

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
INSTITUTO DE BIOLOGIA
DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA**

**Resistência precoce na infecção experimental pelo
Trypanosoma cruzi:
Especificidade e alterações na resposta imune**

Sara de Jesus Oliveira

Campinas - São Paulo

1995

Sara de Jesus Oliveira

**Resistência precoce na infecção experimental pelo
Trypanosoma cruzi:
Especificidade e alterações na resposta imune**

Este exemplar corresponde à redação final
da tese defendida pelo(a) candidato(a)
Sara de Jesus Oliveira
e aprovada pela Comissão Julgadora.

Dissertação apresentada ao Curso de Pós Graduação em
Imunologia no Instituto de Biologia da Universidade Estadual
de Campinas para obtenção do título de Mestre em Ciências
Biológicas.

Campinas - São Paulo
1995

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

UNIDADE	BC
CHAMADA:	UNICAMP
	OLY
Ex.	
OMBO BC/	26 405
ROC.	667/96
C	☐
D	☒
RECO.	R\$ 11,00
DATA	13.10.1996
CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

CM-00082329-5

Oliveira, Sara de Jesus
OI4r Resistência precoce na infecção experimental pelo
Trypanosoma cruzi: especificidade e alterações na resposta
imune / Sara de Jesus Oliveira. -- Campinas, SP : [s.n.], 1995.

Orientador : Irineu José Barsanti de Camargo.
Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia.

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Imunização. 3. Infecção.
I. Camargo, Irineu José Barsanti. II. Universidade Estadual
de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

Orientador

Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo

A realização desse trabalho se fez possível graças ao apoio financeiro da CAPES, através da concessão de bolsa de mestrado, e da FAPESP, CNPq e FAEP-UNICAMP, através de auxílios à projetos de pesquisa.

LOCAL E DATA: Campinas,

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo
(Orientador)



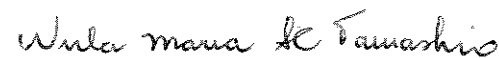
assinatura

Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo



assinatura

Profa. Dra. Wirla Maria da S. C. Tamashiro



assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada



assinatura

APROVADA

À Luiz de Oliveira (in memorian) e Maria de Lourdes, meus pais, pelo exemplo de vida.

À todos os amigos; em especial à Maria José e Maria Helena, amigas, irmãs e maiores incentivadoras.

Muitos já tentaram mudar o mundo.

Alguns tentaram melhorá-lo com revoluções. Acabaram presos e mortos. Outros tentaram modificá-lo com o poder da palavra. Tiveram suas línguas cortadas.

Onde estava o erro ?

Talvez em pensar que o ambiente é que faz o homem. Quando o pensamento, as idéias e o coração de cada um se tornar pleno de Sabedoria, muita coisa mudará. E melhorará !

(Autor desconhecido)

SINCEROS AGRADECIMENTOS...

Ao Prof. Dr. Irineu J. B. de Camargo, pela aceitação, pela orientação e principalmente pela paciência no desenvolver deste trabalho.

À Sub-Comissão de Pós-Graduação, em especial à Profa Dra Dagmar Stach-Machado, pelo trabalho que tem desenvolvido neste departamento, em favor dos alunos e do Curso de Pós-Graduação em Imunologia.

A todos os professores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos ensinamentos, atenção e amizade.

Aos professores Dra Julia Keiko Sakurada. Dr. Paulo Ferreira de Araújo e Dra Wirla Maria Tamashiro, pelas valiosas críticas e sugestões na análise prévia deste trabalho.

A todos os funcionários deste departamento, em especial à Cristina Colombari, Ismália Doné e Dirce Gabriel, presenças sempre amigas e colaboradoras.

Ao Flávio dos Santos Inácio, da Secretaria de Pós-Graduação em Imunologia, e ao Luiz Fernando G. Balsas, pela valiosa colaboração na área de informática.

À Profa Dra Nora Sakamoto e Profa Dra Yara De Luca, do Depto de Histologia, pela orientação nas análises histológicas e fotomicrografia.

Às funcionárias Teresa Toniatti e Cleusa O. Franco, do Depto de Histologia, pela colaboração e orientação técnica.

À Profa Rosângela Rocha e funcionária Cilene Bastos, do Depto de Parasitologia, pela gentileza em ceder as cepas de toxoplasma.

À Profa Dra Maria Alice Hofling e funcionária Antonia Maria Lima, do Depto de Microscopia Eletrônica, pela atenção nas ampliações fotográficas.

Ao laboratório de Microbiologia do HC/UNICAMP, na pessoa do Prof. Dr. Ulisses M. Oliveira e funcionária Shirley Gonçalves, pela simpatia com que nos cederam as cepas bacterianas.

À Profa Dra Maria Heloísa S. L. Blotta, do Depto. de Patologia Clínica do HC/UNICAMP, pelas primeiras orientações no campo da Imunologia, pela amizade e estímulo, que fizeram dessa tarefa mais um motivo para o meu aperfeiçoamento.

À Universidade de Campinas e às Instituições financiadoras deste projeto.

A todos os colegas do Curso de Pós-graduação, que com alegria e companheirismo colaboraram para o meu aprimoramento intelectual.

Aos amigos mui especiais: Carla Cecílio, Márcia Fornazim, Maria Angela Orsi e Rovilson Gilioli, que com incentivo, colaboração e amizade constantes, fizeram parte do meu crescimento pessoal e profissional.

Aos velhos e grandes amigos de Sorocaba, cujo apoio e confiança estiveram presentes em todos os momentos.

A todos aqueles que, no anonimato, contribuíram para a concretização deste trabalho, já que uma tese não é um trabalho individual, mas resultado do esforço conjunto de inúmeras pessoas.

À minha família, que nunca poupou esforços para a realização dos meus ideais.

E a Deus, cuja presença forte em minha vida, tem tirado todas as pedras do caminho, fazendo mais suave a caminhada...!

“O princípio da Sabedoria é um desejo sincero da instrução. Mas o cuidado da instrução é o amor; e o amor é a observância das suas leis; e a observância destas leis é a consumação da imortalidade”...

Livro da Sabedoria (Sb 6, 18-19)

ABREVIATURAS

ADCC- Citotoxicidade celular dependente de anticorpos

APC- Células apresentadoras de antígenos

BCG- Bacilo Calmette - Guérin

BHI- Infusão de coração e cérebro

DMI- Departamento de Microbiologia e Imunologia

DTH- Hipersensibilidade do tipo tardio

EDTA- Etilenodiaminotetracetato

FC- Fração constante da imunoglobulina

HSP- Proteína de choque térmico

IL- Interleucina

IFN γ - Interferon gama

LPS- Lipopolissacarídeo

MHC- Complexo Principal de Histocompatibilidade

MHV- Vírus da hepatite murina

NK- Natural killer

NNN- Novy, Nicolle e Mc Neal

NO- Óxido nítrico

PPD- Proteína purificada derivada

PBS- Solução salina tamponada

PMN- Polimorfonuclear

SSF- Solução salina fisiológica

SPF- Livre de patógeno específico

TNF- Fator de necrose tumoral

TGF β - Fator transformador de crescimento

TC- Tripomastigota de cultura de célula

TS- Tripomastigota sanguícola

INDICE

	PÁG
I- INTRODUÇÃO.....	01
<i>O Trypanosoma cruzi</i> e a Doença de chagas.....	01
O sistema imune do vertebrado e os mecanismos de evasão do parasita.....	02
A imunidade celular e humoral	03
Participação de mecanismos imunes na patologia da doença.....	09
Proteção induzida contra o <i>T. cruzi</i>	10
Propósito do presente estudo.....	12
II- MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
1. Animais utilizados.....	13
2. Cepas e estoques de <i>T. cruzi</i> . e outros microorganismos.....	13
3. Infecções experimentais em camundongos.....	14
3.1. Infecção com <i>T. cruzi</i>	14
3.2. Reativação da virulência, detecção da LD 50 e infecção com bactérias.....	15
3.3. Infecção com <i>T. gondii</i>	15
4. Inoculação com plasma de camundongos infectados com estoque Y original.....	16
5. Testes de caracterização do fator de ativação da virulência de Y original.....	16
6. Esquema de indução da proteção.....	17
7. Parasitemia e mortalidade.....	17
8. Leucograma.....	17
9. Preparações histológicas.....	18
10. Análise estatística.....	18
III- RESULTADOS.....	19
1. Especificidade da resistência precoce.....	19

1.1. Resistência precoce induzida por cepas do <i>T. cruzi</i> de baixa virulência.....	19
1.2. Especificidade da resistência precoce ao desafio com diferentes cepas e estoques do <i>T. cruzi</i>	21
1.3. Especificidade da resistência precoce ao desafio com bactérias.....	21
1.4. Especificidade da resistência precoce frente ao desafio com o parasita intracelular <i>T. gondii</i>	21
2. Efeito de diferentes estoques de <i>T. cruzi</i> sobre camundongos SPF.....	25
2.1. Alterações celulares do sangue periférico e dos órgãos linfóides.....	25
2.1.1. Leucograma e análise histológica de timo e baço de CBA/J infectados com estoques provenientes de cultura de células.....	25
2.1.2. Leucograma e análise histológica de timo e baço de CBA/J infectados com estoques mantidos em isoladores.....	30
2.1.3. Leucograma e análise histológica de timo e baço de CBA/J infectados com cepa Y, mantidos em biotério convencional.....	30
2.1.4. Leucograma e análise histológica de timo e baço de CBA/J, inoculados com plasma de camundongos infectados com diferentes estoques da cepa Y.....	34
2.1.5. Leucograma e análise histológica de timo e baço de CBA/J, inoculados com plasma de camundongos infectados com cepa Y, submetido a diferentes tratamentos.....	37
IV- DISCUSSÃO.....	40
V- CONCLUSÕES.....	45
VI- RESUMO.....	46
VII- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47

INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

O *Trypanosoma cruzi* e a Doença de Chagas

A Doença de Chagas, assim como tantas outras doenças tropicais que ocorrem no país, está entre as causas mais importantes de mortalidade nas regiões subdesenvolvidas, estando intimamente ligada à baixa condição sócio-econômica da população. Na América do Sul e Central, encontramos 16 a 18 milhões de pessoas infectadas (Petray e cols, 1994), acarretando para o Brasil perdas anuais acima de 80 milhões de dólares só em despesas médico-hospitalares (Dias e Jatene, 1992).

O grande problema do paciente chagásico, sintomático ou não, é a redução da capacidade física e menor sobrevida, podendo morrer na fase mais produtiva da vida, em média dos 30 aos 40 anos. Portanto, em 1909, quando Carlos Chagas descreveu a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, abriu imensas possibilidades de exploração científica e descortinou uma tragédia que perdura até hoje, se estendendo do Sul dos Estados Unidos ao Sul da Argentina (Brener, 1979).

Os tripanosomas são protozoários da família Trypanosomatidae, ordem Kinetoplastida, que apresentam durante o ciclo evolutivo, três formas distintas: epimastigota, tripomastigota e amastigota, assim denominadas pela presença ou não de flagelos. Esses parasitas habitam mamíferos selvagens como tatus e gambás, e insetos do gênero *Triatoma*, *Rhodnius* e *Panstrongylus*, conhecidos como "barbeiros" ou "percevejos". Os triatomídeos transmitem o *T. cruzi* por contaminação fecal no local da picada, quando o parasita penetra ativamente no hospedeiro e se multiplica intracelularmente (Brener, 1979).

O *T. cruzi* circula pela corrente sanguínea sem se multiplicar, invade células tissulares como macrófagos, músculo liso, músculo estriado, fibroblastos e neurônios; a seguir assume uma forma leishmaniana, se divide, se diferencia e volta a invadir o sangue na forma tripomastigota (Andrade, 1991).

A medida que a infecção evolui há uma diminuição na parasitemia, mas a forma tissular persiste, provocando uma infecção aguda progressiva, uma infecção latente de duração indefinida ou seguindo uma fase crônica (Chagas, 1981).

Na fase aguda da doença observa-se o chagoma de inoculação, sinal de um processo inflamatório inespecífico, podendo seguir miocardiopatia, linfadenopatia, hepatoesplenomegalia, febre, mal-estar e parasitemia, com colônias de amastigotas intracelulares nos músculos lisos, estriados e sistema reticuloendotelial (Brener, 1979).

Os fatores que determinam a severidade da doença na fase aguda, fatal em 10% dos casos, envolvem o grau de virulência das diferentes cepas de *T. cruzi*, o estado geral do indivíduo e possivelmente suas características genéticas (Trischmann e cols, 1978).

Após esse período inicial, desenvolve-se a resposta imunitária, provocando a redução da parasitemia e mantendo-se a infecção apenas em alguns órgãos de eleição (Andrade, 1991). Depois dessa fase indeterminada, a doença pode se tornar crônica, aparecendo sinais de miocardiopatia, degeneração de células do sistema nervoso central e periférico, hipertrofia e dilatação de órgãos como esôfago e cólon. Nesse período a parasitemia é baixa e a miocardite crônica chagásica torna-se o fenômeno mais grave e frequente da doença (Chagas, 1981).

O sistema imune do vertebrado e os mecanismos de evasão do parasita

Quando os tripanosomas penetram no organismo, eles são fagocitados por macrófagos, processados e apresentados a linfócitos T auxiliares, que reconhecem esses antígenos. Essas células T ativadas, aumentam a produção de IL-2, estimulando linfócitos citotóxicos efetores e ativando linfócitos B, que expandem seus clones transformando-se em células produtoras de anticorpos; outros linfócitos ativados permanecem como células de memória (Coura e cols, 1992).

A imunidade adquirida durante a infecção chagásica não é do tipo esterilizante e o hospedeiro continua a abrigar parasitas em pequeno número pelo resto da vida. A persistência do parasita pressupõe que ele possui meios de coexistir com a resposta imune do hospedeiro, envolvendo mecanismos de evasão que conseguem desviar ou suprimir essa resposta (Mitchell, 1991).

Milder e Kloetzel (1980), mostraram em cultura de macrófagos infectados, que os lisossomas secundários fundem-se com fagossomas logo após a interiorização do tripanosoma; após 24 horas os parasitas estão livres no citoplasma multiplicando-se ativamente, e posteriormente escapam para o meio

externo, levando a crer que os tripomastigotas sanguíneos são, de alguma forma, resistentes as enzimas lisossomais, provavelmente devido a características de superfície ou pela síntese de produtos inibidores dos lisossomas.

A existência de receptores para Fc de IgG na superfície de tripanosomatídeos patogênicos e sua ausência nos "apatogênicos" tem sido sugerida como um mecanismo de evasão da resposta imune (Miranda Santos e Campos Neto, 1981). Outro meio usado pelos protozoários para se evadir dos anticorpos específicos, é a reorganização dos antígenos de membrana após agregação do complexo antígeno-anticorpo na superfície celular, seguida da remoção do mesmo (Schmunis e cols, 1978).

Imunidade celular e humoral

Inúmeros trabalhos tem mostrado que a imunidade celular participa efetivamente do controle da infecção chagásica, principalmente pela ação de macrófagos, células natural-killer e linfócitos (revisto por Teixeira, 1987).

O macrófago é considerado a célula central do hospedeiro na montagem da imunidade específica e a primeira linha de defesa contra a infecção (Kierszenbaum e cols, 1974). Estas células expressam na superfície receptores para Fc das imunoglobulinas, componentes do Sistema Complemento, fibronectina, alfa 2 macroglobulina e lectinas, que facilitam a fagocitose. No entanto, não são eficientes em conter a infecção, servindo como hospedeiro inicial do parasita e contribuindo para sua multiplicação e disseminação (Araújo-Jorge, 1989).

A atividade fagocítica reticuloendotelial de animais infectados com o tripanosoma é maior do que em animais normais. Camundongos infectados e previamente inoculados com sílica, para destruir as células fagocitárias, mostraram altos níveis de parasitemia e mortalidade (Kierzenbaum e cols, 1974).

Os trabalhos de Nogueira e cols. (1977 e 1978), mostraram que macrófagos provenientes de animais imunizados com BCG ou infectados com *T. cruzi*, inibem a multiplicação dos parasitas em seu interior, e quando reestimulados com esses antígenos ou com PPD, são dotados de atividade tripanocida.

Alcina e Fresno (1987), usando uma linhagem de macrófago, mostraram "in vitro" que a ativação tripanocida dessas células, depende da ação sinérgica de linfocinas como IFN γ , e endotoxinas como LPS.

Russo e Starobinas (1991), mostraram que a atividade macrofágica anti-tripanosoma "in vitro", está relacionada com o aumento da capacidade de liberação dos reativos intermediários do Oxigênio, e que o *T. cruzi* se multiplica em macrófagos de animais não imunizados, ao passo que é intensamente destruído em macrófagos de animais imunizados.

O óxido nítrico produzido pelos macrófagos, também tem sido implicado como molécula efetora na citotoxicidade, pois consegue matar parasitas intra e extracelulares, inclusive o *T. cruzi* (Liew e Cox, 1991). Petray e cols (1994) mostraram que macrófagos de camundongos infectados na fase aguda, produzem altos níveis de óxido nítrico, sugerindo que esta molécula tem um papel importante na resistência contra os parasitas na fase inicial da infecção.

As células NK são capazes de destruir células tumorais, células infectadas por vírus ou parasitas intracelulares, sem estimulação prévia. São células essenciais na resistência precoce às infecções, visto que conseguem produzir IFN γ no início da infecção, antes que a imunidade mediada por células T seja gerada (Dunn e North, 1991).

Cardillo e cols (1993), mostraram que camundongos infectados com *T. cruzi* pré-tratados com anticorpo monoclonal anti-NK, desenvolvem marcado aumento na parasitemia e mortalidade, sugerindo que citocinas liberadas por essas células poderiam limitar a replicação precoce do *T. cruzi* em células hospedeiras, e sua ausência poderia diminuir o desenvolvimento de respostas do tipo Th1.

Em ratos Wistar, a infecção pelo *T. cruzi* altera consideravelmente a relação CD4/CD8 e a atividade NK de células mononucleares. A ativação policlonal de linfócitos T induzida pela infecção, resulta em larga distribuição de células CD8+ que aumentam a atividade citotóxica natural em vários órgãos, provocando infiltrado inflamatório no tecido cardíaco (Sato e cols, 1992).

A infecção pelo *T. cruzi* é acompanhada por supressão da resposta imune a uma variedade de antígenos e mitógenos, a qual tem sido relacionada a ação dos linfócitos T e a uma rede de citocinas, em particular da IL-2 e seus receptores. Tarleton (1988), sugere que a falha na produção de IL-2 em resposta a estimulação antigênica é devido à regulação de sua produção por células supressoras, como linfócitos T ou macrófagos.

Cerrone e Kuhn (1991), mostraram que camundongos infectados produzem uma resposta T helper-específica ao parasita e níveis aparentemente normais de imunoglobulinas circulantes. No entanto, a resposta a antígenos heterólogos,

como hemácias de carneiro, está suprimida "in vitro" e "in vivo", podendo estar relacionada a ação de macrófagos supressores.

Kierszenbaum e Szein (1990) observaram que o *T. cruzi* produz um "fator imunossupressor tripanossomal" (TIF), que efetivamente bloqueia a expressão dos receptores da IL-2 e inibe a proliferação de linfócitos T ativados.

Tarleton (1991), observou que a produção da IL-2 está diminuída na infecção pelo *T. cruzi*, enquanto outros produtos da célula T como IL-3, IL-4, IL-5 e IL-6, não estão drasticamente alterados. Verificou também, que a maior fonte de IFN γ são os linfócitos CD4-CD8-.

O *T. cruzi* além de suprimir a expressão dos receptores para IL-2, induz nos linfócitos ativados outras alterações importantes, como a redução da expressão de moléculas TCR, CD3, CD4 e CD8, responsáveis pela interação de linfócitos T com as células apresentadoras de antígenos, e pelos sinais de transdução necessários para o processo de ativação celular (Szein e Kierszenbaum, 1993).

Os linfócitos T CD8+ tem importante papel na redução do crescimento "in vivo", de vários microorganismos intracelulares como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Listeria monocytogenes* (Milon e Louis, 1993), e desempenham um papel crítico na resistência na fase aguda da infecção experimental pelo *T. cruzi* (Nickell, 1993).

Tarleton e cols (1992), usando camundongos deficientes para β_2 microglobulina (que não expressam moléculas do MHC I), infectados com *T. cruzi*, verificaram que eles não conseguem controlar a parasitemia e não sobrevivem a fase aguda da infecção, sugerindo que a sobrevivência desses animais requer a ação de linfócitos CD8, e que essas células são críticas para o início da resposta inflamatória local e eliminação do parasita.

Os estudos de Vandekerckhove e cols (1994), mostraram que células de baço e linfonodos de camundongos, na fase aguda da infecção pelo *T. cruzi*, apresentam a proliferação e produção da IL-2 suprimidas, frente a estimulação pela concanavalina A. A capacidade proliferativa é recuperada durante a fase crônica, somente pelas células dos linfonodos, sugerindo que diferentes mecanismos supressores podem estar operando em compartimentos imunes distintos, e que uma linhagem de macrófagos potencialmente supressores podem estar acumulada nesse órgão.

Araújo (1989), observou que camundongos tratados com anticorpo monoclonal anti-CD4 e imunizados com epimastigotas da cepa Tulahuen, quando

desafiados com tripomastigotas sanguíneas, apresentam respostas celular (DTH) e humoral (anticorpos específicos) comprometidas pelo tratamento, sugerindo que esses linfócitos T, além de modulador na patogênese da doença, tem participação essencial no desenvolvimento da resistência ao *T. cruzi*. Minóprio (1991), observou que animais depletados de células T CD4, apesar do alto número de parasitas, tem menor inflamação tecidual e maior resistência à infecção (Minóprio, 1991).

A resistência ou susceptibilidade a certas infecções pode ser explicada pela ação de células T e seus diferentes padrões de citocinas (De Maeyer, 1992). Está bem documentado que o IFN γ é um potente ativador de macrófago, inibindo a replicação do *T. cruzi*, acelerando a atividade microbicida e aumentando a resistência à infecção (Plata e cols, 1987). Foi observado por Torrico e cols (1991), que camundongos relativamente resistentes, tratados com um monoclonal anti-IFN γ , tiveram aumento de parasitas circulantes e intracelulares, e maior índice de mortalidade.

Por outro lado, o IFN γ também tem sido implicado como uma citocina imunorregulatória (Vandekerckhove, 1994). Tarleton (1991), sugeriu a função supressora para o IFN, quando verificou nível elevado dessa citocina até os primeiros 18 dias da infecção pelo *T. cruzi*, coincidindo com a produção mínima de IL-2. Reed e cols (1988), observaram que camundongos geneticamente resistentes, desenvolvem infecção fatal quando tratados com anti-IFN γ ou com TGF β recombinante, sugerindo que o TGF possa bloquear os efeitos inibitórios do IFN γ no desenvolvimento do *T. cruzi* nos macrófagos.

Silva e cols (1992), mostraram que a IL-10 também bloqueia a habilidade do IFN γ de inibir a replicação do tripanosoma em macrófagos peritoniais, exercendo efeito antagônico na síntese e na atividade do IFN, durante a fase aguda da infecção.

O hospedeiro reage precocemente à infecção por protozoários com produção de citocinas como TNF, IL-1 e IL-6, cuja ação combinada causa febre, leucocitose e produção de proteínas de fase aguda. No entanto, quando produzidas em grande escala, essas citocinas deixam de proteger o hospedeiro para aumentar a patologia (Titus e cols, 1991). O TNF inibe a replicação do *T. cruzi* nos macrófagos, "in vitro" e já foram detectados altos níveis dessa citocina no soro de camundongos infectados e estimulados com LPS (Tarleton, 1988; Black e cols, 1989).

A IL-1 pode restaurar a resposta suprimida de linfócitos de camundongos infectados pelo *T. cruzi*, sugerindo que a produção insuficiente dessa citocina pode ser responsável pela perda de respostas das células T (Titus e cols., 1991).

Como observado acima, estão descritas muitas informações sobre os efeitos do *T. cruzi* na ativação de células T, mas pouco se sabe sobre seus efeitos nos linfócitos B. Kierszenbaum e cols (1991), cultivando parasitas com células B do sangue periférico, estimuladas com pansorbina, verificaram supressão na síntese de DNA, afetando precocemente a estimulação desses linfócitos.

A subpopulação de linfócitos B CD5 parecem desempenhar importante papel na infecção pelo *T. cruzi* através da produção de IL-10 (supressora da atividade Th1), levando a forte ativação de células B convencionais, com produção de isotipos IgG2a e IgG2b (Minóprio, 1991).

Teixeira (1987), observou que camundongos infectados com *T. cruzi* tem um aumento no número de plasmócitos, com ativação policlonal de células B nas fases aguda e crônica da infecção.

Os vertebrados são na sua maioria susceptíveis ao *T. cruzi*, exceto aves e animais pecilotérmicos. A refratariedade das aves ao parasita se deve à atividade lítica do seu soro para tripomastigotas, ativando o sistema complemento pela via alternativa. Nos animais susceptíveis, o complemento não é ativado pelos tripomastigotas infectantes, a não ser em presença de anticorpos ligados à sua superfície (Krettli e cols, 1979).

A resistência à lise pelo complemento se deve a moléculas reguladoras da ativação do sistema, na superfície do parasita. O tratamento enzimático dos tripomastigotas pela tripsina ou pela sialidase, remove essas moléculas e possibilita a lise direta dos flagelados, após ativação da via alternativa do complemento (Kipnis e cols, 1981).

As formas epimastigotas de cultura são prontamente lisadas através da ativação do C3; já as formas amastigotas não são lisadas na presença de soro fresco de cobaio, nem mesmo após prévia tripsinização (Carvalho e Souza, 1986).

A depleção de C3 pelo fator de veneno de cobra, aumenta a severidade da infecção pelo tripanosoma em camundongos, indicando que o C3 pode operar como mecanismo efetor no controle da fase aguda (Krettli, 1983). Andrews e cols (1990), detectaram uma proteína do *T. cruzi* que reage cruzadamente com anticorpos para C9, e parece possuir atividade citotóxica formadora de poro, sugerindo que essa proteína homóloga ao complemento, possa facilitar a passagem do parasita do vacúolo para o citosol da célula hospedeira.

Os anticorpos anti-parasitários exercem ação protetora por diversos mecanismos como ativação do sistema complemento (lise do parasita), opsonização dos parasitas extra celulares (fagocitose e destruição pelos macrófagos), degranulação de mastócitos por anticorpos citofílicos, citotoxicidade através de granulócitos e monócitos, e inibição da penetração dos parasitas na célula por bloqueio de antígenos (Krettli, 1983).

Nas primeiras semanas da infecção são observadas evidências da resposta imune humoral, com aumento de IgM e IgG circulantes. Nas infecções humanas, os níveis de IgM ascendem paralelamente com o pico de parasitemia após 3 a 4 semanas; os anticorpos IgG específicos detectados durante a infecção permanecem com títulos elevados durante toda a fase crônica (Hanson, 1977; Bouhdidi, 1994). Os níveis de IgE permanecem normais, enquanto a IgA aumenta em indivíduos na fase crônica que apresentam a forma digestiva da doença (Lelchuk e cols, 1970; Ferreira e cols, 1983).

O papel das diferentes classes de anticorpos na proteção contra o *T. cruzi* também tem sido estudado no camundongo; parecem ter maior importância na fase crônica da infecção, pertencem a subclasse IgG2 e atuam principalmente por efeito da ADCC, da opsonização e da imunofagocitose por macrófagos ativados (Nogueira e cols, 1978; Reed, 1988).

Soro imune aplicado em camundongos atímicos, hipersensíveis à infecção pelo tripanosoma, levam à diminuição na parasitemia e mortalidade, quando comparados aos controles normais (Trischmann, 1978).

Trabalhos de Bouhdidi e cols (1994), mostraram que camundongos infectados apresentam resposta humoral poli isotípica, com hipergamaglobulinemia, altos níveis de IgM, IgG2a e IgE, que persiste até a 13ª semana da infecção. A IgG2a consiste de 70% dos anticorpos da fase crônica, enquanto a IgG1 apresenta maior avidéz funcional, sugerindo que a ação de ambos pode ser de crucial importância no desenvolvimento da infecção.

Anticorpos líticos de animais cronicamente infectados, podem levar à lise de tripomastigotas sanguíneas "in vitro", através da via alternativa do complemento (Muller e cols, 1986).

Umekita e cols (1988), verificaram que a fração IgG obtida de soro imune de camundongo na fase crônica, foi eficiente em induzir lise mediada pelo Complemento e clearance imune de tripomastigotas sanguíneos, enquanto fragmentos F(ab')₂ induziram lise, mas não conseguiram induzir clearance. Os autores concluíram que o clearance imune é dependente da região Fc do

anticorpo e que a lise pelo Complemento não é um pré-requisito para eliminação do parasita da circulação.

Experimentos com linhagens sensíveis e resistentes à infecção, mostraram correlação entre níveis de IgG do soro de camundongos resistentes e a proteção contra a morte na fase aguda, sugerindo que esses anticorpos líticos poderiam ser usados para monitorar a proteção em experimentos de vacinação (Juri, 1990).

Participação de mecanismos imunes na patologia da doença

Processos imunológicos provavelmente desempenham um papel fundamental na patogênese da Doença de Chagas. As alterações observadas na fase crônica tem sido atribuída a hipersensibilidade aos antígenos do parasita, a novos antígenos ou a autoimunidade (Andrade, 1991).

Os linfócitos T CD4 e CD8 que desempenham importante papel na imunidade celular, também podem contribuir para a patologia da doença. A presença de epítomos de reatividade cruzada entre o hospedeiro e o parasita, e o desenvolvimento de células T auto reativas, constituem argumentos em favor de um processo autoimune levando à doença crônica (Hontebeyrie-Joskowicz e Minóprio, 1991).

Estudos "in vitro" indicam que após ruptura das células parasitadas, antígenos liberados pelo *T. cruzi* podem ser adsorvidos na membrana externa de células não parasitadas, tornando-as alvo para mecanismos imunes (Ribeiro dos Santos e cols, 1991). Alguns autores sugerem que a ativação policlonal durante a fase aguda da infecção, poderia liberar clones "anti-self" que persistiriam por longo período no hospedeiro (Minóprio e cols, 1986).

Soros de chagásicos crônicos apresentam anticorpos contra várias estruturas de tecidos normais como neurônios, laminina da membrana basal, bainha de Schwann dos nervos periféricos, endotélio, vasos e interstício do coração (Ribeiro dos Santos e cols, 1979; Szarfman e cols, 1982).

Dimock e cols (1992), verificaram que camundongos infectados e mantidos a temperatura elevada (36°C) tinham níveis de anticorpos específicos aumentados durante a infecção. Observaram também que a HSP (heat shock protein) do *T. cruzi* pode estar entre os mais imunogênicos antígenos do parasita, servindo como alvo da resposta imune. Como há um alto grau de homologia na sequência entre a HSP do hospedeiro e do parasita (incluindo a HSP 83 do *T. cruzi*), isso tem sido implicado na indução do fenômeno auto-imune.

Proteção induzida contra o *T. cruzi*

Tentativas de proteger vertebrados contra o *T. cruzi* têm sido feitas desde longa data, com parasitas mortos, vivos atenuados, frações subcelulares ou com soros imunes. No entanto, o uso de flagelados vivos apresenta risco de induzir infecção ativa, pela inoculação de resíduos virulentos do organismo que tenham escapado do processo de atenuação (Brener, 1980).

Menezes (1975), observou que hospedeiros vertebrados imunizados com formas de cultura de *T. cruzi*, apresentam proteção parcial após desafio com formas sanguíneas homólogas e virulentas. A utilização de formas do parasita obtidas de cultura de células, mortas por processos químicos ou físicos, também conferem proteção parcial, diminuindo a parasitemia e aumentando a sobrevivência (Brener, 1980). Parasitas provenientes de cultura de tecidos, irradiados com 150 KR, foram usadas como "vacina viva" em camundongos, levando a perda de sinais de fase aguda, baixa parasitemia e mortalidade (Hanson, 1976).

A imunização com a fração flagelar de epimastigota de *T. cruzi*, protege camundongos contra um desafio de tripomastigota sanguícola virulento, diminuindo a parasitemia e mortalidade. Quando essa fração foi liofilizada e utilizada com adjuvante contendo *Bordetella pertussis*, mostrou 100% de proteção em camundongos desafiados com 10^3 tripomastigotas metacíclicos e 60% deles não mostraram sinais de parasitemia (Ruiz e cols, 1986).

Segura e cols (1986), descreveram anticorpos monoclonais contra uma fração flagelar de epimastigota, que apresenta atividade lítica para tripomastigota sanguícola. A transferência passiva dos anticorpos para camundongos Balb/c, confere proteção contra um desafio de 10^3 tripomastigotas sanguícolas, aumentando a taxa de sobrevivência em até 80%, sugerindo que esses anticorpos possam ser úteis na purificação de antígenos envolvidos na imunoproteção.

Pereira e Krettli (1990), verificaram o efeito da reinoculação com tripomastigota no nível de anticorpos protetores de camundongos cronicamente infectados com cepa Y e CL. Soros dos animais infectados com cepa CL tiveram baixos títulos de anticorpos na 4ª semana, e a habilidade de neutralizar a infectividade do tripomastigota sanguícola foi baixa. Os soros de animais infectados com a cepa Y foram fortemente efetivos em diminuir a infectividade do parasita, verificado pela baixa parasitemia e mortalidade dos camundongos.

Hoft e cols (1991), imunizaram camundongos com lisado de *T. cruzi*, emulsionado em adjuvante de Freund e injetaram IFN γ 24 horas antes de cada imunização. Os animais desafiados com tripomastigotas metacíclicos mostraram sinais de infecção, sugerindo que a inclusão do IFN não induziu imunidade. Verificaram também que havia alterações nos níveis de IL-4 e IFN γ , sugerindo que a imunização com parasita mais IFN, está associada a mudanças recíprocas na produção dessas citocinas.

A transferência passiva de soro de animais da fase crônica, confere significativa proteção a hospedeiros não imunes, com resistência superior a 80% nos animais recipientes desafiados com cepa Y, enquanto soros de animais imunizados com antígenos do *T. cruzi*, ou com glicoproteínas de superfície não conferem proteção (Krettli, 1982).

Sakurada e cols (1992), verificaram que anticorpos anti-proteinase de *T. cruzi* são capazes de proteger camundongos do desafio com cepas sanguícolas virulentas, aumentando a sobrevida de linhagens sensíveis à infecção pelo parasita.

Camargo e cols (1989), mostraram que camundongos CBA/J inoculados com formas tripomastigotas da cepa Y do *T. cruzi*, obtidas de cultura de células (TC), apresentam baixa parasitemia e sobrevivem por mais de 30 dias, enquanto camundongos inoculados com formas sanguícolas (TS), tem alta parasitemia e menor sobrevida. A atividade fagocítica avaliada pelo teste da depuração do carbono, apresenta-se menos eficiente em camundongos inoculados com TS do que em animais normais ou inoculados com TC. Cortes histológicos mostraram que o baço de camundongos inoculados com TC apresentam polpa branca bem delimitada e intensa atividade macrofágica, enquanto animais inoculados com TS apresentam somente uma pequena zona de células fagocíticas.

Observaram também, que a injeção de 10^5 formas de TC induz uma resistência precoce em 72 horas, traduzida por um aumento na sobrevida e diminuição da parasitemia, quando desafiados com dose letal de TS. Para determinar as condições ótimas em que ocorreu a indução dessa resistência, Camargo e cols (1991), testaram extrato bruto do parasita, *L. monocytogenes* e Bio-Gel, como inóculo estimulador e desafiaram com formas sanguícolas, em períodos de tempos variados.

Esses autores verificaram que somente inóculos de TC vivos induzem efeito protetor, permitindo uma sobrevida maior que 30 dias em camundongos desafiados com TS. Os grupos controles não sobrevivem mais que 11 dias e o

inóculo melhor indicado para proteção é de 10^5 formas de TC, para um desafio de 10^5 formas de TS após 72 horas. Mostraram ainda, que o número de leucócitos de camundongos inoculados com TS diminui em 48 horas, enquanto o grupo injetado com TC apresenta níveis comparáveis aos normais. Cortes histológicos de timo e baço do grupo TS mostram alterações não observadas em outros grupos. Após 48 horas da infecção, o timo apresenta depleção da zona cortical e o baço, esplenomegalia com hiperplasia da polpa branca e congestão da polpa vermelha. Secções de coração, fígado, medula óssea e linfonodos de todos os grupos mostram-se inalterados.

Todas essas observações permitiram aos autores supor que estruturas moleculares do parasita e do hospedeiro, ou a liberação de produtos celulares, estariam interagindo na fase inicial da resposta imune, desempenhando importante papel no curso da infecção e refletindo decididamente na fase crônica da doença.

OBJETIVOS

Propósito do presente estudo

Os mecanismos de resistência do hospedeiro à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* não são completamente conhecidos. Com o objetivo de contribuir para um melhor esclarecimento das condições que determinam o curso da infecção pelo *T. cruzi*, nos propusemos estudar as alterações ocorridas na fase inicial da infecção chagásica experimental, investigando os seguintes itens:

- A especificidade da resistência precoce ao *T. cruzi*, através do desafio com diferentes estoques do tripanosoma e outros microorganismos patogênicos.
- O efeito comparativo das condições de manutenção (isoladores ou biotérios convencionais), de camundongos isogênicos da linhagem CBA/J, submetidos à infecção com diferentes estoques da cepa Y do *T. cruzi*.
- As alterações celulares do sangue periférico e da estrutura histológica do timo e baço, de camundongos infectados com diferentes estoques da cepa Y.

MATERIAIS E MÉTODOS

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais

1. Foram utilizados camundongos isogênicos CBA/J, machos e fêmeas de 10 a 12 semanas de idade, obtidos de colônias SPF (livre de patógeno específico), criados e mantidos sob barreira no CEMIB-UNICAMP.

O transporte dos camundongos do CEMIB para os isoladores do Departamento de Microbiologia e Imunologia, foi feito através de módulos de plástico estéreis. Durante os experimentos, esses animais foram mantidos em biotério convencional ou em isoladores tipo Trexler, no DMI.

2. Foram utilizados camundongos Swiss, machos e fêmeas de 10 a 12 semanas de idade, obtidos de estoques SPF, para os repiques de manutenção das cepas bacterianas e de toxoplasma.

2. Cepas e estoques de *T. cruzi* e outros microorganismos.

1. Cepas Y de *Trypanosoma cruzi* (Pereira da Silva & Nussenzweig, 1953): originária do laboratório do Dr. Zigman Brener de Belo Horizonte, em 1972 e mantida através de repiques semanais, em camundongos.

1.1. Estoque Y1 original (Y1ORIG): mantida em CBA/J de dois meses de idade, em biotérios convencionais, através de inoculação intraperitoneal de 10⁵ formas tripomastigotas.

1.2. Estoque Y2 original (Y2ORIG): recebida da Dra Tereza Kipnis da USP, mantida por repiques semanais em camundongos CBA/J, nas mesmas condições de Y1 original.

1.3. Estoques TC(Y1) e TC(Y2): derivados de Y1ORIG e de Y2ORIG, respectivamente, tornadas "apatogênicas" (baixa virulência), após a 10ª passagem em cultura de células. Os repiques do parasita foram feitos semanalmente em células Vero ou LLC-MK2, mantidas em meio RPMI com 10% de soro fetal bovino.

1.4. Estoques Y1TC e Y2TC: derivados de Y1ORIG e de Y2ORIG, respectivamente, passados por cultura de células por 12 vezes e novamente

inoculados em camundongos CBA/J, mantidos por repiques semanais dentro de isoladores.

1.5. Estoque Y2NNN: derivado de Y2ORIG, transferida por 10 vezes consecutivas em meio de cultura de N.N.N. e depois reinoculada em camundongo CBA/J, mantido por repiques semanais dentro de isoladores.

2. Cepa CL de *Trypanosoma cruzi*: originária do laboratório da Dra Tereza Kipnis (USP), mantida em camundongos CBA/J de dois meses de idade.

2.1. Estoque CL original (CL ORIG): mantida através de inoculação intraperitoneal de 10^4 formas tripomastigotas, em repiques quinzenais em camundongos de biotério convencional.

2.2. Estoques TC(CL), CLTC e CLNNN: derivados da cepa CL ORIG, mantidas por repiques quinzenais, nas mesmas condições dos estoques da cepa Y.

3. Cepas de *Klebsiella*, sp e *Streptococcus pneumoniae*: as amostras de bactérias utilizadas nos experimentos de indução de resistência, foram isoladas de material coletado para exames diagnósticos de pacientes, no Laboratório de Microbiologia do HC-UNICAMP, e mantidas em meios de cultura específicos.

4. Cepas de *Toxoplasma gondii*: foram cedidas pelo Depto de Parasitologia do IB-UNICAMP. A cepa N, de alta virulência, foi obtida de exsudato peritoneal de camundongos Swiss, na fase aguda da infecção e a cepa C4, de baixa virulência, foi obtida de cérebro de Swiss infectados cronicamente.

3. Infecções experimentais em camundongos

1. Infecção com *Trypanosoma cruzi*

Camundongos CBA/J foram infectados com formas tripomastigotas sanguícolas (TS) e/ou com formas de cultura de células LLC-MK2 (TC), das cepas Y e CL de *T. cruzi*.

Os animais infectados com as cepas sanguícolas Y ou CL original, foram sangrados pelo plexo braquial no 7º dia (para Y) ou 15º (para CL); o sangue foi

colhido em citrato de sódio estéril a 3,8%, o número de parasitas avaliado pelo método de Brener modificado (1962), e inoculadas via intramuscular, 10^5 formas diluídas em 0,1 ml de SSF, na coxa esquerda dos camundongos.

Os camundongos infectados com os estoques TC ou NNN das cepas Y ou CL, mantidos em isoladores, foram sangrados sob condições de esterilidade e os parasitas contados como acima. Os animais foram inoculados via intramuscular, na coxa esquerda, com 10^5 formas em 0,1 ml de SSF, e mantidos dentro de isoladores.

Para infectar camundongos com cepas mantidas em cultura de células, os parasitas foram coletados do sobrenadante das culturas em meio RPMI com 2% de soro fetal bovino. Em seguida foram centrifugados a 2.500 rpm por 15 minutos, a 4°C e o sobrenadante desprezado. O sedimento foi ressuspenso em PBS contendo 2% de glicose, lavado e centrifugado 2 vezes com essa solução. O sedimento final foi ressuspenso em 1ml de tampão e depois diluído 1:100 em solução salina com formaldeído 1%, para contagem em câmara de Neubauer. O total de parasitas inoculados nos camundongos foi 10^5 formas tripomastigotas diluídas em 0,1ml de SSF, por via intramuscular, na coxa direita. Não foi levado em conta a porcentagem de formas amastigotas presentes na amostra.

2. Reativação da virulência, detecção da LD50 e infecção com bactérias

As amostras de *Klebsiella*, sp foram semeadas em meio de Mac Conkey e as amostras de *Streptococcus pneumoniae* semeadas em ágar-sangue. Após incubação por 24 hs à 37°C, as colônias isoladas foram transferidas para tubos contendo meio BHI e incubadas em estufa a 37°C por 24 hs.

Para verificar a virulência da cepa bacteriana, camundongos foram infectados intraperitonalmente, com diferentes concentrações de bactérias. Os animais que apresentaram doença em 24 horas, foram sacrificados e obtida uma suspensão de baço, que foi plaqueada para isolamento e reinoculada nos camundongos.

Quando as amostras atingiram uma virulência capaz de matar os animais entre 24 e 72 horas, as bactérias foram reisoladas como na amostra inicial. No caso da *Klebsiella*, suspensões bacterianas diluídas em solução fisiológica, segundo escala de Mac Farland, foram utilizadas para determinação da LD50.

Os camundongos foram inoculados intraperitonealmente com 0,1 ml da suspensão de *Klebsiella*, em diluições a partir de uma LD50 (1×10^8 bactérias), ou com suspensão contendo 1×10^7 pneumococos.

Amostras de baço infectado foram mantidas congeladas em freezer (-20°C) ou liofilizadas e conservadas a 4°C para possível utilização posterior.

3. Infecção com *Toxoplasma gondii*

A cepa N de *T. gondii*, foi obtida após inoculação de 3 ml de SSF na cavidade peritoneal de camundongo Swiss. O exsudato foi colhido após massagem, e o número de formas taquizoítas foi determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Camundongos CBA/J foram inoculados via intraperitoneal com 0,1ml, contendo 3×10^6 parasitas.

Para obtenção da cepa C4, o cérebro do camundongo foi macerado em tubo tipo Broyer, contendo 2ml de SSF; o número de cistos foi contado entre lâmina e lamínula, em 10 μl da suspensão, segundo McLeod e cols (1984). Camundongos CBA/J foram inoculados com 0,02 ml pela via intraperitoneal, com concentrações que variaram entre 22, 44 ou 66 cistos, conforme o experimento.

4. Inoculação com plasma de camundongos infectados com a cepa Y original

O plasma de camundongos CBA/J infectados com a cepa Y original, e mantidos em biotérios convencionais, foi obtido através de sangria pelo plexo braquial, realizada no 7º dia da infecção. O sangue foi coletado em tubos com citrato de sódio a 3,8%, centrifugado a 2.000 rpm durante 10 minutos, por duas vezes e o plasma obtido foi filtrado em 2 membranas millipore (clarificante e esterilizante) de 0,25 μm .

Camundongos CBA/J foram inoculados com 0,1 ml desse plasma, por via intramuscular, na coxa direita e o grupo controle foi inoculado com plasma de animais normais, obtido nas mesmas condições acima.

5. Testes de caracterização do fator de ativação da virulência do estoque Y original

A fim de se caracterizar possíveis fatores de ativação da virulência do estoque Y original, o plasma de camundongos infectados com esse estoque foi transferido através de passagens seriadas em CBA/J, livres de *T. cruzi*. Após a 2ª passagem nos animais, o plasma foi submetido a filtração em membrana millipore, e 0,1 ml foi inoculado via intramuscular, na coxa direita dos camundongos experimentais.

Na tentativa de detectar um possível "agente viral", o plasma desses animais foi submetido a testes de produção de anticorpos (MAP TEST). Esse plasma mostrou reação positiva ao MHV3 (vírus da hepatite murina), detectado pela reação de imunofluorescência indireta.

Para os testes de neutralização do "agente viral", foram produzidos anticorpos específicos através da imunização de camundongos CBA/J, de 21 dias de idade, com 3 doses de 0,2 ml do plasma virêmico. Após 28 dias da imunização, o soro obtido apresentou título detectável de anticorpos anti-MHV3.

Esse soro contendo anticorpos capazes de reagir com o MHV3, foi utilizado para neutralizar o plasma virêmico, "in vitro". A neutralização foi obtida, misturando-se partes iguais do soro e plasma, e incubando-se a temperatura ambiente por 30 minutos. Os animais foram inoculados com 0,1 ml desse material, por via intramuscular, na coxa direita.

6. Esquema de indução da proteção

Para estudar a indução da resistência precoce, verificada anteriormente por Camargo e cols (1991), os camundongos foram submetidos ao seguinte esquema de inoculação: 10^5 formas viáveis de *T. cruzi* de cultura de células (TC) e após 72 hs do primeiro inóculo, os camundongos foram desafiados com 10^5 formas sanguíneas de estoques variados de *T. cruzi* (TS).

Nos testes de especificidade da resistência precoce, os camundongos foram desafiados após 72 horas com um dos seguintes patógenos: *Toxoplasma gondii*, *Klebsiella, sp* ou *Streptococcus pneumoniae*.

7. Parasitemia e mortalidade

A parasitemia dos animais foi determinada segundo o método de Brener modificado (1962). O sangue foi coletado da veia da cauda, após pequeno corte,

desprezando-se a primeira gota. Com uma micropipeta, foi coletado 5 µl de sangue e colocado entre lâmina e lamínula de 22 x 22 mm.

A preparação foi observada ao microscópio óptico e o número de parasitas estimado em 100 campos foi convertido em parasitas/mm³. Os resultados foram expressos como Log ± desvio padrão. Os animais foram observados diariamente durante o experimento, até 30 ou 60 dias do desafio e o índice de mortalidade foi expresso em percentagem.

8. Leucograma

Para estudo dos leucócitos do sangue periférico dos camundongos, foi coletado 5 gotas de sangue da veia da cauda, em tubos de microcentrifugação com 5 µl de anticoagulante EDTA a 4%. Após homogenização em agitador mecânico, foi colocado 10 µl de sangue em um tubo contendo 200 µl de ácido acético a 3%, para lise das hemácias.

A contagem dos leucócitos foi realizada em câmara de Neubauer, contando-se os quatro quadrantes laterais e calculando-se o número de células por ml. Para contagem diferencial dos glóbulos brancos, foi feito um esfregaço em lâmina com uma gota de sangue. Após a secagem do material, foi feita a coloração de Leishmann: 3 minutos de corante eosina-azul de metileno segundo Leishmann e 15 minutos com água destilada de pH 7,0.

Os esfregaços corados e secos a temperatura ambiente, foram examinados ao microscópio com objetiva de imersão e a contagem diferencial dos leucócitos foi estimada em percentagem.

9. Preparações histológicas

Nos três primeiros dias após a infecção, depois de realizada a sangria para o leucograma, os camundongos foram sacrificados em eterizador e os órgãos linfóides (timo e baço) foram retirados e colocados em fixador de Bouin.

Após a fixação, os órgãos foram processados para inclusão em parafina e secções em micrótomos; os cortes histológicos foram corados por hematoxilina-eosina, segundo instruções descritas por Burke, Weymouth e Seibel (1972).

As fotografias foram feitas com um fotomicroscópio marca Zeiss, utilizando filme de 100 asa, Kodak-TMAX.

10. Análise estatística

O teste t de Student para amostras não pareadas foi utilizado para comparação das médias, e o nível de significância foi considerado para $p \leq 0,05$. Utilizou-se o programa OXSTAT II (Microsoft Corporation, 1985) para avaliação dos dados.

RESULTADOS

RESULTADOS

1. A especificidade da resistência precoce

A fim de verificar a especificidade da resistência precoce ao *T. cruzi*, foram realizados experimentos em que se determinou a capacidade de várias cepas e estoques do parasita induzir resistência em camundongos CBA/J.

1.1. Resistência precoce induzida por cepas do *T. cruzi* de baixa virulência

Camundongos CBA/J inoculados com diferentes estoques de *T. cruzi* das cepas Y e CL, obtidas de cultura de células, e desafiados 72 horas depois com os estoques Y2TC ou CLTC, obtidos do sangue de animais infectados, reproduziram o fenômeno da resistência precoce descrito anteriormente (TABELA 1).

Os camundongos controles inoculados com TC (Y1 ou Y2), apresentaram baixos níveis de parasitemia e mortalidade. Por outro lado, os animais inoculados com Y2TC apresentaram maior parasitemia, com 100% de mortalidade, demonstrando uma significativa diferença de virulência nesses estoques.

Camundongos inoculados com formas de cultura, que apresentam baixa virulência (TCY1, TCY2 e TCCL) e desafiados 3 dias depois, com formas sanguícolas do parasita (Y2TC e CLTC), apresentaram no pico de parasitemia (7° e 15° dias, respectivamente), menor número de parasitas e no 30° dia, menor índice de mortalidade que os animais controles.

O grupo de camundongos inoculados com TC(Y1) e desafiados com Y2TC mostrou que foi estabelecida uma resistência precoce que evitou a morte dos animais, enquanto que aqueles inoculados com TC(Y2) e desafiados com Y2TC, tiveram apenas proteção parcial.

Os camundongos inoculados com TC(CL) e desafiados com cepas Y2TC ou CLTC, tiveram níveis parasitêmicos semelhantes aos grupos controles. Animais desafiados com CLTC tiveram baixo índice de mortalidade, quando comparados aos animais controles.

Tabela 1

Resistência precoce induzida por cepas de *T.cruzi*, de baixa virulência.

Inóculo 10 ⁵ Parasitas	Desafio 10 ⁵ Parasitas	Parasitemia	Mortalidade (%) /Dias Após Infecção			
			10	15	20	30
TC(Y1)	-	2,1 ± 2,0	0	0	0	0
TC(Y2)	-	1,8 ± 2,5	0	0	0	0
-	Y2TC	5,8 ± 0,1	70	100	-	-
* TC(Y1)	Y2TC	1,0 ± 2,2	0	0	0	0
TC(Y2)	Y2TC	5,0 ± 0,4	20	40	60	60
TC(CL)	Y2TC	5,1 ± 0,15	0	0	0	60
TC(CL)	CLTC	5,5 ± 0,13	0	20	20	20
-	CLTC	6,1 ± 0,14	0	40	100	-
TC(CL)	-	4,95 ± 0,3	0	0	0	0

A parasitemia, no 7º dia após o desafio para a cepa Y, e no 15º para a cepa CL, foi expressa em Log do número de parasitas/mm³ ± DP. O número de CBA/J utilizado no experimento variou de 3 a 5 camundongos por grupo e o asterisco (*) indica valores estatisticamente significativos (p ≤ 0,05), quando comparados aos respectivos controles.

1.2. Especificidade da resistência precoce ao desafio com diferentes cepas e estoques do *T. cruzi*

Os experimentos realizados para testar, como desafiante, diferentes estoques e cepas sanguíneas, mostraram que o estoque TCY2 induziu proteção parcial, com menor nível de parasitemia em camundongos desafiados com estoque Y2NNN, enquanto nos animais desafiados com Y2ORIG não ocorreu proteção. Por outro lado, os animais desafiados com cepas heterólogas tiveram uma significativa diminuição de parasitemia, sem apresentar aumento de sobrevivência (TABELA 2).

Esses dados mostraram que ou a cepa TC(Y2) não induz resistência ao estoque homólogo Y2ORIG, ou existe um fator adicional interferindo no processo. Com relação ao desafio com cepas heterólogas, houve uma diminuição no número de parasitas, sem aumento de sobrevivência.

1.3. Especificidade da resistência precoce ao desafio de bactérias patogênicas

Na TABELA 3, apresentamos os testes de especificidade da resposta de estoques TCY1 a desafios com doses letais de *Klebsiella*, sp e *Streptococcus pneumoniae*. O índice de sobrevivência observado até o 30º dia da infecção, mostrou que as formas avirulentas do *T. cruzi* não prolongaram a sobrevivência dos camundongos desafiados com esses patógenos. Em alguns grupos observou-se um efeito somatório que aumentou a taxa de mortalidade dos animais.

1.4. Especificidade da resistência precoce frente ao desafio com o parasita intracelular *Toxoplasma gondii*

Para verificarmos a capacidade de indução da resistência precoce ao desafio de outros parasitas intracelulares, utilizamos o protozoário *Toxoplasma gondii*, em formas taquizoítas livres ou encistadas. Nesses experimentos, observamos que o tripanosoma não induziu resistência em camundongos desafiados com diferentes concentrações do toxoplasma, visto que não houve aumento na sobrevivência desses animais (TABELA 4).

Tabela 2

Resistência precoce a outras cepas e estoques do *T. cruzi*.

Inóculo 10 ⁵ Parasitas	Desafio 10 ⁵ Parasitas	Parasitemia	Mortalidade(%) / Dias Após Infecção			
			10	15	20	30
TC(Y2)	-	1,8 ± 2,5	0	0	0	0
* TC(Y2)	Y2NNN	3,9 ± 2,2	40	60	60	60
-	Y2NNN	5,6 ± 0,2	60	100	-	-
TC(Y2)	Y2ORIG	5,8 ± 0,3	40	100	-	-
-	Y2ORIG	6,0 ± 0,1	20	100	-	-
* TC(Y2)	CLTC	3,7 ± 2,0	0	100	-	-
-	CLTC	5,9 ± 0,05	20	100	-	-
TC(Y2)	CLNNN	2,0 ± 2,6	0	100	-	-
-	CLNNN	5,6 ± 0,4	0	100	-	-

A parasitemia (7° dia para a cepa Y e 15° para a cepa CL, após o desafio), foi expressa em Log do número de parasitas/mm³ ± DP. Valores estatisticamente significativos (*) para $p \leq 0,05$ e $n = 5$ animais.

Tabela 3

Efeito da resistência precoce determinada pelo TC, frente à infecção por bactérias.

Inóculo 10 ⁵ Parasitas	Desafio Após 72 hs	Sobrevida (%) / Dias Após Infecção					
		1	3	5	15	25	30
TC(Y1)	1.10 ⁵ Y2TC	100	100	100	100	100	100
SSF	1.10 ⁵ Y2TC	100	100	100	20	0	0
TC(Y1)	5.10 ⁷ <i>Klebsiella sp</i>	80	80	80	80	80	80
SSF	5.10 ⁷ <i>Klebsiella sp</i>	100	100	100	100	100	100
TC(Y1)	1.10 ⁸ <i>Klebsiella sp</i>	80	20	20	20	20	20
SSF	1.10 ⁸ <i>Klebsiella sp</i>	80	50	50	50	50	50
TC(Y1)	1.10 ⁷ <i>S. pneumoniae</i>	100	100	80	60	60	60
SSF	1.10 ⁷ <i>S. pneumoniae</i>	100	100	100	40	40	40

O número de camundongos CBA/J utilizado no experimento variou de 4 a 5 animais camundongos por grupo

Tabela 4

Efeito da resistência precoce induzida pelo TC, frente à infecção por *Toxoplasma gondii*.

Inóculo 10 ⁵ Parasitas	Desafio Após 72 hs	Sobrevida(%) / Dias Após Infecção					
		3	6	9	12	15	30
TC(Y1)	SSF	100	100	100	100	100	100
T C(Y1)	1.10 ⁵ Y1TC	100	100	60	60	60	60
SSF	1.10 ⁵ Y1TC	100	100	80	20	0	0
TC(Y1)	3.10 ⁶ <i>T. gondii</i>	100	0	0	0	0	0
SSF	3.10 ⁶ <i>T. gondii</i>	100	20	0	0	0	0
TC(Y1)	44 cistos <i>T. gondii</i>	100	100	40	20	20	20
SSF	44 cistos <i>T. gondii</i>	100	100	40	0	0	0
TC(Y1)	22 cistos <i>T. gondii</i>	100	100	40	20	0	0
SSF	22 cistos <i>T. gondii</i>	100	100	40	40	40	40

O número de CBA/J utilizado no experimento variou de 3 a 5 camundongos por grupo

2. Efeito de diferentes estoques de *T. cruzi* sobre camundongos SPF.

Estoques do *T. cruzi* provenientes de cultura de células (TCY), formas sanguícolas mantidas em animais de isoladores (YTC) ou formas sanguícolas mantidas em camundongos de biotério convencional (YORIG), foram utilizadas na infecção de camundongos SPF, da linhagem CBA/J. A parasitemia e mortalidade desses animais estão mostrados na TABELA 5.

Os resultados mostram que os camundongos inoculados com estoques de cultura (TCY1) apresentaram níveis de parasitemia menores que os estoques Y1ORIG e Y2TC e sobreviveram por mais de 30 dias, enquanto que os animais inoculados com o estoque Y2TC, mantidos em isoladores, sobreviveram até o 17º dia e apresentaram nível de parasitemia significativamente menor do que aqueles inoculados com Y1ORIG.

Entretanto, em camundongos utilizados no repique semanal da cepa Y original do *T. cruzi*, mantidos em biotério convencional, sempre foi observado alto índice de parasitemia no 7º dia após a infecção e 100% de mortalidade em 10 ± 1 dias. Esses resultados sugerem que algum outro fator possa estar influenciando na virulência desse estoque.

2.1. Alterações celulares do sangue periférico e dos órgãos linfóides

Nos experimentos anteriores, verificamos diferenças na virulência dos estoques, utilizados para estudos de indução da resistência precoce. A fim de identificarmos os fatores que determinavam essas mudanças, procuramos analisar as alterações que esses estoques induziam no sangue periférico e órgãos linfóides dos animais, durante a fase inicial da infecção.

Para tanto, camundongos CBA/J foram infectados com os diferentes estoques da cepa Y de *T. cruzi*, e submetidos ao estudo do leucograma e de cortes histológicos do timo e baço.

2.1.1. Leucograma e análise histológica de timo e baço de camundongos normais ou infectados com estoques da cepa Y provenientes de cultura de células

Os animais inoculados com parasitas mantidos em cultura de células, estoques TC(Y1) e TC(Y2), apresentaram a contagem total e diferencial de leucócitos semelhante ao grupo controle normal (TABELA 6).

A análise histológica do timo desses animais apresentava-se semelhante aos controles normais (FIGURA 1), enquanto o baço mostrava a polpa branca mal delimitada, com pequena congestão da polpa vermelha (FIGURA 2).

TABELA 5

Parasitemia e mortalidade de camundongos CBA/J infectados com estoques da cepa Y de *T. cruzi*, mantidos em diferentes ambientes.

Inóculo 10 ⁵ Parasitas	Parasitemia	Mortalidade (%) / Dias Após Infecção			
		5	10	17	30
TC(Y1)	2,1 ± 2,0	0	0	0	0
Y2 ORIG	6,0 ± 0,13	0	100	-	-
Y2 TC	5,5 ± 0,26	0	0	100	-

O pico de parasitemia , observado no 7º dia da infecção, está expresso em Log do número de parasitas/mm³ ± DP. Valores estatisticamente significativos para p ≤ 0,05 e n= 5.

Tabela 6

Leucograma de camundongos CBA/J inoculados com 10^5 formas de *T. cruzi*, dos estoques de cultura de células.

Inóculo	Horas Após Inóculo	Número de Leucócitos ($\times 10^6/\text{ml}$)	Contagem Diferencial (%)	
			PMN	LINFÓCITO
SSF	24	$9,6 \pm 1,9$	19	80
	48	$11,3 \pm 1,8$	17	81
	72	$12,9 \pm 2,7$	23	76
TC(Y1)	24	$10,4 \pm 2,0$	17	82
	48	$11,8 \pm 4,5$	27	70
	72	$14,2 \pm 0,7$	28	71
TC(Y2)	24	$14,4 \pm 3,2$	25	73
	48	$8,7 \pm 0,7$	32	65
	72	$11,7 \pm 2,0$	25	73

O número de CBA/J utilizado no experimento variou de 3 a 5 camundongos por grupo.

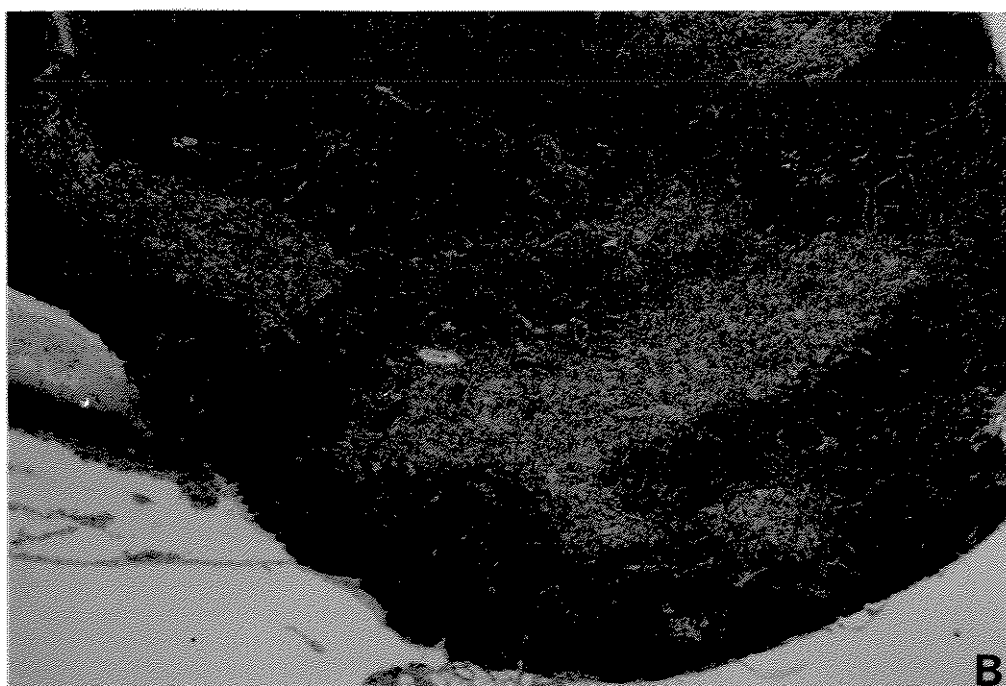
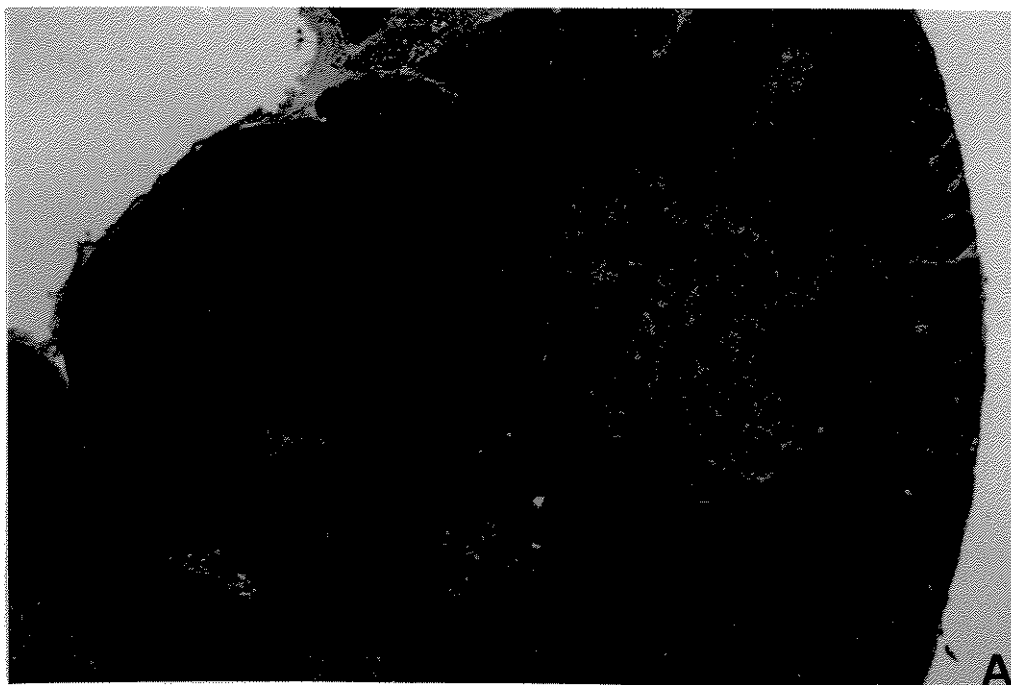


Figura 1- Cortes histológicos de timo de camundongos CBA/J normais (1A) e infectados com cepa Y de cultura de células (1B). Coloração pela HE. Aumento de 64x.

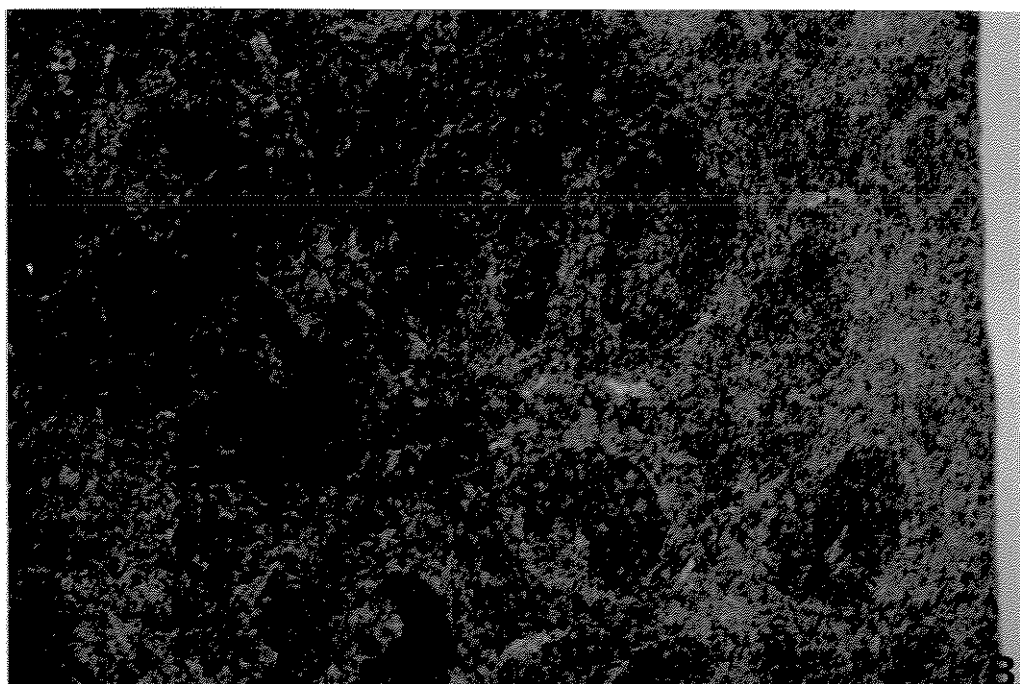
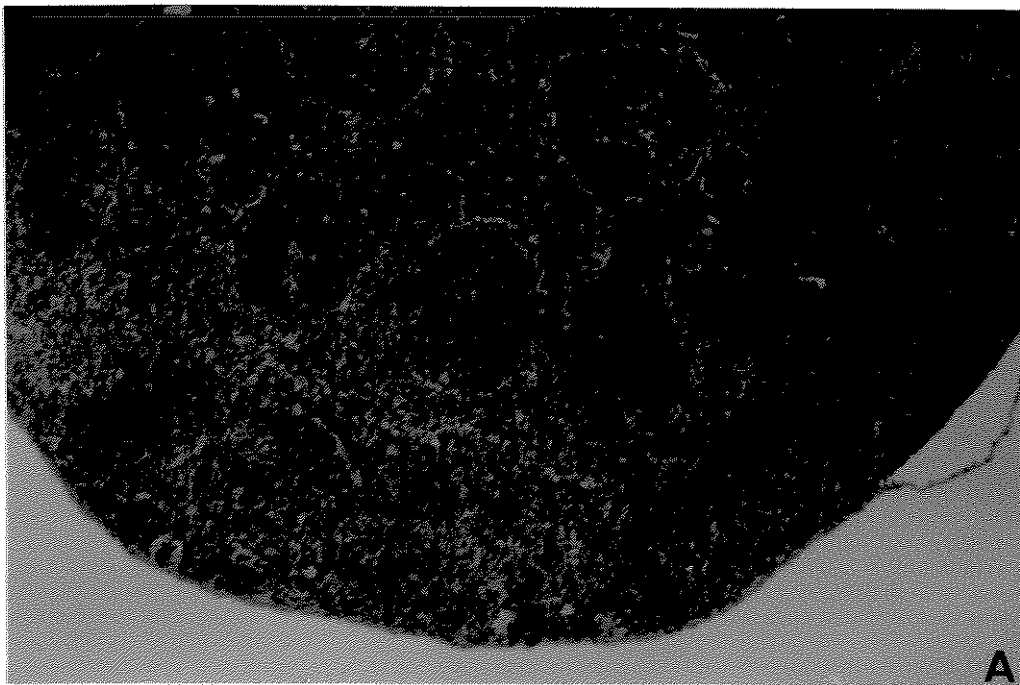


Figura 2 - Cortes histológicos de baço de CBA/J normal (2A) e infectado com a cepa Y de cultura de células (2B). Coloração pela HE. Aumento de 64x.

Notar a polpa branca mal delimitada e congestão da polpa vermelha.

2.1.2. Leucograma e análise histológica de timo e baço de camundongos normais ou infectados com estoques do parasita obtidos de animais mantidos em isoladores

Os camundongos inoculados com formas tripomastigotas sanguíneas dos estoques Y1TC, Y2TC e Y2NNN, mostraram que a contagem total e diferencial dos leucócitos se mantinha em níveis semelhantes aos controles, durante os 3 dias analisados (TABELA 7).

Na análise histológica dos órgãos linfóides desses grupos, observamos que o timo e baço apresentavam-se semelhantes ao grupo inoculado com o estoque de cultura de células (dados não mostrados).

2.1.3. Leucograma e análise histológica de timo e baço de camundongos normais ou infectados com estoques da cepa Y, mantidos em biotério convencional

Os camundongos inoculados com os estoques da cepa Y, provenientes de animais mantidos em biotérios convencionais (Y original), apresentavam acentuada diminuição no número de leucócitos circulantes, em relação aos controles normais, após 48 horas da infecção, enquanto que em 72 horas essas diferenças eram menores, apesar de estatisticamente significativas. A contagem diferencial dessas células mostrava uma inversão de valores percentuais na relação PMN/linfócitos, reflexo de uma forte diminuição de linfócitos nos 3 primeiros dias da infecção (TABELA 8).

Os cortes histológicos do timo desses animais mostravam notáveis alterações estruturais, com aumento de linfócitos após 48 hs e quase sem delimitação das zonas cortical e medular (dados não mostrados). Após 72 hs da infecção, não havia diferenciação entre córtex e medula, onde se observava muitas células em divisão (FIGURA 3a).

Esses animais apresentavam esplenomegalia, provavelmente devido a hiperplasia da polpa branca e a congestão da polpa vermelha (FIGURA 3b).

Tabela 7

Leucograma de camundongos CBA/J, inoculados com 10^5 formas dos estoques da cepa Y de *T. cruzi*, mantidos em isoladores.

Inóculo	Horas Após Inóculo	Número de Leucócitos ($\times 10^6/\text{ml}$)	Contagem Diferencial(%)	
			PMN	LINFÓCITO
SSF	24	$8,6 \pm 1,4$	20	77
	48	$7,2 \pm 1,5$	22	77
	72	$7,8 \pm 2,9$	27	72
Y1TC	24	$10,4 \pm 1,4$	14	84
	48	$8,9 \pm 2,4$	32	63
	72	$8,6 \pm 0,0$	32	66
Y2TC	24	$8,0 \pm 3,4$	23	74
	48	$11,2 \pm 2,6$	25	72
	72	$8,5 \pm 0,5$	29	68
Y2NNN	24	$9,9 \pm 0,6$	25	73
	48	$10,0 \pm 1,3$	25	72
	72	$8,3 \pm 1,3$	28	71

O número de CBA/J utilizado no experimento variou de 3 a 5 camundongos por grupo.

Tabela 8

Leucograma de camundongos CBA/J inoculados com 10^5 formas da cepa Y original de *T. cruzi*, mantidos em biotério convencional.

Inóculo	Horas Após Inoculação	Número de Leucócitos ($\times 10^6/\text{ml}$)	Contagem Diferencial (%)	
			PMN	LINFÓCITO
SSF	24	$10,0 \pm 2,7$	18	80
	48	$14,4 \pm 2,0$	19	79
	72	$11,5 \pm 2,3$	20	78
* Y1 ORIG	24	11.4 ± 3.3	83	16
	48	3.6 ± 1.4	75	23
	72	8.3 ± 1.8	49	46
* Y2 ORIG	24	7.8 ± 1.3	79	17
	48	3.1 ± 0.4	65	32
	72	5.3 ± 1.0	55	43

* Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$ e n de 3 a 5.

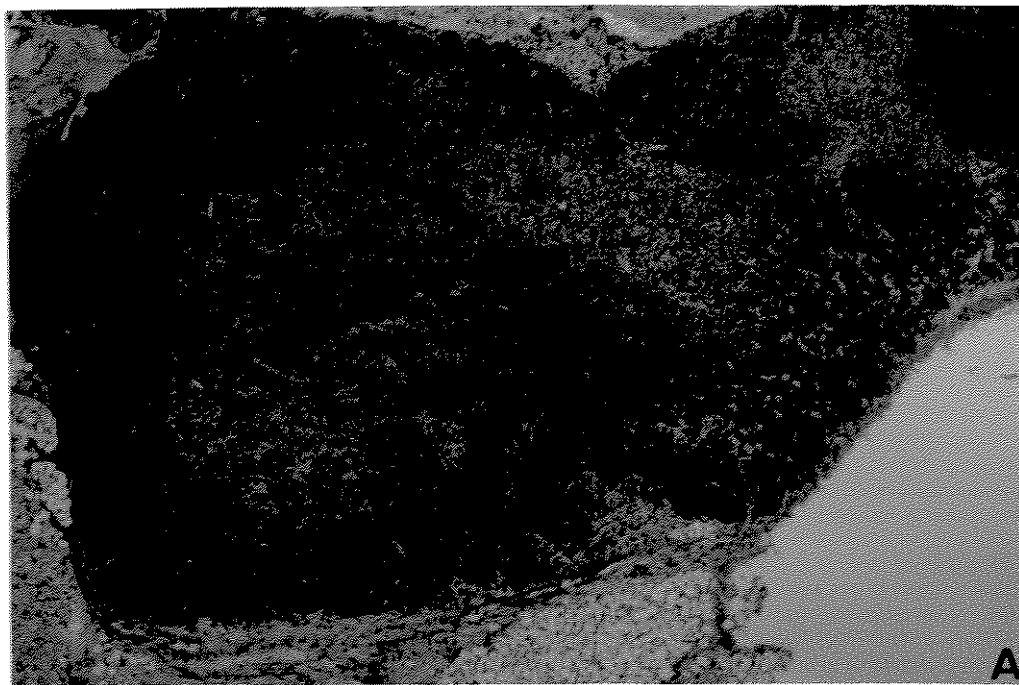


Figura 3 - Cortes histológicos de timo (A) e baço (B) de CBA/J, após 72 hs da infecção com a cepa Y original. Coloração pela HE. Aumento de 64x.

Notar a ausência de diferenciação entre córtex e medula tímica (3A) e o aumento da polpa branca, com congestão da polpa vermelha do baço (3B).

2.1.4. Leucograma e análise histológica de camundongos normais ou inoculados com plasma de CBA/J infectados com estoques diferentes da cepa Y

Observadas as alterações nas células do sangue e órgãos linfóides dos camundongos, induzidas pela cepa Y original do *T. cruzi*, e a fim de verificar se fatores solúveis do parasita pudessem ser responsáveis pelas alterações descritas, grupos de CBA/J foram inoculados com o plasma filtrado de camundongos infectados com diferentes estoques do parasita.

Os grupos de camundongos inoculados com plasma filtrado de animais previamente infectados com estoques da cepa Y original, mostraram as mesmas alterações observadas nos animais inoculados com o parasita. Foi observada uma acentuada diminuição do número total de leucócitos e alterações na relação PMN/linfócitos, nas primeiras horas da infecção (TABELA 9).

As alterações histológicas observadas no timo e baço desses animais estão mostradas na FIGURA 4, e foram semelhantes em maior ou menor proporção, àquelas encontradas nos órgãos de animais infectados com a cepa Y original.

Os animais que receberam plasma filtrado proveniente de camundongos infectados com cepa Y1TC, mostraram número de leucócitos compatíveis aos controles normais e não apresentaram alterações na contagem diferencial. Os cortes histológicos desses animais mostraram apenas um aumento de células em mitose na cortical tímica, e pequeno aumento na polpa branca do baço (dados não mostrados).

Tabela 9

Leucograma de CBA/J inoculados com plasma de camundongos infectados com estoques da cepa Y de *T. cruzi*, mantidos em diferentes condições ambientais.

Inóculo	Horas Após Inóculo	Número de Leucócitos ($\times 10^6/\text{ml}$)	Contagem Diferencial(%)	
			PMN	LINFÓCITO
Plasma normal	24	$6,3 \pm 0,9$	20	78
	48	$7,5 \pm 1,3$	25	73
	72	$9,1 \pm 0,8$	22	76
Plasma/ Y1TC	24	$10,2 \pm 1,7$	23	75
	48	$10,2 \pm 1,3$	34	63
	72	$10,6 \pm 0,8$	20	79
* Plasma/Y1ORIG	24	$4,3 \pm 1,4$	61	32
	48	$3,5 \pm 0,7$	59	37
	72	$7,6 \pm 2,6$	32	65
* Plasma/Y2ORIG	24	$8,7 \pm 1,5$	71	28
	48	$2,6 \pm 0,5$	69	30
	72	$3,7 \pm 0,2$	50	48

* Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$ e n de 3 a 5.

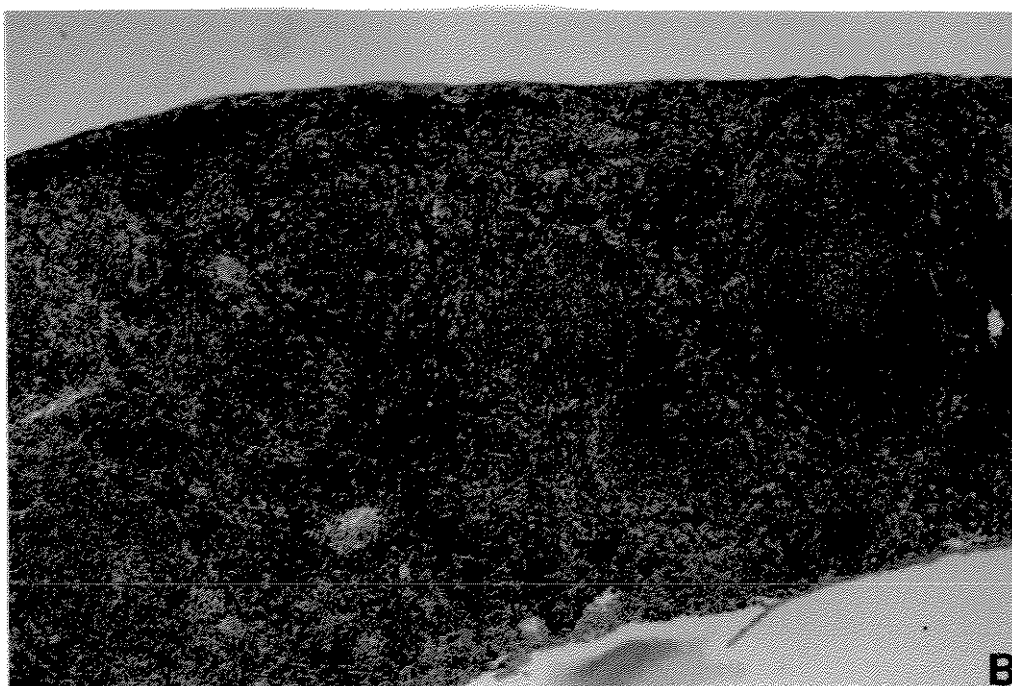
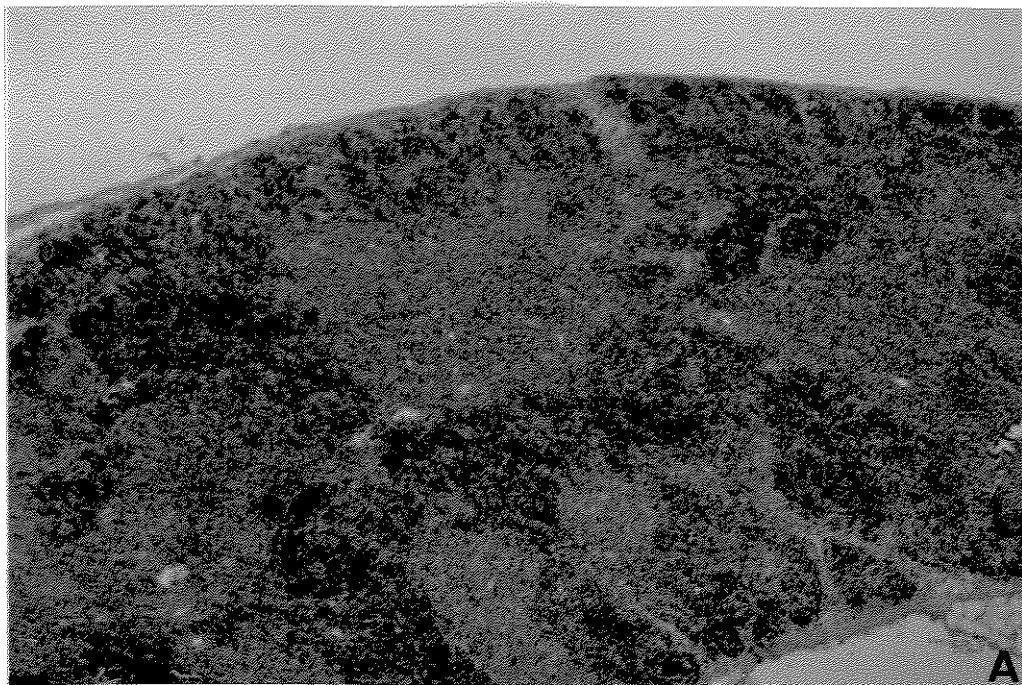


Figura 4 - Cortes histológicos de timo (A) e baço (B) de CBA/J, após 72 hs da inoculação com plasma de animais infectados com cepa Y original. Coloração pela HE. Aumento de 64x.

Notar a similaridade dos cortes histológicos com a figura 3.

2.1.5. Leucograma e análise histológica de timo e baço de camundongos normais ou inoculados com plasma de CBA/J infectados com cepa Y original, submetido a diferentes tratamentos

Os experimentos descritos na TABELA 10, foram realizados a fim de verificar se o responsável pelo aumento da virulência do estoque Y original do *T. cruzi*, seria uma partícula replicante em animais ou um fator liberado pelo parasita.

Os camundongos inoculados com plasma filtrado de animais previamente infectados com cepa Y original, e submetido a passagens seriadas em CBA/J, apresentaram uma queda acentuada no número total de leucócitos, principalmente após 48 horas da infecção, com diminuição de linfócitos na contagem diferencial e inversão na relação PMN/linfócitos, quando comparados aos controles normais.

O grupo inoculado com plasma filtrado de animais infectados com Y2ORIG, e neutralizado com soro contendo anticorpos anti-MHV3, apresentou resultados semelhantes ao grupo inoculado com plasma Y2ORIG, com as mesmas alterações na contagem total de células, após 48 horas. Com relação a contagem diferencial, foram encontrados número de células intermediários entre os grupos de plasma de animais normais e infectados.

O grupo inoculado com plasma filtrado proveniente de camundongos inoculados com cepa Y2ORIG e em seguida inoculado com a cepa Y2TC, de isolador, mostrou alterações nas contagens de leucócitos, semelhantes aos grupos de animais inoculados com o estoque Y2ORIG ou com o plasma de Y2ORIG.

Os cortes histológicos de timo e baço, tanto do grupo de plasma Y2ORIG, como do grupo incubado com anticorpos anti-MHV3, ou do grupo Y2TC + plasma Y2ORIG, mostraram as mesmas alterações observadas nos órgãos linfóides de animais infectados com a cepa Y original (FIGURA 5).

Tabela 10

Leucograma de CBA/J inoculados com plasma de camundongos normais ou infectados, submetido a diferentes tratamentos.

Inóculo	Horas Após Inóculo	Número de Leucócitos ($\times 10^6/\text{ml}$)	Contagem Diferencial(%)	
			PMN	LINFÓCITO
Plasma normal	24	$6,3 \pm 0,9$	20	78
	48	$7,5 \pm 1,3$	25	73
	72	$9,1 \pm 0,8$	22	76
* Plasma Y2ORIG (2ª passagem)	24	$3,3 \pm 0,7$	68	30
	48	$2,0 \pm 0,4$	61	37
	72	$5,5 \pm 1,5$	30	67
* Plasma Y2ORIG + anti-MHV3	24	$6,9 \pm 2,5$	53	46
	48	$1,6 \pm 0,5$	50	48
	72	$4,6 \pm 0,8$	40	58
* Plasma Y2ORIG + Cepa Y2TC	24	$4,1 \pm 1,1$	68	31
	48	$1,6 \pm 0,8$	65	34
	72	$5,3 \pm 1,3$	50	49

* Valores estatisticamente significativos para $p \leq 0,05$ e n de 3 a 5.

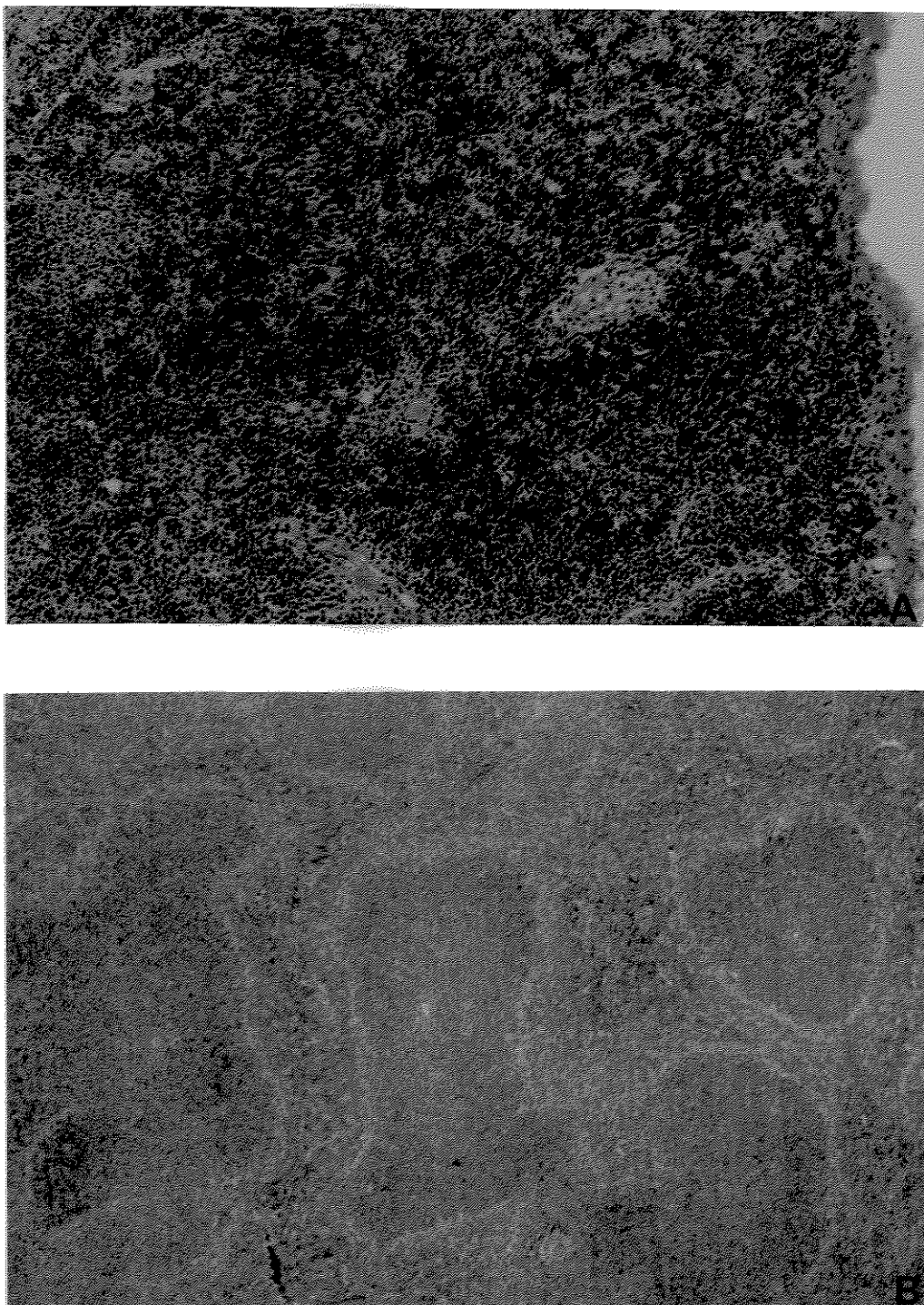


Figura 5 - Cortes histológicos de timo (A) e baço (B) de CBA/J inoculados com plasma de animais infectados com Y original, após a 2^a passagem em camundongos. Coloração pela HE.

Aumento de 128x (timo) e 64x (baço).

Notar ausência de delimitação córtex/ medula do timo (5A) e o acentuado aumento da polpa branca do baço (5B).

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

A infecção chagásica experimental se caracteriza por 3 fases distintas: pré-patente ou precoce, aguda e crônica. A fase aguda, bastante investigada (Santos, 1973; Trischmann, 1983; Torrico, 1991), se caracteriza pelo elevado número de parasitas no sangue e pela morte dos hospedeiros susceptíveis. Na fase crônica se observa baixa parasitemia, sobrevivência da maioria dos hospedeiros e produção de anticorpos específicos, que podem levar a processos autoimunes (Minoprio e cols, 1986; Ribeiro dos Santos e cols, 1991).

A fase precoce da infecção se caracteriza pela não detecção de parasitas no sangue, e recentemente tem sido muito investigada pelas mudanças que induzem no sistema imune do hospedeiro, fundamentais no desenvolvimento da infecção (Camargo e cols, 1989 e 1991; Cardillo e cols, 1993).

Em nosso trabalho sobre a resistência precoce, confirmamos os dados obtidos por Camargo e cols (1989 e 1991), que mostraram que camundongos CBA/J desenvolvem um mecanismo protetor na fase aguda precoce da infecção chagásica. Os animais previamente inoculados com formas de parasitas provenientes de cultura de células, tem um aumento de resistência quando desafiados, três dias depois, com formas sanguícolas virulentas. Apenas formas vivas de cultura de células aumentam a sobrevivência do hospedeiro, uma vez que formas epimastigotas vivas e extratos brutos de tripomastigotas não conferem resistência em curto período de tempo.

Neste nosso trabalho verificamos que outros estoques da cepa Y e outras cepas do *T. cruzi*, também são capazes de induzir resistência no hospedeiro infectado. No entanto, dependendo da cepa de cultura inoculada, a proteção é parcial, evidenciada pelos níveis parasitêmicos e pelo índice de mortalidade.

Nos experimentos em que utilizamos a cepa Y como indutora de proteção, e como desafiante estoques da cepa Y ou CL, verificamos que a resistência precoce é mais eficiente quando são utilizadas cepas homólogas, sugerindo que a indução da resistência entre cepas diferentes do parasita é parcialmente estabelecida. Nesses experimentos, a diminuição do nível de parasitemia nos animais experimentais em relação aos controles, sugere uma resposta específica

do hospedeiro, apesar de nem sempre o controle da parasitemia e a sobrevida do hospedeiro envolverem os mesmos mecanismos (Trischmann e cols, 1978).

As pesquisas sobre imunidade protetora conferida por cepas heterólogas do parasita, em geral abordam a resistência na fase crônica da infecção, quando a produção de anticorpos protetores é elevada (Krettli, 1983). Nessa fase da infecção, tem sido observado que camundongos Swiss e C57Bl10 infectados previamente com cepa Y, ficam protegidos contra o desafio de cepas homólogas, mas quando desafiados com cepas heterólogas aumentam a sobrevida, mas não diminuem a parasitemia (Kloetzel e Lafaille, 1983).

Outros autores tem mostrado que na imunidade conferida após um tempo mais longo entre a inoculação e o desafio, é possível controlar a fase aguda com consequente redução na parasitemia, prevenção da reagudização e aumento na sobrevida (Ritter e Rowland, 1984; Basso e cols, 1991). Nesses experimentos foram utilizados formas epimastigotas do parasita como pré tratamento, e o desafio com formas sanguícolas foi realizado após um período superior a 30 dias, enquanto que em nosso trabalho foram utilizadas formas tripomastigotas como pré tratamento e o desafio após três dias, sugerindo que os mecanismos envolvidos nesses processos podem ser distintos.

Alguns trabalhos anteriores sobre indução de resistência por formas vivas do parasita, tiveram como objetivo imunizar o hospedeiro contra a Doença de Chagas (Menezes, 1969). No entanto, esses procedimentos geralmente levam a multiplicação do parasita, podendo provocar uma infecção branda no hospedeiro, mas com consequências imprevisíveis a longo prazo (Teixeira, 1987).

Como o presente trabalho tem por objetivo caracterizar fenômenos básicos envolvidos na resposta precoce ao *T. cruzi*, questionamos se essa resistência poderia corresponder a uma resposta específica ao parasita, ou seria ativada por mecanismos inespecíficos contra qualquer outro patógeno.

Nesse sentido foram realizados testes de especificidade da resistência precoce, inoculando-se camundongos com formas "avirulentas" do *T.cruzi* e desafiando, após curto período de tempo, com diferentes microorganismos como *Klebsiella* sp, *Streptococcus pneumoniae* e *Toxoplasma gondii*. Nossos resultados mostraram que tripanosomas provenientes de cultura de células não conseguem induzir resistência contra esses patógenos, mas ao contrário, exercem uma ação sinérgica para aumentar a mortalidade dos animais.

O conjunto de dados obtidos, sugere que essa resistência precoce induzida nos camundongos é direcionada para o parasita que o estimulou, mas que

mecanismos efetores específicos e inespecíficos podem estar interagindo nesse processo.

A resistência ao *T. cruzi* em estágios mais precoces da infecção, parece ser timo-dependente (Trischmann, 1983). Para explicar esse mecanismo de resposta celular, poderíamos citar a função efetora direta, incluindo citólise (Nickell e cols, 1993) ou a secreção de citocinas ativadoras de macrófagos, como o IFN γ (Liew e Cox, 1991).

A produção de NO por macrófagos ativados pelo IFN γ tem sido apontada como um dos mecanismos responsáveis pela destruição de formas intracelulares de *Leishmania major* (Liew e Cox, 1990) e de *T. cruzi* (Vespa e cols, 1994) e pelo aumento da resistência ao tripanosoma (Muñoz-Fernandes e cols, 1992; Petray e cols, 1994). Além disso, macrófagos ativados liberam citocinas inflamatórias como a IL-1, IL-6 e TNF, que atuam sinergicamente, acelerando o clearance dos patógenos e aumentando a resistência do hospedeiro (Titus e cols, 1991).

Outro mecanismo que poderia estar envolvido na indução da resistência precoce ao parasita, é a ativação de células NK, conhecidas pela sua capacidade de produzir IFN γ no início da infecção (Romagnani, 1992; Silva e cols, 1992). O IFN γ também pode aumentar a resposta imune específica ao *T. cruzi*, induzindo aumento de expressão de moléculas Ia em várias células apresentadoras de antígenos (Torrico e cols, 1991).

A infecção por formas de cultura do *T. cruzi* também poderia induzir a produção de IFN γ nos primeiros dias da infecção, semelhante à observada em infecções por *Listeria monocytógenes* (Dunn e North, 1991), onde ocorreu produção máxima de IFN γ endógeno no 2º dia da infecção, antes mesmo que a imunidade mediada por células T fosse ativada.

A ausência de resistência observada nos camundongos inoculados com formas de cultura da cepa Y, e desafiados com outros parasitas não relacionados ao *T. cruzi*, reforçam a idéia que esse mecanismo protetor é induzido especificamente pelo parasita, e que pode ter nos linfócitos T as células responsáveis pela ativação de macrófagos, através de linfocinas como IFN γ e IL-4, ou atuando diretamente como células efetoras (Torrico, 1991; Hoft, 1991; Nickell e cols, 1993).

Durante os nossos trabalhos, verificamos uma grande variação na virulência dos diferentes estoques da cepa Y, que refletiam sobre os níveis de parasitemia e mortalidade do hospedeiro. As formas do parasita provenientes de cultura de células se mostraram menos virulentas que as formas mantidas no

hospedeiro vertebrado, concordando com resultados descritos anteriormente por Camargo e cols (1989), Ley e cols (1988) e Carvalho e Souza (1986), mostrando que cepas de *T. cruzi* mantidas em meios artificiais, perdem algumas de suas características patogênicas, mas conservam sua infectividade para o hospedeiro vertebrado.

A elevada virulência do estoque Y original, mantida em animais de biotérios convencionais, assim como a linfopenia do sangue periférico e alterações histopatológicas do timo e baço, foram semelhantes às descritas por Camargo e cols (1991).

No entanto, o estoque de *T. cruzi* mantido em animais de isoladores induzia baixa parasitemia, e os hospedeiros apresentavam número total de células e aspectos histológicos semelhantes aos de animais normais.

Rangel e colaboradores observaram recentemente (1994), a presença de um Coronavírus relacionado ao MHV-3, infectando camundongos usados na manutenção do tripanosoma. Vírus desse grupo são capazes de aumentar a patogenicidade do parasita ou alterar a resposta imune do hospedeiro.

O MHV e os coronavírus de rato são frequentemente encontrados em populações de animais de laboratório e sua interferência em pesquisa básica tem sido relatada primariamente no campo da imunologia e biologia dos tumores (Kraft e Meyer, 1990; Compton e cols, 1993).

Uma vez que o *T. cruzi* vem sendo mantido há anos, por passagens seriadas em camundongos de ambientes convencionais, esses animais podem carregar infecções naturais, por diferentes patógenos. Por outro lado, a passagem sistemática do tripanosoma em células de linhagem, usualmente leva a eliminação desses agentes etiológicos.

Assim sendo, levantamos a hipótese que um fator adicional ou agente etiológico estivesse presente no estoque original de *T. cruzi*, causando as alterações observadas. Nossos resultados mostraram alterações substanciais no leucograma, bem como, alterações na estrutura dos órgãos linfóides, quando os camundongos foram inoculados com o plasma filtrado, obtido de animais infectados com a cepa Y e mantidos em biotérios convencionais. Esses resultados sugerem a presença de um vírus ou de um fator secretado pelo parasita ou pelo hospedeiro infectado

A hipótese de se tratar de um agente infeccioso com capacidade de se reproduzir no hospedeiro, foi comprovada nos experimentos de transferência de plasma filtrado de animal infectado com *T. cruzi* para animais normais. Nesses

experimentos de transferência consecutiva de plasma, também observamos linfopenia e desarranjo na estrutura do timo e baço dos animais.

Os anticorpos anti- MHV encontrados no soro desses animais, detectados em testes de imunofluorescência indireta (MAP TEST), sugerem que um agente replicante seja o responsável pelas alterações histopatológicas, e não um fator liberado pelo *T. cruzi*.

Os experimentos onde tentamos a neutralização do antígeno viral, mostraram apenas resultados parciais de neutralização, provavelmente devido ao baixo título de anticorpos obtidos do soro imune.

Vários trabalhos associam a presença de vírus murino com supressão da resposta imune. Lamontagne e cols (1989), mostraram uma correlação entre a patogenicidade do MHV-3 e as alterações dos órgãos linfóides, com replicação viral nos linfócitos levando à lise celular. Esses autores concluíram que a depleção de células do baço ou timo não é somente resultado da infecção viral dos linfócitos, mas também podem refletir uma desordem na linfopoiese tímica.

O timo dos camundongos experimentais inoculados com plasma filtrado, apresenta uma estreita zona cortical na periferia do órgão e presença de grande número de células em divisão na medula, sugerindo que o timo está sendo fortemente estimulado.

Em animais infectados com o MHV-3, a arquitetura do timo é alterada após a destruição das células do estroma, induzida pelo vírus, bloqueando a linfopoiese e interrompendo os estágios de maturação dos timócitos. Além disso, provoca intensa diminuição na subpopulação de linfócitos $CD4^+CD8^-$, levando ao estado imunossupressivo funcional dos animais (Lamontagne e cols, 1991).

Alterações semelhantes às aquelas que nós observamos, tem sido demonstrada também em camundongos infectados com o citomegalovírus murino (MCMV), que apresentam severa atrofia tímica com perda de timócitos da área cortical, provavelmente relacionada a depleção de células $CD4^+CD8^+$ (Price e cols, 1993). Os autores sugerem que a involução do órgão pode se originar de uma aceleração do trânsito de células através do timo, levando a perda da arquitetura própria.

A diminuição dos linfócitos do sangue dos camundongos experimentais, após 48 horas da inoculação do plasma contendo vírus, sugere que essas células podem ter sido sequestradas pelo baço ou que sofreram lise pelo contato viral.

Tem sido verificado que camundongos susceptíveis à infecção aguda pelo MHV-3 apresentam acentuada diminuição no número total de leucócitos

circulantes, com queda de linfócitos ao redor do 3º dia da infecção (Piazza e cols, 1965; Fujioka e cols, 1985), sugerindo que essas células são importantes não somente como efetoras na eliminação do vírus, mas também como célula-alvo para o crescimento viral.

À semelhança de infecções virais, camundongos com 14 dias de infecção pela cepa Y ou CL de *T. cruzi*, apresentam progressiva atrofia tímica, com depleção celular no córtex e comprometimento de células do epitélio e da matriz extracelular (Savino e cols, 1989).

Também tem sido observado que o tratamento de camundongos ou ratos com drogas imunossupressoras como a ciclosporina A, levam a alterações no ambiente tímico com acentuada depleção nas células da zona medular (Kanariou e cols, 1989 ; Schuurman e cols, 1990). Essa perda de linfócitos pode estar relacionada ao aumento de migração celular do timo para órgãos periféricos como o baço, ou ser devido a um bloqueio no estágio de diferenciação linfocitária do córtex para a medula.

Nossos resultados mostram que a coinfeção do vírus murino com o *T. cruzi* induz uma exacerbação na patogenicidade do parasita, levando às alterações dos linfócitos no sangue periférico, e da estrutura histológica do timo e baço de camundongos, na fase mais precoce da infecção. Essa exacerbação da resposta imune pode ser devida a somatória de características imunossupressoras do tripanosoma (Sztein e Kierszembau, 1993) e do vírus (Lamontagne e Jolicoeur, 1991).

O conjunto de dados apresentados nesse trabalho mostra que a indução de proteção com cepas "avirulentas" do *T. cruzi*, é um fenômeno que ocorre de maneira mais evidente entre cepas homólogas, como uma resposta específica ao parasita, provavelmente envolvendo mecanismos de células T.

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

O presente trabalho nos permitiu concluir que:

1. A resistência precoce é um fenômeno induzido por formas de *T. cruzi*, de baixa virulência, provenientes de cultura de células, durante a fase aguda da infecção experimental, cuja consequência é a diminuição da mortalidade e do número de parasitas no sangue dos camundongos.

2. A indução da resistência precoce por diferentes estoques da mesma cepa, sugere a existência de antígenos comuns que a determinam.

3. O estado de resistência induzida por formas “avirulentas” do *T. cruzi*, não minimizou o processo infeccioso com outros patógenos como *Klebsiella*, *sp*, *Streptococcus pneumoniae* e *Toxoplasma gondii*, sugerindo que esse mecanismo envolve respostas específicas do parasita.

4. Vírus murinos coinfetando camundongos utilizados nas pesquisas sobre resistência precoce ao *T. cruzi*, podem exacerbar as manifestações da infecção. Em algumas situações essas reações podem interferir na sobrevivência dos animais, mascarando a indução da resistência precoce.

5. A linfopenia e as alterações histopatológicas do timo e baço de camundongos infectados com a cepa Y original do *T. cruzi*, provavelmente se deve a presença de vírus murino contaminando o estoque do parasita.

6. Os estudos de caracterização das células do sistema imune e dos fatores secretados pelas mesmas durante a fase precoce da infecção, podem esclarecer os mecanismos da resistência específica e indiretamente, da resistência do hospedeiro ao parasita.

RESUMO

RESUMO

A resistência precoce é um processo através do qual o hospedeiro, previamente sensibilizado por estoques de baixa virulência do *T. cruzi*, responde em um curto período de tempo, com diminuição da parasitemia e maior sobrevida, ao desafio com formas e doses altamente virulentas do parasita.

As investigações sobre a indução da resistência precoce demonstraram que se trata de um mecanismo de caráter específico. Isto porque, essa forma de resistência é mais eficiente quando induzida por cepas homólogas do que por cepas heterólogas, e não altera o curso de infecções provocadas por outros grupos de microorganismos.

O estudo da patogenia dos estoques envolvidos na resistência precoce, mostrou que além de apresentarem diferentes graus de virulência, essas cepas são capazes de induzir diferentes graus de alterações, nas proporções das células do sangue periférico e dos órgãos linfóides do hospedeiro vertebrado.

O estoque da cepa Y mantido em cultura de células induz baixa parasitemia e 100% de sobrevida no hospedeiro, não provocando alterações histopatológicas nos primeiros 3 dias da infecção.

O estoque de *T. cruzi* provenientes de animais SPF, mantidos isolados de outros patógenos, induz um nível de parasitemia maior que os estoques de cultura, sobrevida de 15 ± 2 dias, e poucas alterações no baço dos animais infectados.

Já o estoque de parasitas provenientes de animais mantidos em biotério convencional, induz parasitemia elevada, linfopenia e alterações na estrutura do timo e baço, induzindo a morte dos animais em aproximadamente 10 dias.

O estudo comparativo dos efeitos da administração do plasma filtrado desses três tipos de estoques, em camundongos normais, mostrou que somente o plasma de animais infectados com parasitas mantidos em biotério convencional é capaz de induzir alterações histopatológicas no hospedeiro. Esses dados sugerem a presença de outro microorganismo, agindo conjuntamente com o *T. cruzi*, provavelmente um coronavírus relacionado ao M.H.V3.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALCINA, A. & FRESNO, M. 1987. Activation by synergism between endotoxina and lymphokines of the mouse macrophage cell line J 774 against infection by *T. cruzi*. *Paras. Immunol.*, 9: 175-186.
- ARAUJO-JORGE, T.C. 1989. The Biology of *Trypanosoma cruzi*-macrophage interaction. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 84 (4): 441-462.
- ARAUJO, F. G. 1989. Development of resistance to *T. cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4+ (CD4+) T lymphocytes. *Infect. Immun.*, July: 2246-2248.
- ANDRADE, Z. A. 1991. Pathogenesis of Chagas disease. *Res. Immunol.*, 142: 126-129.
- ANDREWS, N. W.; ABRAMS, C. K.; SLATIN, S. L. & GRIFFITHS, G. 1990. A *T. cruzi*-secreted protein immunologically related to the complement component C9: evidence for membrane pore-forming activity at pH low. *Cell*, 61: 1277-1287.
- BASSO, B.; MORETTI, E. R. & VOTTERO-CIMA, E. 1991. Immune response and *T. cruzi* infection in *T. rangeli*-immunized mice. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44(4): 413-419.
- BLACK, C. M.; ISRAELSKI, D. M.; SUZUKI, Y. & REMINGTON, J. S. 1989. Effect of recombinant tumor necrosis factor on acute infection in mice with *T. gondii* or *T. cruzi*. *Immunol.*, 68: 570-574.
- BRENER, Z. 1962. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo*, 4: 389-394.
- BRENER, Z. & ANDRADE, Z. 1979. *T. cruzi* e Doença de Chagas. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan.

- BRENER, Z. 1980. Immunity to *T. cruzi*. *Ad. Parasitol.*, 18: 247-293.
- BOUHDIDI, A.; TRUYENS, C.; RIVERA, M. T.; BAZIN, H. & CARLIER, Y. 1994. *T. cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and high avid IgG1 antibodies. *Paras. Immunol.*, 16: 69-76.
- BURKE, J. D.; WEYMOUTH, R. J. & SEIBEL, H. R. 1972. Histological methods. In: *Essentials of Histology*. N. York: **Barron's Educational Series**: 5-17.
- CARDILLO, F.; MENGEL, J. O.; VOLTARELLI, J. C. & SILVA, J. S. 1993. INF γ production by NK cells during the early acute phase of experimental *T. cruzi* infection. *Anais XVIII Cong. Bras. Immunol.*: 84.
- CARVALHO, T. U. & SOUZA, W. 1986. Infectivity of amastigotes of *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 28 (4): 205-212.
- CAMARGO, I. J. B.; SAKURADA, J. K.; ZUCATO, M. R.; ARUJO, P. M. F. & RANGEL, H. A. 1989. The early phase of the immune response of CBA mice infected with *T. cruzi*. *Immunol. Letters*, 20: 213-216.
- CAMARGO, I. J. B.; ARAUJO, P. M. F.; SAKURADA, J. K.; STACH-MACHADO, D. R. & RANGEL, H. A. 1991. Early resistance induced by culture-derived trypomastigotes. *Exp. Parasitol.*, 73: 260-268.
- CHAGAS, C. 1981. Coletânea de trabalhos científicos. Brasília, Ed. Universidade de Brasília: 11-80.
- CERRONE, M. & KUHN, R. E. 1991. Macrophage regulation of immune response of spleen cells from mice infected with *T. cruzi*. *Cel. Immunol.*, 138: 423-436.
- COMPTON, S.; BARTHOLD, S. & SMITH, A. 1993. The cellular and molecular pathogenesis of coronaviruses. *Lab. An. Science*, 43 (1): 15-28.
- CORSINI, A. C. & COSTA, M. G. 1981. Immunossuppression in mice infected with *T. cruzi*. I-Evidence of polyclonal B cell activation in experimental infection mimicked by an extract prepared from circulating trypomastigotes. *Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo*, 23: 114-121.

- COURA, J. R.; LIMA, A. O. & QUADROS, M. F. B. 1992. Imunomodulação na infecção chagásica experimental e humana. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **25** (3): 11-15.
- DE MAEYER, E. & DE MAEYER-GUINARD, J. 1992. Interferon- γ . *Curr. Opinion Immunol.*, **4**: 321-326.
- DIAS, J. C. P. & JATENE, A. D. 1992. Doença de Chagas no Brasil: situação atual e perspectivas. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, **25** (3): 6-8.
- DIMOCK, K. A.; DAVIS, C. D. & KUHN, R. E. 1992. Changes in humoral responses to *T. cruzi* during the course of infection in mice held at elevated temperature. *J. Parasitol.*, **78** (4): 687-696.
- DUNN, P. L. & NORTH, R. J. 1991. Early gamma interferon production by NK cells is important in defense against murine listeriosis. *Infect. Immun.*, **59** (9): 2892-2900.
- FERREIRA, J. A.; GALVAO-CASTRO, B.; MACEDO, W. & CASTRO, C. 1983. Immunoglobulins and other serological parameters in Chagas disease: evidence for increased IgA levels in the chronic digestive form. *Clin. Exp. Immunol.*, **52**: 266-270.
- FUJIOKA, N.; FUJIWARA, K.; YAMANOUCHI, K. & HAYAMI, M. 1985. Histopathology and Hematology of acute infection with *Mouse Hepatitis Virus*, MHV 3 in mice with different susceptibility. *Japan. J. Vet. Sci.*, **47** (5): 761-768.
- HANSON, W. L. 1977. Immune response and mechanisms of resistance in *T. cruzi*: in Chagas' disease. *PAHO Scientific Publication*, **347**: 22-34.
- HOFT, D. F.; LYNCH, R. G.; KIRCHHOFF, L. V. 1991. Comparison of IL-4 and IFN γ responses in mice infected with or immunized with *T. cruzi*. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, **86** (1): 39.
- HONTEBYRIE-JOSKOWICZ, M.; MINOPRIO, P. 1991. Chagas' disease: *T. cruzi* vs the host immune system. *Res. Immunol.*, **142**: 125-181.

- JURI, M. A.; FERREIRA, A.; RAMOS, A. & HOECKER, G. 1990. Non-lytic antibodies in H2 controlled resistance to acute infection with *T. cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 23: 685-695.
- KANARIOU, M.; HUBY, R.; LADYMAN, H.; COLIC, M.; SIVOLAPENKO, G.; LAMPERT, I. & RITTER, M. 1989. Immunosuppression with cyclosporin A alters the thymic microenvironment. *Clin. Exp. Immunol.*, 78: 263-270.
- KIPNIS, T. L.; DAVID, J. R.; ALPER, C. A.; SHER, A. & DIAS DA SILVA, W. 1981. Enzymatic treatment transforms trypomastigote of *T. cruzi* into activators of the alternative complement pathway and potentiates their uptake by macrophages. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 78: 602-605.
- KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D.; PIZZIMETTI, M. 1974. Phagocytosis: a defense mechanism against infection with *T. cruzi*. *J. Immunol.*, 112: 1830-1844.
- KIERSZENBAUM, F. & SZTEIN, M. B. 1990. Mechanisms underlying immunosuppression induced by *T. cruzi*. *Parasitol. Today*, 6 (8): 261-264.
- KIERSZENBAUM, F.; MORETTI, E.; SZTEIN, M. B. 1991. *T. cruzi* induces suppression of DNA synthesis and inhibits expression of interleukin 2 receptors by stimulated human B lymphocytes. *Immunol.*, 74 (2): 317-322.
- KLOETZEL, J. K.; LAFAILLE, J. J. 1983. Strain specific protective immunity against *T. cruzi*. *J. Parasitol.*, 69 (2): 267-270.
- KRAFT, V. & MEYER, B. 1990. Seromonitoring in small laboratory animal colonies. A five year survey: 1984-1988. *Z. Versuchstierkd.*, 33: 29-35.
- KRETTLI, A. U. 1979. Aspectos imunológicos da Doença de Chagas. *Ciência e Cultura*, 31 (Supl): 119-132.
- KRETTLI, A. U.; WEISZ-CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R. S. 1979. Membrane-bound antibodies of bloodstream *T. cruzi* in mice: strain differences in susceptibility to complement-mediated lysis. *Clin. Exp. Immunol.*, 37: 416-423.

- KRETTLI, A. U. 1982. Antibodies to *T. cruzi* in experimental and human infections. *Afric. J. Clin. Exp. Immunol.*, 3: 327-345.
- KRETTLI, A. U. 1983. Resposta imune humoral na Doença de Chagas. *Interciência*, 8 (6): 374-383.
- LAMONTAGNE, L.; DESCOTEAUX, J. & JOLICOEUR, P. 1989. *Mouse hepatitis virus 3* replication in T and B lymphocytes correlate with viral pathogenicity. *J. Immunol.*, 142 (12): 4458-4465.
- LAMONTAGNE, L. & JOLICOEUR, P. 1991. *Mouse hepatitis virus 3*- thymic cell interactions correlating with viral pathogenicity. *J. Immunol.*, 146 (9): 3152-3159.
- LELCHUK, R.; DALMASSO, A. P.; INGLESINE, C. L.; ALVAREZ, M. & CERISOLA, J. A. 1970. Immunoglobulin studies in serum of patients with American trypanosomiasis (Chagas' Disease). *Clin. Exp. Immunol.*, 6: 547-555.
- LEY, V.; ANDREWS, N. W.; ROBBINS, E. S. & NUSSENZWEIG, V. 1988. Amastigotes of *T. cruzi* sustain an infective cycle in mamalian cells. *J. Exp. Med.*, 168: 649-659.
- LIEW, F. Y.; MILLOT, S.; PARKINSON, C.; PALMER, R. M. J. & MONCADA, S. 1990. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. *J. Immunol.* 144: 4794-4797.
- LIEW, F. Y. & COX, F. E. G. 1991. Nonspecific defense mechanism: the role of nitric oxide. *Immunoparasitol. Today*: A18-24.
- MC LEOD, R.; ESTES, R. G.; MACK, D. G. & COHEN, H. 1984. Immune response of mice to ingested *Toxoplasma gondii*: A model of *Toxoplasma* infection acquired by ingestion. *J. Infect. Dis.*, 149 (2): 234-244.
- MENEZES, H. 1969. Active immunization of dogs with a non-virulent strain of *T. cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop. S. P.*, 11: 258-263.
- MENEZES, H. 1975. The uninfectivity of the PF cultivated strain of *T. cruzi* to mice. An evolution through a one year period by blood cultures and histopathology. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.*, 12: 1.

- MILDER, R. & KLOETZEL, J. 1980. The development of *T. cruzi* in macrophage in vitro. Interaction with lysosomes and host cell fate. *Parasitol.*, **80**: 139-145.
- MIRANDA-SANTOS, I. K. F. & CAMPOS NETO, A. 1981. Receptor for immunoglobulin Fc on pathogenic but not on nonpathogenic protozoa of the trypanosomatidae. *J. Exp. Med.*, **154**: 1732-1742.
- MINOPRIO, P. M.; EISEN, H.; FORNI, L.; IMPERIO-LIMA, M. R.; JOSKOWICZ, M. S. & COUTINHO, A. 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *T. cruzi* infection. Quantitation of both T and B cells responses. *Scand. J. Immunol.*, **24**: 661-668.
- MINOPRIO, P. M., 1991. Chagas disease, CD5 B cell dependent Th2 pathology ?. *Res. Immunol.*, **142**: 137-140.
- MILON, G. & LOUIS, J. 1993. CD8+ T cells and immunity to intracellular pathogens. *Parasitol. Today*, **9** (6): 196-197.
- MITCHELL, G. F. 1991. Co-evolution of parasites and adaptative immune responses. *Immunol. Today*, **12**: 1-5.
- MULLER, L. A.; ANASCO, L. & GONZALES-CAPPA, S. 1986. *T. cruzi*: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. *Exp. Parasitol.*, **61**: 284-293.
- MUÑOZ-FERNANDES, M. A.; FERNANDEZ, M. A. & FRESNO, M. 1992. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *T. cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. *Eur. J. Immunol.*, **22**: 301-307.
- NICKELL, S. P.; STRYKER, G. A. & AREVALO, C. 1993. Isolation from *T. cruzi*-infected mice of CD8+, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite infected target cells. *J. Immunol.* **150** (4): 1446-1457.
- NOGUEIRA, N.; GORDON, S.; COHN, Z. 1977. *T. cruzi*: modification of macrophage function during infection. *J. Exp. Med.*, **146**: 157-171.
- NOGUEIRA, N. & COHN, Z. 1978. *T. cruzi*: in vitro induction of macrophage microbicidal activity. *J. Exp. Med.*, **147**: 288-300.

- PEREIRA DA SILVA, L. H. & NUSSENZWEIG, V. 1953. Sobre uma cepa de *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin.e Biol.*, 20: 191.
- PEREIRA, M. E. S. & KRETTLI, A. U. 1990. The effect of reinoculation with trypomastigotes on the level of protective antibodies in mice chronically infected with *T. cruzi*. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 23 (3-4): 283-292.
- PETRAY, P.; ROTTENBERG, M. E.; GRINSTEIN, S. & ORN, A. 1994. Release of nitric oxide during the experimental infection with *T. cruzi*. *Paras. Immunol.*, 16: 193-199.
- PIAZZA, M.; PICCININO, F. & MATANO, F. 1965. Hematological changes in viral (MHV-3) murine hepatitis. *Nature*, 205: 1034-1035.
- PLATA, F.; GARCIA-PONS, F. & WIETZERBIN, J. 1987. Immune resistance to *T. cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma "in vivo". *Ann. Inst. Pasteur/ Immunol.*, 138: 397-415.
- PRICE, P.; OLVER, S.; GIBBONS, A.; TEO, H. & SHELLAM, G. 1993. Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. *Immunol. and cell biol.*, 71: 155-165.
- RANGEL, H.; VERINAUD, L.; CAMARGO, I.; GILIOLI, R. & SAKURADA, J. 1994. *T. cruzi*: murine virus contaminant of the experimental infection. *Exp. Parasitol.*, 78: 429-431.
- REED, S. G. 1988. In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *T. cruzi* infection. *J. Immunol.*, 140: 4342-4347.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R.; MARQUES, J. O.; VON GAL FURTADO, C. C.; RAMOS DE OLIVEIRA, J. C.; MARTINS, A. R. & KOBERLE, F. 1979. Antibodies against neurons in chronic Chagas' disease. *Tropenmed. Parasit.*, 30: 19-23.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R.; PIRMEZ, C. & SAVINO, W. 1991. Role of autoreactive immunological mechanisms in chagasic carditis. *Res. Immunol.*, 142: 134-137.

- RITTER, D. M. & ROWLAND, E. C. 1984. Corpus christi strain-induced protection to *T. cruzi* infection in C3H(He) mice: effective dose, time, route and number of vaccinations. *J. Parasitol.*, **70** (5): 755-759.
- ROMAGNANI, S. 1992. Induction of Th1 and Th2 responses: a key role for the "natural" immune response ? *Immunol. Today*, **13**: 379-380.
- RUIZ, A. M.; ESTEVA, M.; RIARTE, A.; SUBIAS, E. & SEGURA, E. L. 1986. Immunoprotection of mice against *T. cruzi* with a lyophilized flagellar fraction of the parasite plus adjuvant. *Immunol. Letters*, **12**: 1-4.
- RUSSO, M. & STAROBINAS, N. 1991. Macrophage activation and resistance to *T. cruzi* infection. *Res. Immunol.*, **142**: 144-146.
- SAKURADA, J. K.; MAURY, A.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; ARAUJO, P. M. F.; CAMARGO, I. J. B. & RANGEL, H. A. 1992. Anti- *T. cruzi* proteinase antibodies and immunoprotection in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.*, **143**: 157-164.
- SATO, M. N.; YAMASHIRO-KANASHIRO, E. H.; TANJI, M. M.; KANERO, R.; HIGUCHI, M. L. & DUARTE, A. J. S. 1992. CD8+ and natural cytotoxic activity among spleen, blood and heart lymphocytes during the acute phase of *T. cruzi* infection in rats. *Infect. Immun.*, **60** (3): 1024-1030.
- SANTOS, R. R. 1973. Contribuição ao estudo da imunidade na fase aguda da doença de Chagas experimental. *Rev. Pat. Trop.*, **2** (4): 433-463.
- SAVINO, W.; LEITE DE MORAES, M. C.; HONTEBYRIE-JOSKOWICZ, M. & DARDENNE, M. 1989. Studies on the thymus in Chagas' disease. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *T. cruzi*. *Eur. J. Immunol.*, **19**: 1727-1733.
- SCHMUNIS, G. A.; SZARFMAN, A.; LANGEMBACH, T. & DE SOUZA, W. 1978. Induction of capping in blood-stage trypomastigotes of *T. cruzi* by human anti-*T. cruzi* antibodies. *Infect. Immun.*, **20**: 567-569.
- SCHUURMAN, H.; LOVEREN, H.; DIJK, J.; LOEBER, G. & VOS, J. 1990. Cyclosporin and the rat thymus. An immunohistochemical study. *Thymus*, **16**: 235-254.

- SEGURA, E. L. ; BUA, J.; CAMPANINI, A. R.; SUBIAS, E.; ESTEVA, M.; MORENO, M. & RUIZ, A. M. 1986. Monoclonal antibodies against the flagellar fraction of epimastigotes of *T. cruzi*: C-mediated lytic activity against trypomastigotes and passive immunoprotection in mice. *Immunol. Letters*, 13: 165—171.
- SILVA, J. S.; MORRISSEY, P. J.; GRABSTEIN, K. H.; MOHLER, K. M.; ANDERSON, D. & REED, S. G. 1992. Interleukin 10 and Interferon γ regulation of experimental *T. cruzi* infection. *J. Exp. Med.*, 175: 169-174.
- SZARFMAN, A.; TERRANOVA, V. P. ; RENNARD, S. L.; FOIDART, J. M.; LIMA, M. F.; SCHEINMAN, J. I. & MARTIN, G. R. 1982. Antibodies to laminin in Chagas' disease. *J. Exp. Med.*, 155: 1161-1171.
- SZTEIN, M. B. & KIERSZENBAUM, F. 1993. Mechanisms of development of immunosuppression during trypanosoma infections. *Parasitol. Today*, 9 (11): 424-428.
- TARLETON, R. L. 1988. *T. cruzi* induced suppression of IL-2 production. Evidence for the presence of IL-2 producing cells. *J. Immunol.*, 140 (8): 2763-2768.
- TARLETON, R. L. 1991. Regulation of immunity in *T. cruzi* infection. *Exp. Parasitol.*, 73: 106-109.
- TARLETON, R. L. 1991. The role of T-cell subpopulations in experimental Chagas' disease. *Res. Immunol.*, 142: 130-133.
- TARLETON, R. L.; KOLLER, B. H.; LATOUR, A. & POSTAN, M. 1992. Susceptibility of β_2 -microglobulin deficient mice to *T. cruzi* infection. *Nature*, 356 (26): 338-340.
- TEIXEIRA, A. R. L. The Stercorarian trypanosomes. In: *Immune responses in parasitic infections*. Flórida: CRC Press. 1987. Vol.III: p. 26-78.
- TITUS, R. G.; SHERRY, B. & CERAMI, A. 1991. The involvement of TNF, IL-1 and IL-6 in the response to protozoan parasites. *Parasitol. Today*, 7: 13-16.

- TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M. T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A. & CARLIER, Y. 1991. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *T. cruzi* infection in mice. *J. Immunol.*, **146**: 3626-3632.
- TRISCHMANN, T. M.; TANIWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B. 1978. *T. cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. *Exp. Parasitol.*, **45**: 160-168.
- TRISCHMANN, T. M. 1983. Non antibody mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. *J. Immunol.*, **130**: 1953-1957.
- UMEKITA, L. F.; TAKEHARA, H. A. & MOTA, I. 1988. Role of the antibody Fc in the immune clearance of *T. cruzi*. *Immunol. Letters*, **17**: 85-89.
- VANDEKERCKHOVE, F.; DARJI, A.; RIVERA, M. T.; CARLIER, Y.; VRAY, B.; BILLIAU, A. & BAETSELIER, P. 1994. Modulation of T-cell responsiveness during *T. cruzi* infection: analysis in different lymphoid compartments. *Paras. Immunol.*, **16**: 77-85.
- VESPA, G. N. R.; CUNHA, F. O. & SILVA, J. S. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*- induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. *Infect. Immun.*, **62** (11): 5177-5182.