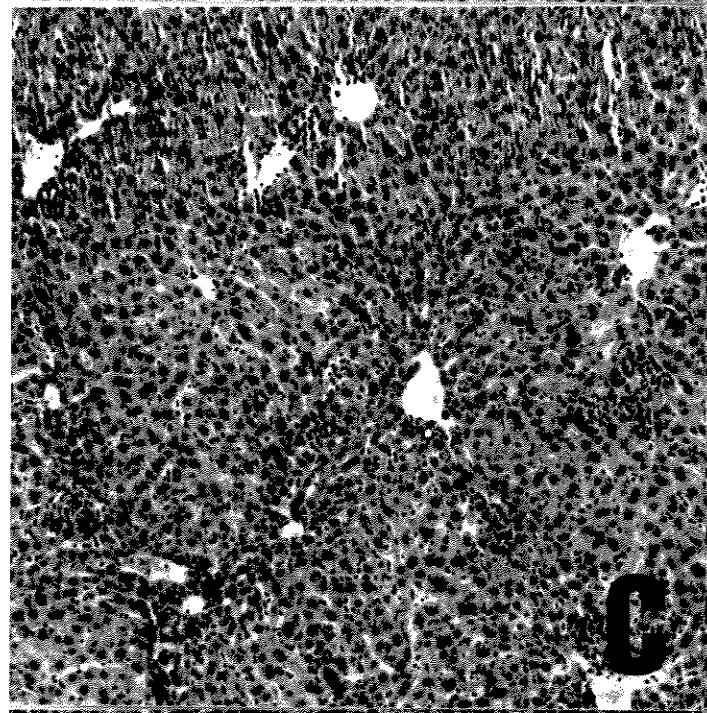
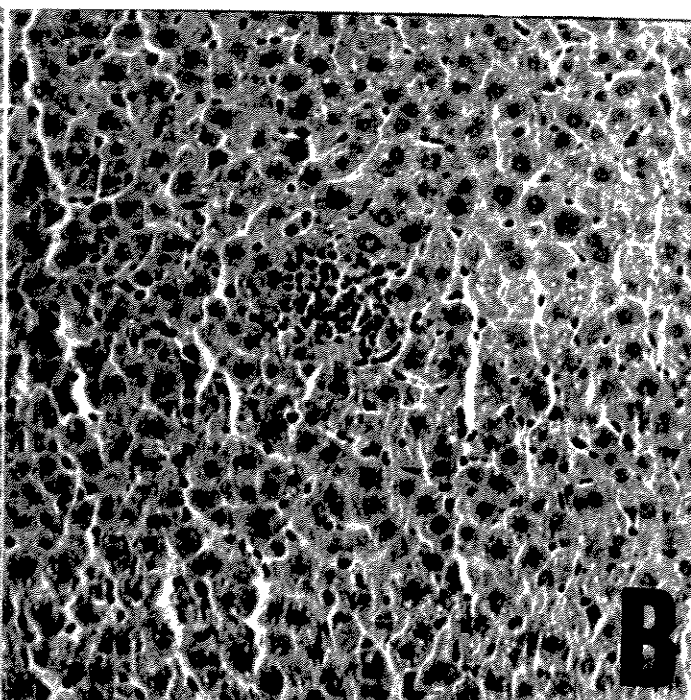
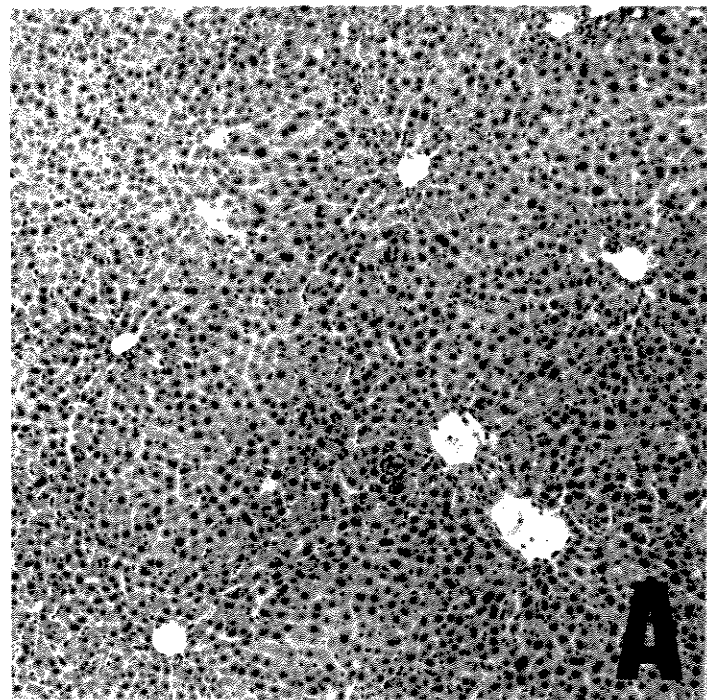


FIGURA 4 - FÍGADO

- A e B - Fígado de CBA no 7º dia de infecção ( $10^5$  parasitas) tratado com soro anti-Trypanosoma cruzi 60 minutos antes do inóculo. Notar exudato mononuclear em pequenos focos e proliferação de células de Kupffer, bem visíveis na Figura B (A = objetiva 6,3; B = objetiva 40X).
- C e D - Fígado de camundongo no 7º dia de infecção ( $10^5$  parasitas) tratado com soro anti-Trypanosoma cruzi no pico parasitêmico, 7º dia. Notar maior número de focos de exudato mononuclear (C = objetiva 16X); na Figura D (objetiva 40X) presença de ninho de amastigotas.
- E e F - Fígado de camundongo no 7º dia de infecção ( $10^5$  parasitas) tratados com soro normal de CBA 60 minutos antes do inóculo. Notar numerosos focos de exsudação de mononuclear (E = objetiva 16X) e na Figura F (objetiva 40X) presença de pseudocistos de amastigotas.

#### 4. D I S C U S S Ã O

A evolução do T.cruzi no hospedeiro vertebrado é complexa e faltam informações importantes sobre o que ocorre in vivo. Por exemplo, não se sabem quantos tripomastigotas metacíclicos estão presentes nas fezes do reduvidio no momento da infecção do vertebrado, ou mesmo qual a relação existente entre a dose de parasitas inoculados e a gravidade da infecção; ou então, a relação entre a concentração de parasitas inicial e o tempo necessário para a evolução dos ciclos parasitários atingirem o nível máximo de infestação ou de parasitemia.

Os resultados obtidos na presente pesquisa tentando obter informações sobre as relações entre dose e efeito demonstraram uma relação linear entre o logaritmo da dose e o dia ou tempo de evolução necessário para o aparecimento do pico de parasitemia. Como consequência, a um dado tempo necessário para se

atingir o pico pode-se correlacionar uma determinada concentração de parasitas inoculados, desde que mantidas a raça do camundongo e a cepa de T.cruzi.

A existência desta relação entre dose e dia de aparecimento do pico, ao que tudo indica, é uma consequência do modo de reprodução do parasita no hospedeiro vertebrado. Experiências com cultura de células Hela (Meyer & Oliveira, 1948; Dvorak & Hyde, 1973; Kreier et al., 1976), infectadas com T.cruzi, mostraram que um único parasita, quando penetra na célula, se multiplica a cada 6 a 12 - 13,5 horas (Alcântara 1979; Meyer & Oliveira 1948; Dvorak & Hyde 1973), por fissão binária, levando-se em média 5 dias ( de 4 a 6,5 dias) para a ocorrência do rompimento da célula e a liberação do parasita. Portanto, a infecção é caracterizada por ondas de parasitas liberados no meio extracelular.

Os tripomastigotas liberados permanecem no meio extracelular durante tempo variável, de acordo com a amostra do T.cruzi. Brener 1969, 1977 demonstrou que, em sangue de camundongos albinos, a cepa Y não é mais detectada após 4 a 6 horas ( 24 horas ) do inóculo e a cepa CL, após 3 dias.

A penetração dos protozoários liberados em novas células se dá ao acaso, segundo uma distribuição do tipo binomial negativa  $f(x) = \binom{r+x-1}{x} t^r \cdot q^x \cdot I_{[0,1,\dots]}(x)$ , (Dvorak 1971, 1977), encontrando-se portanto, "maior número de parasitas por células e mais células não infectadas do que se esperaria numa distribuição do tipo Poisson (Dvorak 1977).

Observações *in vitro* mostram que o número de parasitas produzidos na célula hospedeira é diretamente proporcional ao número de parasitas que penetraram (Dvorak & Hyde, 1973) e ao tamanho da célula hospedeira (Meyer & Oliveira, 1948). Disto pode-se inferir que é menor o tempo necessário para reproduzir a quantidade de parasitas suficiente para ocupar todo o espaço da célula hospedeira, se maior número de tripomastigotas foi utilizado na infecção. Portanto, quanto maior o inóculo mais células serão parasitadas e a probabilidade de uma mesma célula ser infectada por mais de um parasita será maior. Conseqüentemente, haverá uma antecipação no tempo da esclosão e um encurtamento do período pré-patente e do tempo de aparecimento do pico de parasitemia.

Em conseqüência do ciclo intracelular do T. cruzi seria de se esperar que o animal apresentasse, periodicamente, ondas sucessivas de parasitemia, que atingiriam níveis cada vez mais altos. Considerando, entretanto, que a liberação dos protozoários é assincrônica, deve-se esperar que o nível de parasitemia cresça contínua e gradativamente, de modo exponencial, até que o número de parasitas eliminados da circulação suplante o número de parasitas liberados.

A determinação do número de parasitas circulantes representa um momento fugaz do nível de parasitemia, de modo que se espera uma grande variação entre os diferentes animais, como efetivamente ocorreu na presente observação. Contudo, a despeito desta variação é possível comparar-se grupos de animais, desde que os níveis de parasitemia sejam determinados no pico.

O pico parasitêmico resulta fundamentalmente de dois fatores: de um lado, da liberação de tripomastigotas na circulação e, por outro, da eliminação dos parasitas da corrente sanguínea ou do meio extracelular.

O declínio da parasitemia pode ser dar como consequência da eliminação dos parasitas circulantes, através da penetração ativa dos tripomastigotas em diferentes células (Dvorak 1977; Kreier et al., 1976; Meyer & Oliveira 1948), ou pela "fagocitose induzida", (Nogueira & Cohn 1976), e por diferentes mecanismos de defesa. De fato, sabe-se que diversos mecanismos de defesa acham-se em jogo na resistência contra o T.cruzi (Krettli & Brener, 1976; Nogueira et al., 1980; Madeira et al., 1979).

Parece não haver dúvidas de que esses fatores estão presentes nos animais considerados susceptíveis. Primeiro, porque a susceptibilidade é um fenômeno contínuo (Existem graduações de resistência que variam desde raças altamente susceptíveis, até à aquelas resistentes). Segundo, porque os animais considerados moderadamente susceptíveis, como o BALB/c, podem aumentar a susceptibilidade pelo bloqueio de células imunologicamente competentes. Os animais BALB/c  $nu^+ / nu^+$  são muito mais susceptíveis do que os BALB/c,  $nu^+ / nu^-$  (Trischmann et al., 1978).

Um pico de parasitemia pode ser simulado bem próximo aos dados experimentais por um programa de computador, baseando-se na relação entre o número de parasitas e plasmócitos em um dado momento da infecção. Herbert (1982) simulou a curva de

crescimento e de remissão do T.brucei em camundongos, tomando por base a relação entre o número de parasitas e o número de plasmócitos em dado momento da infecção, admitindo-se que os parasitas são destruídos durante todo o processo infeccioso, de forma crescente, como o aumento da quantidade de anticorpos.

Existem dados que sugerem a mobilização da resistência do hospedeiro durante a infecção. Hanson (1977) demonstrou em camundongos  $CF_1$  que o aumento nas concentrações da gama globulinas totais, bem como de IgG, coincidiu com a ocasião em que o número de parasitas era decrescente, atingindo o máximo na 6ª semana de infecção, quando o número de parasitas no sangue e nos órgãos encontrava-se grandemente reduzido. A concentração de IgM atingiu o pico na 3ª semana de infecção, coincidindo com a fase aguda da doença.

Os dados apresentados no presente trabalho, sobre a relação entre o pico de parasitemia e a dose inoculada, também sugerem que esta resistência nos diferentes grupos de animais infectados foi ativada. De fato, seria de se esperar que animais infectados com doses crescentes apresentassem níveis de parasitemia proporcionalmente maiores. No entanto, os dados mostraram que não houve diferença significativa entre os picos das quatro primeiras doses, num nível de significância de 5%. Somente a última dose, quando os animais inoculados com  $10^5$  tripomastigotas, apresentaram níveis de parasitemia superiores aos demais grupos, sugerindo que, neste caso, provavelmente, está-se ultrapassando o limite de ação dos mecanismos imunológicos de resistência.



A existência de mecanismos de resistência, que operam mesmo em animais susceptíveis como CBA, está demonstrada em experiências nas quais os animais são inoculados em  $10^2$  tripomastigotas e tratados com o soro anti-teta. Os resultados exibem uma parasitemia e mortalidade mais altas nestes, do que nos animais tratados com soro normal (experiências em andamento).

A fase descendente do pico representa, portanto, o predomínio dos mecanismos de resistência conseqüentes a estímulo antigênico, muito embora nesta ocasião o animal já possa ter lesões irreparáveis, que podem conduzi-lo à morte num futuro próximo.

O fato de T.cruzi ter o seu ciclo reprodutivo intracelular torna-o extremamente lesivo à célula hospedeira. Tafuri (1971) considera que as lesões resultam tanto da ação direta dos protozoários sobre as células como também das reações inflamatórias. Estas reações podem ser observadas tanto junto a um ninho de amastigotas quanto em células vizinhas não parasitadas e até mesmo no interstício ou em células relativamente distantes do ninho de amastigotas.

Os resultados obtidos neste trabalho, relacionando inóculos crescentes de tripomastigotas versus esperança de sobrevivência em camundongos CBA, demonstram que a morte ocorreu em tempo menor quando se aumentou o inóculo, revelando relação inversa entre o número de parasitas inoculados e o tempo médio de sobrevivência. A dispersão dos dados em torno à média é bem menor com doses mais altas ( $10^4$  e  $10^5$  tripomastigotas/ 0,1 ml), sendo que esta

última apresentou dados altamente reprodutíveis com uma baixíssima dispersão. Estes dados indicam que em experiências que envolvam esperança de sobrevivência deve-se utilizar doses altas para o estímulo ( $10^4$  ou  $10^5$ ), por apresentarem maior reprodutibilidade.

Os dados mostram que o CBA é extremamente sensível ao T.cruzi. Os animais inoculados com apenas 10 parasitas apresentam 100% de mortalidade dentro de 55 dias (embora os níveis de parasitemia nestes animais após a ocorrência dos picos tenham caído a níveis difíceis de detectar pelo método utilizado). Entretanto, a morbidade causada pela inoculação de uma quantidade de 10 parasitas provoca a morte num tempo médio semelhante àquele, observado com a inoculação de 1000 parasitas. McHardy (1977) e Trischmann et al.(1978) observaram resultados semelhantes aos apresentados neste trabalho, isto é, de que a percentagem de mortalidade dos animais CBA até a 8ª semana de infecção aumentava com a dose inoculada. Corsini et al.(1980) mostraram que ocorre uma mortalidade de 100% no 60º dia de infecção entre os CBA inoculados com  $10^2$  formas tripomastigotas de cepa Y.

Alguns dados existentes na literatura sugerem uma relação entre nível de parasitemia e mortalidade. Pizzi et al. (1949) mostraram que a resistência e sensibilidade à infecção por T.cruzi estão historicamente vinculados às linhagens genéticas do camundongo e Trischmann et al. (1978) mostraram que as linhagens susceptíveis apresentam altas parasitemias, enquanto, linhagens resistentes uma baixa parasitemia. Estes mesmos autores mostraram que animais com resistência moderada quando inoculados com um

número maior de parasitas, apresentam parasitemia e mortalidade mais elevados. Contudo, pode-se obter uma alta mortalidade em animais (CBA x C57BL/10)F<sub>1</sub>, que são considerados resistentes e cuja parasitemia se eleva apenas até 600/mm<sup>3</sup>, nível esse bem próximo aos animais inoculados com doses menores (10<sup>3</sup>) e que apresentam 100% de sobrevivência ( Corsini et al. , 1982) , Wrightsmann et al. (1982) demonstraram que linhagens de camundongos isogênicos, apresentando altos níveis parasitêmicos e baixos níveis parasitêmicos, morrem na mesma época, quando inoculados com 10<sup>3</sup> parasitas de cepa Peru, de alta virulência. Resultados obtidos na presente investigação mostraram que os animais inoculados com doses crescentes de parasitas apresentam sobrevidas significativamente menores, embora estes mesmos grupos (10<sup>1</sup>, 10<sup>2</sup>, 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup>) apresentassem praticamente o mesmo nível de parasitemia. Estes dados indicam que, embora possa controlar o nível de parasitemia, o animal é incapaz de controlar a ocorrência de lesões mortais, que devem ser, provavelmente, produzidas mais cedo e em maior número, nos animais que receberam maior dose.

Pode-se admitir, portanto, as seguintes hipóteses:

- a) inóculos maiores induzem lesões mais graves;
- b) uma vez efetivadas as lesões teciduais iniciais, estas tornam-se cumulativas à medida que o parasita vai se expandindo;
- c) atingindo o nível máximo de parasitemia, o tempo de sobrevi-

da será proporcional às perdas orgânicas irreversíveis, já concretizadas, antes mesmo do pico;

- d) partindo-se de um nível correlato ao inóculo, as lesões são progressivamente proporcionais ao número de parasitas;
- e) o controle do nível de parasitas circulantes é realizado de modo independente ao controle das lesões letais .

Provavelmente, as lesões histopatológicas iniciais são decisivas na resolução da patogenia. Quando o número de parasitas inoculados for grande e ou a virulência da amostra for alta, estas lesões serão intensas e atingirão grande parte dos órgãos vitais, como o coração e cérebro. Nestes casos, o prognóstico será de morte precoce, independentemente da resistência ou sensibilidade do animal hospedeiro (Wrightsmann et al., 1982).

Por outro lado, a qualidade da resistência à instalação das lesões iniciais é fundamental na evolução da cronicidade ou no prolongamento da sobrevivida, como ficou evidente em animais considerados considerados resistentes ou sensíveis (Tanowitz et al., 1981). Estes autores mostraram que existem anormalidades a nível bioquímico nos hospedeiros sensíveis  $C_3H$ , tal como, a diminuição da atividade enzimática de acetilcolinotransferase em coração e cérebro, enquanto que camundongos resistentes  $B_6$  não apresentam depleção dos níveis cardíacos ou cerebrais desta enzima. Mostraram também que as lesões teciduais inflamatórias e a presença de amastigotas no coração de  $C_3H$  eram detectadas mais cedo e em maior

quantidade do que nos animais resistentes B<sub>6</sub>.

Em camundongos, a fase aguda caracteriza-se por edema generalizado, envolvimento de linfonodos, miosite, miocardi<sub>i</sub>te difusa aguda, além de fenômenos gerais de congestão visceral. Nos animais sobreviventes até 40 ou 80 dias, observam-se apenas raros focos de infiltração mononuclear no coração (Collier et al., 1942). Estas lesões causam os sintomas que refletem a patogenia da fase aguda que, por apresentarem um parasitismo maior do que na fase crônica, podem levar o hospedeiro à morte (Frederici 1964).

Os dados apresentados no presente trabalho mostram que os animais que receberam soro anti-T.cruzi crônico sobrevivem à um desafio de  $10^2$  e  $10^5$  formas tripomastigotas sanguíneas. Dados semelhantes foram relatados por Culbertson & Kolodny (1938) e Kolodny (1939) ao observarem que soro de ratos sobreviventes à infecção aguda, era capaz de promover uma proteção passiva, em outros indivíduos. Krettli (1978) observou que o soro a-T.cruzi obtido em camundongos infectados com a cepa Y na fase crônica protegiam passivamente os animais de um estímulo com uma cepa homóloga, embora não protegesse, quando o estímulo era feito com a cepa CL, mostrando uma restrição na proteção. Mais recentemente esta especificidade em relação à cepa foi também observada quando se utilizou a amostra F (Kloetzel & Lafaille 1983). A proteção passiva conferida por soro crônico, se deve aos anticorpos da classe IgG (Castelo Branco, 1978) e mais especificamente à subclasse IgG2b (Takerara et al., 1981). Contudo a proteção na fase crônica não se deve exclusivamente à presença de anticorpos, mas também a pre

sença de linfócitos B e T, conforme mostradas por Scott (1981a) e (1981b) nas experiências de transferência adotiva.

O bloqueio das células imunocompetentes pelo tratamento com ciclofosfamida não altera os níveis de anticorpos dos animais cronicamente infectados, apesar de promover uma agudização da doença.

Os nossos dados mostraram que a imunização passiva não alterou o dia de aparecimento do pico de parasitemia. Considerando que o pico de parasitemia é uma resultante do crescimento exponencial dos microorganismos e do aumento gradativo da resistência do hospedeiro pode-se admitir, que os anticorpos presentes no soro imune crônico não tiveram ação mensurável quer sobre o aumento dessa resistência, quer sobre a multiplicação do parasita. Esses dados não permitem apoiar a hipótese de que os anticorpos atuariam através de um mecanismo de lise. As experiências de Krettli, mostram que, *in vitro*, os anticorpos podem desencadear fenômeno lítico, por ativação do complemento (Krettli, 1978). A associação do desaparecimento do anticorpo lítico com a cura da doença, deve supor que a proteção, *in vivo*, se deva, fundamentalmente, a um fenômeno de lise (Krettli & Brener, 1982 ; Krettli et al., 1982 ). As experiências presentes não excluem a possibilidade de ocorrência de um fenômeno lítico contribuindo para a proteção. Contudo, o fato de que não houve alteração no dia de aparecimento do pico, mesmo nas experiências em que se utilizava pequenos desafios de  $10^2$ , sugere que o mecanismo de lise *in vivo* não atingiu a totalidade da pequena população de parasitas inoculados. O que indica que uma

quantidade apreciável desses parasitas sobrevivem à possível lise.

Stefani et al. (1983) demonstraram que a atividade de lítica pertence às subclasses IgG1, IgG2a, IgG2b e provavelmente à IgG3. Entretanto Takerara et al. 1981, não encontraram atividade protetora nos anticorpos da subclasse IgG1, que se apresentam tão líticos quanto as IgG2. Martins et al. (1982) sugerem que anticorpos líticos são capazes de mediar ADCC. Por outro lado as experiências utilizando camundongos descomplementados para a infecção por T.cruzi, apresentam resultados contraditórios. Se por um lado Budzko et al. (1975) observaram um aumento da parasitemia e da mortalidade, por outro lado, Krettli (1978) e Dalmaso (1980) observaram que camundongos deficientes em C<sub>5</sub> e cobaias deficientes em C<sub>4</sub>, apresentaram um perfil parasitêmico e mortalidade semelhante aos animais não descomplementarizados. Krettli & Pontes de Carvalho (1983) demonstraram que camundongos descomplementarizados por tratamento com veneno de cobra e infectados com amostras Y, Btry, apresentaram infecção menos severa, bem como, a pré-incubação desta cepa Y com soro humano normal, como fonte de complemento, facilitou a infecção pelo T.cruzi. Estes dados sugerem que o mecanismo de lise não é fundamental para a proteção.

Não há dúvida de que o soro imune tem um papel importante no controle do nível de parasitemia. Esta ação pode ser demonstrada nas experiências em que os animais eram estimulados com 10<sup>5</sup> parasitas. Podemos comprovar uma diferença altamente significativa entre os níveis parasitêmicos dos animais tratados com soro anti-T.cruzi e os respectivos controles. Esta redução

no nível de parasitemia foi observada mesmo naqueles animais que foram estimulados 7 dias antes e receberam o soro no dia do pico de parasitemia. Entretanto a ação foi menos aparental nos animais estimulados com  $10^2$  parasitas, em que o pico de parasitemia ocorre no 13º dia, ou nos animais inoculados com o soro imune 7 dias antes e estimulados com  $10^5$  tripomastigotas sanguícolas. Estes dados indicam que o controle de parasitemia depende muito provavelmente da concentração de anticorpos e que os parasitas em circulação são rapidamente removidos quando em presença deste soro. De fato os animais inoculados com soro imune 7 dias após a infecção com  $10^5$  parasitas, no pico parasitêmico, apresentaram reduzido nível de parasitemia, 1 hora após a inoculação do soro.

O fato dos animais inoculados com  $10^2$  parasitas apresentarem uma redução menos marcante da parasitemia, que os animais estimulados com  $10^5$ , se deve, muito provavelmente, ao fato da quantidade de anticorpos no dia dos respectivos picos de parasitemia ser mais baixa. Esta observação está de acordo com as informações existentes com o "turn-over" das imunoglobulinas, cuja concentração é reduzida em aproximadamente 50%, a cada 07 dias. Neste caso os parasitas que estaria na circulação no 14º dia de infecção encontrariam os títulos de anticorpos duas vezes mais baixos do que os parasitas que se encontram na circulação no 7º dia. Os resultados obtidos nos experimentos que utilizam soro imune diluído 1/10 e 1/100 corroboram este raciocínio, pois mostram uma perda da capacidade de redução dos níveis parasitêmicos. Resumindo: a proteção mediada por anticorpos está diretamente relacionada com o título de anticorpos e com a afinidade dos anticorpos. So-



ros obtidos na 6ª semana de infecção foram os que apresentaram a maior capacidade de proteção, em relação aos de 4ª, 5ª, 7ª e 8ª semanas (Repka et al. 1982)

Os dados relativos aos níveis de parasitemia e mortalidade indicam que não existe correlação estreita entre estes dois parâmetros. Os animais inoculados com  $10^2$  parasitas e tratados com soro imune não controlaram a parasitemia, embora tenham controlado a mortalidade. Esta dissociação torna-se particularmente aparente nas experiências em que o soro imune é inoculado em tempos variáveis em relação à dose estimulante. O nível de parasitemia foi controlado em todas as circunstâncias, mas a mortalidade só pode ser controlada quando o soro foi inoculado antes do estímulo.

O conjunto dos dados apresentados até o momento é compatível com a hipótese de que os anticorpos ou o soro imune, tenha uma nítida ação opsonizante. A administração do soro, antes da infecção, permitiria através desta ação opsonizante, uma localização da infecção, ao nível dos macrófagos ou do Sistema Retículo Endotelial. Diminuindo assim as chances de infecção das células musculares cardíacas, sede provável de lesões letais.

Os resultados do exame histopatológico do coração não foram conclusivos pois foram feitos cortes e histológicos dos ventrículos não tendo sido incluídos os átrios. Por outro lado, a administração do soro imune no 7ª dia de infecção levou a um acúmulo de parasitas no baço e fígado em relação ao controle.

Esta interpretação, é compatível com os dados da literatura que mostram que o T.cruzi apresenta um antígeno que exerce uma função anti-fagocitária e que soro de homens e de ca mundongos de fase crônica têm anticorpos que se combinam com este antígeno. Ademais os trabalhos de Scott & Moyes 1983, mostraram que a injeção de parasitas opsonizados com soro de fase crônica, leva a uma localização dos parasitas ao nível de baço e fígado em  $F_1$ , após 30 minutos da infecção. Mostraram ainda uma atividade microbicida destes fagócitos, ao transplantarem fragmentos do baço e fígado parasitados para hospedeiros irradiados e observarem baixos níveis parasitêmicos em relação aos animais controle.

Na presente pesquisa, o número de parasitas no pico, foi significativamente, mais baixo nos animais tratados com o soro anti-T.cruzi 24 horas, 3 dias e 7 dias "depois" da infecção, embora não tenha havido proteção, ou seja, não tenha aumentado a média de esperança de sobrevivência, nem alterado o tempo médio de aparecimento do pico parasitêmico. Todos estes fatos são coerentes com a hipótese de que o soro tem uma ação opsonizante e que a proteção é resultante da prevenção de ocorrência das lesões iniciais. Todas as vezes que foi permitido o estabelecimento das lesões iniciais e depois então administrado o soro, este, teve uma ação sobre o nível de parasitemia mas não sobre a esperança de sobrevivida. Esses dados permitem inferir que a avaliação do nível de parasitemia não é índice adequado para aferir proteção. A opsonização não promove, necessariamente, a eliminação da infecção pela morte dos parasitas nos fagossomas. O fato de que a imunização passiva não alterou o dia de aparecimento do pico, e os trabalhos

de Nogueira & Cohn (1976) e Alcântara (1979) mostrando que o parasita opsonizado continua se reproduzindo normalmente no fagossoma do macrófago apoiam esta interpretação. A partir do pico de parasitemia o controle da infecção nos animais imunizados que passam à fase crônica, se deve, muito provavelmente, à presença de células T especificamente sensibilizadas. As observações de Nogueira & Cohn (1977) mostram a ocorrência da morte do parasita no interior do fagócito quando este é ativado por células T especificamente sensibilizadas. Brener & Krettli (1977) observaram ao exame histopatológico de baço de camundongos no 89 dia pós infecção uma depleção de células da polpa vermelha paralelamente à destruição intracelular dos parasitas reticulotrópicos da cepa Y.

Em concordância com estas observações, os resultados de Hayes & Kierszenbaum (1981) mostram que ao final da fase aguda o número de linfócitos T especificamente sensibilizados, de CBA, aumenta significativamente.

O conjunto de dados apresentados, em concordância com os dados da literatura, são compatíveis com a hipótese de que o fenômeno da proteção, por imunização passiva, se deva primordialmente, a um mecanismo de opsonização. Não está excluído, no entanto, a possível ação destes anticorpos em fenômenos de ADCC, (Voltarelli et al., 1983; Kipnis et al., 1981a; Kipnis et al., 1981b; Rimoldi et al., 1981; Madeira et al., 1979; Kierszenbaum & Gharpure 1983; Martins et al., 1983) ou de neutralização de antígenos com potencial capacidade para induzir fenômenos de depressão da resposta imune durante a fase aguda (Maleckar & Kierszenbaum, 1983; Tarleton et al., 1983).

## 5. R E S U M O E C O N C L U S Õ E S

O trabalho teve a finalidade de verificar o efeito da variação da dose do inóculo de T.cruzi (entre  $10^1$  e  $10^5$ ) sobre:

- a) O tempo de evolução necessário para atingir o pico parasitêmico;
- b) O nível de parasitemia;
- c) O tempo médio de sobrevivência à infecção.

Numa segunda etapa estudou-se a interferência do soro anti-T.cruzi sobre a mortalidade, parasitemia e tempo de evolução necessário para atingir o pico parasitêmico.

Os resultados demonstraram que:

- 1) Existe uma relação linear entre o logarítimo da dose e o dia do pico parasitêmico. Esta relação pode ser expressa pela seguinte fórmula:  $y=b.ax$
- 2) Não há diferença significativa entre os níveis de parasitemia dos animais inoculados com diferentes doses de tripomastigotas sanguícolas, ex

ceto com o inóculo de  $10^5$  parasitas;

3) O tempo de sobrevida é função do número de parasitas inoculados;

4) A inoculação do soro anti-T.cruzi (obtido em camundongos (CBA X C<sub>57</sub>BL)<sub>1</sub>)F<sub>1</sub> em fase crônica (6 semanas de infecção), mostraram que:

4a) Animais tratados com 0,25 ml de soro anti T.cruzi, 1 hora antes de receber  $10^5$  tripomastigotas não mostraram alterações significativas no tempo para a parasitemia atingir o pico embora o número de parasitas tenha sido significativamente menor. Entretanto, apresentaram um aumento na média de sobrevida à infecção.

4b) Animais tratados com 0,25 ml de soro anti-T.cruzi e inoculados com  $10^2$  parasitas não tiveram alterações no tempo de aparecimento do pico ou do nível de parasitemia mas tiveram aumento significativo na esperança de sobrevida.

- 4c) A inoculação de 0,25 ml do soro anti-T.cruzi 3 ou 7 dias após a infecção com  $10^5$  parasitas não alterou a esperança de sobrevivência, embora tenha diminuído o nível parasitemico o que sugere uma ação opsonizante para o soro, cuja proteção só é efetiva quando inoculado antes da infecção.
- 4d) O exame histológico do baço de camundongos infectados tratados com soro imune mostra menor número de amastigotas no pico parasitemico do que nos animais controle, o que sugere ação do soro na destruição dos parasitas na fase de transição entre aguda e crônica.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I.A.; BLOTTA, M.H.S.L. & CUROTTO, M.A. Enhancement of delayed - type hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice treated with mycobacterium bovis BCG and cyclophosphamide. Infect. Imm., 31 (3): 1145 - 51, 1981.
- ALCANTARA, A.F. Interação "in vitro" entre Trypanosoma cruzi e macrofagos peritoneais de camundongo. Tese de Doutorado, Departamento de Anatomia Patológica e Medicina Legal da F.M., UFMG, 100 pp. 1979.
- ALCANTARA, A.F. & BRENER, Z. Trypanosoma cruzi: role of macrophage membrane components in the phagocytosis of bloodstream forms. Exp. Parasitol., 50: 1 - 6, 1980
- BEHBEHANI, K.; PANM S.C. & UNANUE, E.R. Marked increase in Ia - Bearing macrophages during Trypanosoma cruzi infection. Clin. Imm. Immunopath., 19:190-5, 1981.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. Observações sobre a fase crônica da Doença de Chagas Experimental no Camundongo. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 5: 128 - 32, 1963.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. & ALVARENGA, N.J. Observations on Trypanosoma cruzi strains maintained over an 8 - year period in experimentally inoculated mice. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 16 (1): 39 - 46, 1974.
- BRENER, Z & KRETTLI, A.U. Role of the spleen in Chaga's disease. In: Tropical diseases Research Series: 1. The Role of the Spleen in the Immunology of Parasitic Diseases. Geneva. Switzerland. Schwabe & A.G. Basel, 1979. p.121 - 35.

- BRENER, Z. Intraspecific variations in Trypanosoma cruzi: two Types of parasite populations presenting distinct characteristics . Pan American Health Organization, Scientific Publication n°347. In: Chaga's disease, 11 - 21, 1977.
- BRENER, Z. Comparative studies of different strains of Trypanosoma cruzi. Ann. Trp. Med. Parasit., 59: 19 - 26, 1965
- BRENER, Z. Alguns aspectos da imunidade adquirida em camundongos experimentalmente inoculados com Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 9: 233 - 8, 1967.
- BRENER, Z. The behaviour of slender and stout forms of Trypanosoma cruzi in the bloodstream of normal and immune mice. Ann. Trop. Med. Parasitol., 63: 215 - 20, 1969
- BRENER, Z. Biology of Trypanosoma cruzi. Ann. Rev. Microbiol., 27: 347 - 82, 1973.
- BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with Trypanosoma cruzi. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 4 (6): 389 - 96, 1962.
- BOX, C.E.P. & COX, D.R. An Analysis of Transformations. J. R. Statist. Soc. Ser. B, 26 (2): 211 - 43, 1964.
- 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. Inf. Immun., 11: 86, 1975.
- BURKE, J.D.; WEYMOUTH, R.J. & SEIBEL, H.R. Histological Methods . In: Essentials of histology, New York; Barron's Educational Series, pp. 5 - 17, 1972.



- CASTELO BRANCO, A.Z.C.L. Proteção mediada por imunoglobulina G em camundongos infectados com Trypanosoma cruzi. Tese de Mestrado, Departamento de Bioquímica e Imunologia ICB, UFMG, 79 pp, 1978.
- CHESS, Q.; ACOSTA, A.M.; SETHI, J.K. & SANTOS-BUCH, C.A. Reversible acquisition of a host cell surface membrane antigen by Trypanosoma cruzi. Inf. Imm., 40 (4): 299 - 302, 1983.
- COLLIER, H.O.J.; FULTON, J.D. & INNES, J.R.M. The oedema of mice infected with Trypanosoma cruzi, and the accompanying pathological lesions. An. Trop. Med. Parasitol., 36: 137 - 50, 1942. Apud: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan, 1979, 241.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & STELINI, Jr. A. Suscetibility of imbred mice to Trypanosoma cruzi strain Y. Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo, 22: 192 - 6, 1980(a)
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, A.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & RANGEL, H.A. A fraction (FAd) from Trypanosoma cruzi epimastigotes depresses the immune response in mice. Immunol., 40: 505 - 11, 1980.
- CULBERTSON, J.T. & KOLODNY, M.H. Acquired immunity in rats against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 24: 83 - 90, 1938.
- DALMASSO; A.P. & LARVINEN, J.A. Experimental Chagas' disease in complement - deficient mice and guinea pigs. Infect. Immun., 28: 434, 1980.
- DAVIES, D.B. Bacterial Structure. In: \_\_\_\_\_ et alii. Microbiology. Maryland, Harper & Row, 1973 cap.2, pp.22- 38.
- DUNNET, C.W. Pairwise Multiple Comparisons in the Homogeneous Variance Unequal Sample Size Case. J. Am. Stat. Assoc. 75 (372): 789 - 95, 1980.

- DVORAK, J.A. Host parasite relationships at the cellular level in Trypanosoma cruzi infections. Wae., PAHO, 1977. 1 - 10 (Health Organization Scientific, 347).
- DVORAK, J.A.; HALL, T.E.; CRANE, M.S.T.J.; ENGEL, J.C.; Mc DANIEL, J.P. & URIEGAS, R. Trypanosoma cruzi: Flow cytometric analysis. I. Analysis of total DNA/organism by means of mithramycin - induced fluorescence. J. Protozool., 29 (3): 430 - 7, 1982.
- DVORAK, J.A. & HYDE, T.P. Trypanosoma cruzi: interactions with vertebrate cells in vitro. I. Individual interactions at the cellular and subcellular levels. Exp. Parasitol., 34: 208-83, 1973.
- DVORAK, J. & STOTLER, W. A controlled environment culture system for high resolution light microscopy. Exp. Cell Resear., 68: 144-8, 1971.
- FREDERICI, E.E.; ABELMANN, W.H. & NEVA, F.A. Chronic and progressive myocarditis and myositis in C<sub>3</sub>H mice infected with Trypanosoma cruzi. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 13: 272, 1964
- HANSON, W.L. Immune response and resistance mechanisms in Trypanosoma cruzi. Pan American Health Organization Scientific Publication, n<sup>o</sup> 347:
- HANSON, W.L. Immunology of American Trypanosomiasis (Chagas' disease). COHEN, S.; SUDAN, E. In: Immunology of parasitic infections, Oxford, Blackwell: 222 - 34, 1976
- HATCHER, F.M. Destruction of Trypanosoma cruzi by natural killer cells. Science, 218: 295 - 6, 1982.
- HAYES, M.M. & KIERSZENBAUM, F. Experimental Chagas' Disease: Kinetics of Lymphocyte Responses and Immunological Control of the Transition from Acute to Chronic Trypanosoma cruzi Infection. Inf. Imm., 31 (3): 1117 - 24, 1981.

- HERBERT, W.J. Trypanosoma brucei: the mechanism of remission in murine infections. A calculator simulation. Parasit. Imm., 4: 209-17, 1982.
- HOFF, R. Recent advances in cell-mediated immunity to Trypanosoma cruzi. PAHO Scientific Publication n° 318: 162 - 6, 1975.
- JAMES, S.L.; KIPNIS, T.L.; SHER, A. & HOFF, R. Enhanced resistance to acute infection with Trypanosoma cruzi in mice treated with an interferon inducer. Infect. Imm., 35 (2): 588 - 93, 1982.
- KAGAN, I.Q. & NORMAN, L. Immunologic studies on Trypanosoma cruzi. III - Duration of acquired immunity in mice initially infected with a North American strain of Trypanosoma cruzi. J. Inf. Dis., 108: 213 - 7, 1961.
- KAGAN, I.Q. & NORMAN, L. Immunologic studies on Trypanosoma cruzi. IV - Serial transfer of organisms from immune to nonimmune mice. J. Parasitol., 48: 584 - 8, 1962.
- KIERSZENBAUM, F. & BUDZKO, D.B. Trypanosoma cruzi: deficient lymphocyte reactivity during experimental acute Chagas' disease in the absence of suppressor T. cells. Paras. Immunol., 4: 441 - 51, 1982.
- KIERSZENBAUM, F. & GHARPURE, H.M. Killing of circulating forms of Trypanosoma cruzi by lymphoid cells from acutely and chronically infected mice. Internat. J. Parasitol., 13 (4): 377 - 81, 1983.
- 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. Imm., 116 (5): 1208 - 11, 1976.

- KIERSZENBAUM, F. On evasion of Trypanosoma cruzi from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas' disease. Immunol., 44: 641 - 8, 1981
- KIPNIS, T.L.; DAVID, J.R.; ALPER, C.A.; SHER, A. & DIAS DA SILVA, W. Enzymatic treatment transforms trypomastigotes of Trypanosoma cruzi into activators of alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 78 (1): 602 - 5, 1981 (b).
- KIPNIS, T.L.; JAMES, S.L.; SHER, 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 (a).
- KLOETZEL, J.K. & LAFAILLE, J.J. Strain specific protective immunity against Trypanosoma cruzi. J. Parasitol., 69 (2): 267 - 70, 1983.
- KOBERLE, F. Chagas' disease and Chagas' syndromes: The pathology of American Trypanosomiasis. Adv. Parasit., 6: 63, 1968.
- KOLODNY, M.H. Studies on age resistance against Trypanosome infection: I. the resistance of rats of different ages to infection with Trypanosoma cruzi. Amer. J. Med. Hyg., 29 (c): 13, 1939.
- KREIER, J.P. AL ABASSY, S.M. & SEED, T.M. Trypanosoma cruzi: observations on entry, development, release and ultrastructure of parasites grown in cell cultures. Ohio J. Sci., 76 (6): 243 - 53, 1976.
- KRETTLI, A.U. Exacerbation of experimental Trypanosoma cruzi infection in mice by concomitant malaria. J. Protozool., 24:514 18, 1977.

- KRETTLI, A.U. Efeito de anticorpos e do complemento sobre tripomas  
tigotas sanguíneos de camundongos infectados com Trypanosoma  
cruzi. [ Tese de Doutorado ] Instituto de Ciências Biológi  
cas da Universidade Federal de Minas Gerais, 111 pp. 1978.
- KRETTLI, A.U. Antibodies to Trypanosoma cruzi in experimental and  
human infections. Afr. J. Clin. Exp. Imm., 3: 327 - 45, 1982.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Protective affects of specific antibodies  
in Trypanosoma cruzi infections. J. Imm., 116 (3): 755 - 60,  
1976.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. Resitence against Trypanosoma cruzi  
associated to anti-living trypomastigote antibodies. J. Imm.,  
128 (5) : 2009 - 12, 1982.
- KRETTLI, A. & NUSSENZWEIG, R.S. Presence of immunoglobulins on the  
surface of circulating trypomastigotes of Trypanosoma cruzi  
resulting in activation of the alternative pathway of  
complement and lysis. Pan American Health Organization, Scientific  
Publication n° 347. In: Chagas' disease, 71 - 3, 1977.
- KRETTLI, A.U. & PONTES DE CARVALHO, L.C. Bloodstream trypomastigotes  
(Btry) ef Trypanosoma cruzi Y straim have complement (C)receptors  
on their membrane. In: Congresso Bras. de Imunolog. 9pp. 105, 1983.
- KRETTLI, A.U.; WEISZ - CARRINGTON; P. & NUSSENZWEIG, R.S. Membrane  
bound antibodies to bloodstream Trypanosoma cruzi in mice :  
strain differences in susceptibility to complement-mediated  
lysis. Clin. Exp. Immunol., 37 (3): 416 - 23, 1979

- MACKANESS, G.B.. The monocyte in cellular immunity. Seminars on Hematology, 7: 172, 1970.
- MADEIRA, E.D.; ANDRADE, A.F.B.; BUNN-MORENO, M.M. & BARCINSKY, M. Antibody dependent cellular cytotoxicity of Trypanosoma cruzi: Characterization of the effector cell from normal human blood. Inf. Imm., 25 (1): 34 - 8, 1979.
- 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 (2): 908 - 11, 1983.
- MALECKAR, J.R. & KIERSZENBAUM, F.. Suppression of mouse lymphocyte responses to mitogens in vitro by Trypanosoma cruzi. Int. J. Parasit., 14 (1): 45-52, 1984.
- MARTINS, M.V.C.L.; SANCHEZ, G.P.; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z.. Antibody dependent cellular cytotoxicity (ADCC) with sera from mice chronically infected or immunized, with Trypanosoma cruzi. In: Congresso Brasileiro de Doença de Chagas. 9. Caxambu, Minas Gerais, 1983.
- McHARDY, N.. Immunization of mice against Trypanosoma cruzi. The effect of dose, and route of infection, of immunizing and challenge inocula. Tropenmed. Parasit., 28: 11 - 6, 1977(a).
- McHARDY, N.. Passive immunization of mice against Trypanosoma cruzi using convalescent mouse serum. Tropenmed. Parasit., 28: 195 - 201, 1977 (b).
- MELO, R.C. & BRENER, Z. Tissue tropism of different Trypanosoma cruzi strains. J. Parasitol., 64: 475 - 82, 1978.
- MEYER, H.; OLIVEIRA, M.O. Cultivation of Trypanosoma cruzi in tissue culture: a four year study. Parasitol., 39: 91 - 4, 1948.
- NEAL, R.A. & McHARDY, N.. Comparison of infectivity of Trypanosoma cruzi bloodstream trypomastigotes and metacyclic trypomastigotes from Rhodnius prolixus. Act. Trop., 34: 79 - 85, 1977.

- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S. & COHN, Z.. Trypanosoma cruzi. Factors modifying ingestion and fate of blood form trypomastigotes. J. Exp. Med., 152: 447 - 51, 1980.
- NOGUEIRA, N.; CHAPLAN, S.; TYDINGS, J.D.; UNEELESS, J. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi. Surface antigens of blood and culture forms. J. Exp. Med., 153: 629 - 39, 1981.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi: mechanism of entry and intracellular fate in mammalian cells. J. Exp. Med., 143: 1402, 1976.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. Trypanosoma cruzi: uptake and intracellular fate in normal and activate cells. Amer. J. Trop. Med. Hyg., 26: 194, 1977.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. . Trypanosoma cruzi+ in vitro induction of macrophage microbial activity. J. Exp. Med., 148: 288, 1978.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. . Trypanosoma cruzi: cell-mediated in vitro. In: Tropical Diseases Research Series: 1. The Role of the Spleen in the Immunology of Parasitic Diseases. Geneva . Switzerland . Schwabe & A.G. Basel, 1979, p. 137 - 46.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S. & COHN, Z.. Trypanosoma cruzi: modification of macrophage function during infection. J. Exp. Med., 146: 157-71, 1977.
- OLIVEIRA, O.L.P.. Imunosupressão na infecção pelo Trypanosoma (Schizotripanum) cruzi (CHAGAS, 1909): II - Alterações em órgãos linfóides e não linfóides de camundongos (CBA/H x C57BL/10) F<sub>1</sub>. Tese de Mestrado. Departamento de Microbiologia e Imunologia, IB UNICAMP. Campinas - São Paulo, 120 pp. 1982.

- PEREIRA DA SILVA; L.H. & NUSSENZWEIG. Sobre uma cepa de Trypanosoma cruzi altamente virulenta para o camundongo branco. Folia Clin. et Biol., 20: 191, 1953.
- PIZZI, T.; AGOSIN, M.; CHRISTEN, R.; HOECKER, G. & NEGhme, A.. Estudios sobre immunobiologia de las enfermedades parasitarias : I. Influencia de la constitucion genetica en la resistencia de las lanchas a la infeccion experimental por Trypanosoma cruzi. Bol. Inform. Parasit. Chil., 4: 48 - 9, 1949.
- REPKA, D.; CAMARGO, I.J.B.; SANTANA, E.M.; CUNHA, W.M.; DE SOUZA, O.C.; SAKURADA, J.K. & RANGEL, H.A.. Surface antigenic determinant of epimastigote forms common to trypomastigote forms of different strains of Trypanosoma cruzi. Tropenmed. Parasitol. 31: 239 - 46, 1980.
- REPKA, D.; GAVINO, V; ATTA, A.M. & RANGEL, H.A. Protective antibodies in experimental Chaga's disease. In: Congresso Anual da Sociedade Brasileira de Immunologia, 8. Caxambu, M.G., 1982.
- RIMOLDI, M.T.; CARDONI, R.L.; OLABUENAGA, S.E. & DE BRACCO, M.M .E. Trypanosoma cruzi: sequence of phagocytosis and cytotoxicity by human polymorphonuclear leucocytes. Immunol., 42: 521 - 7, 1981.
- RODRIGUEZ, A.M.; SANTORO, F.; AFCHAIN, D.; BAZIN, H. & CAPRON, A. Trypanosoma cruzi infection in B-cell-deficient rats. Inf. Imm., 31: 524 - 9, 1981.
- ROMEIRO, S.A.; TAKERARA, H.A. & MOTA, I. Isotype of lytic antibodies in serum of Chagas' disease patients. Clin. Exp. Immunol., 55: 413 - 8, 1984.
- SCHMUNIS, G.A.; GONZALEZ CAPP, S.M.; TRAVERSA, O.C. & JANOVSKY, J.F.. The effect of immuno - depression due to neonatal thymectomy on infections with Trypanosoma cruzi in mice. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 65: 89, 1971.



- SCOTT, M.T. The nature of immunity against Trypanosoma cruzi in mice recovered from acute infection. Paras. Imm., 3: 209 - 18, 1981 (a).
- SCOTT, M.T. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi in mice: specific supressor cells in chronic infection. Immunol., 44 : 409 - 17, 1981 (b).
- SCOTT, M.T. & MOYES, L. <sup>75</sup>Se-methionine labelled Trypanosoma cruzi blood trypomastigotes: opsonization by chronica infection serum facilitates killing in spleen and liver. Clin. Exp. Imm., 48: 754 - 7, 1982.
- SHER, A.; CRANE, M.ST.J. & KIRCHHOFF, L.U. Incubation in mice provides a signal for the differentiation of Trypanosoma cruzi epimastigotes to trypomastigotes. J. Protozool., 30: 278 - 83 , 1983.
- SNARY, D. Trypanosoma cruzi: antigenic invariance of the cell surface glycoprotein. Exp. Imm., 49: 68 - 77, 1980.
- STEFANI, M.M.A.; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. Isotype of antibodies responsible for immune lysis in Trypanosoma cruzi infected mice. Imm. Lett., 7: 91 - 7, 1983.
- TAFURI, W.L. Light and electron microscope studies of the anatomic nervous system in experimental and human American Trypanosomiasis. Virch. Arch. Abt. A. Path. Anat., 354: 136 - 49, 1971.
- TAKHEARA, H.A.; PERINI, A. ; SILVA, M.H. & MOTA, I. Trypanosoma cruzi: role of different antibody classes in protection against infection in the mouse. Exp. Parasitol., 52: 137 - 46, 1981.
- TANOWITZ, H.B.; DAVIES, P.; FACTOR, S.M.; MINASE, T.; HERSKOWITZ, A. & WITTNER, M. Trypanosoma cruzi: choline acetyltransferase activity in tissues of susceptible and resistant mice infected with the Brasil strain. Expreim. Parasitol., 51: 269 - 78, 1981.

- TARLETON, R.L. & KUHN, R.E.. Changes in cell populations and immunoglobulin - producing cells in the spleens of mice infected with Trypanosoma cruzi: correlations with parasite-specific antibody response. Cell. Immunol., 80: 392 - 404, 1983.
- TARLETON, R. L., SCHAFFER, R. & KUHN, R.E. Effects of extracts of Trypanosoma cruzi on Immune Responses: induction of a nonspecific supressor factor. Inf. Imm., 41 (3): 987 - 86, 1983.
- TEIXEIRA, A.R.L. & SANTOS - BUCH, C. A.. The immunology of experimental Chagas' Disease. II. Delayed hypersensitivity to Trypanosoma cruzi antigens. Immunol., 28: 401, 1975.
- TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, G. & 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 - 80, 1975.
- TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V. & PRATA, A. Trypanosoma cruzi-sensitized T lymphocyte mediated <sup>51</sup>Cr release from human heart cells in Chagas' Disease. Am. J. Trop. Med. Hyg., 27: 097, 1978.
- TRISCHMANN, T.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B.. Trypanosoma cruzi: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. Exp. Parasitol., 45: 160 - 8, 1978.
- TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B.R.. Genetics of murine resistance to Trypanosoma cruzi. Inf. Imm., 35: 546 - 51, 1982.
- VOLTARELLI, J.C; FALCÃO, R.P. & SANTANA DA SILVA, J. Antibody dependent cellular cytotoxicity in chronic human Chaga's disease. Paras. Imm., 5: 377 - 84, 1983.

WRIGHTSMANN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. Genetic control of responses to Trypanosoma cruzi in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. Inf. Imm., 36: 637 - 44, 1982.

WRIGHTSMANN, R.; KRASSNER, S.M.; WATSON, J.D. & MANNING, J.E. Role of the H-2<sup>S</sup> haplotype in survival of mice after infection with Trypanosoma cruzi. Inf. Imm., 44: 351 - 4, 1984.