

MARCOS GARCIA COSTA

"IMUNOSSUPRESSÃO NA INFECÇÃO PELO *Trypanosoma cruzi* (CHAGAS, 1909): I - EFEITOS DOS EXTRATOS DE EPIMASTIGOTAS E TRIPO-
MASTIGOTAS SOBRE A RESPOSTA IMUNE EM CAMUNDONGOS".

Tese apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Doutor em Ciências na área de Imunologia.

Orientador:

DR. ANTONIO CARLOS CORSINI

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS - UNICAMP
CAMPINAS - SÃO PAULO

1 9 8 2

UNICAMP
BIBLIOTECA CENTRAL

A meu pai (in Memoriam) e minha mãe.

À Vera e nossos filhos

Marcos José

Karime Maria

Kleber Vinícius

"Je crois invinciblement que la Science
et la Paix triompheront de l'ignorance
et de la guerre, que les peuples s'en-
tendront, non pour détruire, mais pour
edifier."

LOUIS PASTEUR

AGRADEDIMENTOS

Ao orientador deste trabalho, Dr. Antonio Carlos Corsini, que num período de indefinição em minha carreira, acolheu-me em seu laboratório, dando todo o estímulo e apoio na execução deste trabalho. Além de sua orientação científica, nele encontrei a mais pura amizade, compreensão e o exemplo de dignidade humana e honestidade científica.

Aos Professores Doutores Luiz Sebastião Prigenzi, Luiz Candido de Souza Dias, Judith Kardos Kloetzel, Humberto de Araújo Rangel e Antoniana Ursine Krettli pela discussão crítica e sugestões apresentadas.

Ao Dr. Antonio Fernando Pestana de Castro e Dra. Marlene Braide Serafim pelo apoio e estímulo.

Aos colegas do laboratório pela amizade e compreensão.

À Sra. Ismália Menegon Doné, Srta. Dirce Lima Gabriel e Sr. Manoel Bernardes da Silva, técnicos do Departamento de Microbiologia e Imunologia, pelos auxílios prestados na execução deste trabalho.

O CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA
RECEBEU AUXÍLIO DAS SEGUINTE INSTITUIÇÕES:

- UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS.
- CONSELHO NACIONAL DE DESENVOLVIMENTO CIENTÍFICO E
TECNOLÓGICO - CNPq.
- FUNDAÇÃO DE AMPARO À PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAU-
LO - FAPESP.
- COORDENAÇÃO DE APERFEIÇOAMENTO DO PESSOAL DE ENSINO
SUPERIOR - CAPES.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (DIVISÃO IMUNOLOGIA).
- BIBLIOTECA REGIONAL DE MEDICINA - BIREME.

ÍNDICE

	pág.
INTRODUÇÃO	01
MATERIAL E MÉTODOS	09
1. Animais Utilizados	09
2. <i>Trypanosoma cruzi</i>	09
3. Manutenção do <i>Trypanosoma cruzi</i> em camundongo ...	09
4. Infecção por <i>Trypanosoma cruzi</i>	10
5. Parasitemia	10
6. Cultivo do <i>Trypanosoma cruzi</i> em meio líquido	11
7. Obtenção do extrato de epimastigotas (FAd)	11
8. Dosagem de proteínas	12
9. Separação dos parasitos do sangue infectado	12
10. Obtenção do extrato bruto de tripomastigotas (EBTri).....	13
11. Imunização com hemácias de carneiro (HC)	13
12. Determinação de células formadoras de placas (CFP)	14
13. Inibição das células formadoras de placas contra hemácias de carneiro fluoresceinadas	14
14. Viabilidade celular	15
15. Sensibilização ao dinitrofluorobenzeno (DNFB) ...	15
16. Determinação da hipersensibilidade retardada ao dinitrofluorobenzeno (DNFB)	16
17. Determinação das unidades formadoras de colonia no baço (UFC)	16
18. Exame histológico	17
19. Análise estatística	17

	pág.
RESULTADOS	18
I - Resposta Imune em Camundongos Infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	18
1. Parasitemia	18
2. Número de células esplênicas durante a infec- ção	20
3. Supressão da resposta humoral em camundongos infectados	22
4. Aumento do número de células formadoras de placas (CFP) contra hemácias de carneiro em camundongos não imunizados e infectados com <i>Trypanosoma cruzi</i>	24
5. Resposta imune mediada por células em camun- dongos infectados com a cepa Y de <i>Trypanosoma</i> <i>cruzi</i>	24
II - Efeito do Extrato de Epimastigotas (FAd) na Res- posta Imune	28
1. Depressão da resposta imune primária a hemá- cias de carneiro pelo FAd	28
2. Efeito do intervalo de tempo entre a inocula- ção do FAd e do antígeno na inibição da res- posta humoral	30
3. Depressão da resposta imune secundária a hemá- cias de carneiro pelo FAd	33
4. Supressão da resposta imune mediada por célu- las pelo FAd	35

	pág.
5. Unidade formadora de colônias (UFC) no baço de camundongos inoculados com FAd	39
6. Atividade mitogênica do FAd	42
III - Efeito do Extrato de Tripomastigotas (EBTri) na Resposta Imune	42
1. Atividade mitogênica do EBTri	42
2. Unidades Formadoras de Colônias (UFC) em baço de camundongos inoculados com EBTri	47
3. Supressão da resposta imune humoral primária a hemácias de carneiro pelo EBTri	51
4. Supressão da resposta imune secundária a hemácias de carneiro	54
5. Efeito do EBTri sobre a resposta imune mediada por células	56
DISCUSSÃO	58
RESUMO E CONCLUSÕES	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

ABREVIACÕES

01. CFP - Células Formadoras de Placas
02. Con A - Concanavalina A
03. CRA - Células Reativas ao Antígeno
04. DNCB - Dinitroclorobenzeno
05. DNFB - Dinitrofluorobenzeno
06. DNP-Ficol - Dinitrofenil-Ficol
07. EA - Hemácias sensibilizadas com anticorpos
08. EBTri - Extrato bruto de tripomastigotas
09. EPM - Erro Padrão da Média
10. FAd - Extrato de epimastigotas
11. Fl-HC - Hemácias de carneiro fluoresceinadas
12. GGH - Gamaglobulina humana
13. HC - Hemácias de Carneiro
14. IgG - Imunoglobulina G
15. IgM - Imunoglobulina M
16. i.p. - Intraperitoneal
17. i.v. - Intravenoso
18. LPS - Lipopolissacride
19. MME - Meio Mínimo Essencial de Eagle
20. OVA - Albumina de ovo
21. PHA - Fitohemaglutinina
22. PPD - Derivado Proteico Purificado (*Mycobacterium tu-berculosis*)
23. SFB - Soro Fetal Bovino
24. TNP - Trinitrofenil
25. UFC - Unidades Formadoras de Colonias

INTRODUÇÃO

A tripanosomíase americana causada pela infecção com o *Trypanosoma (Schizotrypanum) cruzi* (Chagas, 1909), constitui-se num dos mais graves problemas de saúde pública das Américas, devido a sua grande distribuição geográfica, alta morbidade (especialmente na forma cardíaca), alta mortalidade em regiões endêmicas e grandes dificuldades de se estabelecer medidas de controle da doença (WHO, 1977), acarretando desta forma graves problemas de ordem econômico-social nas regiões mais atingidas (Dias e Dias, 1978).

Segundo dados da WHO (1977) cerca de 35 milhões de pessoas, na América do Sul, estão expostas a doença e 12 milhões de pessoas estão infectadas pelo *T. cruzi*. No Brasil, temos cerca de 6 milhões de indivíduos acometidos pela doença de Chagas (Macedo, 1980), a maioria abaixo de 20 anos de idade (Camargo, com. pess.).

As diferentes manifestações da doença são descritas

em 4 fases distintas: a) *período de incubação*, com duração de 1 a 3 semanas, no qual ocorre proliferação intracelular de amastigotas e entrada de tripomastigotas na circulação sanguínea; b) *fase aguda* caracterizada pela facilidade com que se evidencia o parasito no sangue periférico, havendo maior prevalência nos indivíduos jovens, principalmente nos primeiros anos de vida (Prata, 1968; WHO, 1979) com duração aproximadamente de 2 meses, ocorrendo em seguida acentuada diminuição da parasitemia; c) *fase indeterminada* caracterizada pela ausência de manifestações clínicas e baixa parasitemia, apresentando contudo anticorpos anti-*T. cruzi* detectados por testes sorológicos. Constitui-se na fase de maior prevalência, visto que acomete 50% dos indivíduos infectados (Macedo, 1980); d) *fase crônica* de manifestação tardia, ocorre depois de 10 ou mais anos após a infecção inicial e caracteriza-se pela miocardite progressiva e/ou dilatação irreversível do esôfago, colon e outras vísceras ocas (Köberle, 1968; WHO, 1974) e pela dificuldade de detecção de parasitos circulantes.

Embora sejam conhecidas as manifestações clínicas da doença, pouco é o conhecimento acerca dos constituintes antigênicos do parasito em suas diferentes formas. Este fato tem levado a WHO (1965, 1974, 1977) a sugerir a necessidade do estudo desses constituintes e sua ação biológica, visto que antígenos do *T. cruzi* poderiam exercer importante papel na patogenia da doença.

Na relação parasito-hospedeiro que se estabelece na tripanosomíase várias são as alterações causadas pelo parasit

to no sistema imune do hospedeiro. Dentre essas alterações a literatura tem mostrado que durante a infecção pelos tripanosomas ocorre um aumento de células produtoras de imunoglobulinas no baço dos animais experimentalmente infectados, tanto na tripanosomíase africana (Hudson *et al.*, 1976; Corsini *et al.*, 1977; Kobayakawa *et al.*, 1979) como na tripanosomíase americana (Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980; Corsini e Costa, 1981a). Sugerem estes autores que esse aumento da blastogênese celular deve-se provavelmente à capacidade do tripanosoma em induzir ativação policlonal inespecífica de linfócitos B.

O papel exercido por essa ativação é desconhecido. Alguns autores (Kobayakawa *et al.*, 1979; Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980) sugerem que a ativação policlonal de linfócitos pode induzir a formação de auto anticorpos verificada na tripanosomíase experimental, enquanto que outros autores (Hudson *et al.*, 1976; Corsini *et al.*, 1977) sugerem que essa ativação esteja relacionada com a imunossupressão, outro importante distúrbio causado pelos tripanosomas (Hudson *et al.*, 1976).

Assim, tem-se verificado na infecção pelo *T. cruzi* a ocorrência de supressão da resposta imune humoral a antígenos Timo-dependentes como, hemácias de carneiro (HC), gama-globulina humana (GGH) e albumina de ovo (OVA) (Clinton *et al.*, 1975; Ramos *et al.*, 1978; Pereira Mendes *et al.*, 1979; Corsini *et al.*, 1980a) e Timo-independentes como LPS e DNP-Ficoll (Ramos *et al.*, 1979; Kierszenbaum *et al.*, 1980).

Nestes experimentos, usualmente foram utilizados grandes inóculos (10^4 a 10^5 parasitos) para a infecção dos camundongos o que resultou normalmente numa infecção aguda, severa e habitualmente fatal. Este fato por si só poderia ser responsabilizado pela supressão da resposta humoral em razão das alterações ocorridas nos órgãos linfóides (Lima Pereira, 1978).

No entanto, apenas 100 parasitos da cepa Y foram suficientes para a supressão da resposta humoral a HC durante ambas as fases, aguda e crônica, da infecção em camundongos (CBA x C57Bl/10) F_1 (Corsini *et al.*, 1980a).

Este fato sugere que além da desorganização estrutural dos órgãos linfóides (Lima Pereira, 1978), conhecida de longa data (Dias, 1934; Taliaferro e Pizzi, 1955) e revista por Goble (1970), outros fatores contribuíram também para a imunossupressão resultante da infecção pelo *T. cruzi* (Mitchell, 1979, 1980).

A supressão da resposta imune mediada por células, particularmente a hipersensibilidade retardada tem sido também verificada nas infecções experimentais pelo *T. cruzi*. Assim sendo, Reed *et al.* (1977) descreveram a supressão da resposta imune a oxazolona e adjuvante completo de Freund em camundongos Swiss infectados pela cepa Tulahuen. Lima Pereira (1978) também detectou supressão da resposta imune mediada por células a HC em camundongos Swiss infectados pela cepa Y. Além disto, Rowland e Kuhn (1978) descreveram a supressão da hipersensibilidade do tipo retardado ao PPD e

a um extrato de epimastigotas na infecção aguda pelo *T. cruzi*.

No entanto, tanto camundongos (CBA x C57Bl/10) F_1 (resistentes), quanto os susceptíveis C₃He/J (Corsini *et al.*, 1980b) à infecção pela cepa Y apresentaram hipersensibilidade retardada normais ao dinitrofluorobenzeno (DNFB) quando infectados com 100 formas diferentemente daqueles experimentos anteriores, onde novamente grandes inóculos haviam sido empregados.

Portanto, desde que pequenos inóculos (100 parasitos) sejam empregados, os camundongos (CBA x C57Bl/10) F_1 apresentam supressão da resposta humoral a HC e hipersensibilidade retardada ao DNFB normal (Corsini *et al.*, 1980a).

Estes fatos são análogos àqueles obtidos na infecção experimental dos camundongos pelos tripanosomas africanos, como o *T. brucei*, isto é, supressão da resposta humoral a antígenos Timo-dependentes e Timo-independentes (Murray *et al.*, 1974a, 1974b; Hudson *et al.*, 1976; Corsini *et al.*, 1977; Jayawardena e Waksman, 1977; Eardley e Jayawardena, 1977; Mansfield e Bagasra, 1978; Jayawardena *et al.*, 1978; Askonas *et al.*, 1979) e hipersensibilidade retardada a oxazolona e ao DNFB normais (Murray *et al.*, 1974b; Askonas *et al.*, 1979).

A importância destes fatos está ressaltada pelas semelhanças entre este modelo experimental utilizando camundongos infectados com baixos inóculos da cepa Y e aqueles

da infecção humana natural. Assim sendo, pacientes chagásicos crônicos apresentam supressão da resposta humoral ao antígeno H de *Salmonella typhi* e hipersensibilidade retardada normal ao PPD, antígeno de *Candida*, Estreptoquinase, Estreptonordase e antígeno do Vírus da Varíola e ao DNCB (Corsini *et al.*, 1981).

As causas destes fatos permanecem ainda obscuras. Possivelmente, três fatos poderiam explicar a hipersensibilidade retardada normal nos camundongos infectados: a) os linfócitos T mediadores da hipersensibilidade retardada são mais resistentes aos efeitos supressores da infecção pelos tripanosomas (Askonas *et al.*, 1979); b) os macrófagos como células também participantes da fase efetora da hipersensibilidade retardada teriam suas funções preservadas (Clayton, 1979); c) uma maior infiltração de macrófagos no local da hipersensibilidade retardada supriria a possível supressão dos linfócitos T efetores (Corsini *et al.*, 1980d).

Da mesma maneira são desconhecidas as causas de imunossupressão humoral nestes modelos experimentais. No entanto, é possível que diferentes mecanismos ao invés de apenas um único, estejam envolvidos na expressão final da supressão (Mitchell, 1980). Uma relação dos possíveis mecanismos imunossupressores (Mitchell, 1979, 1980), alguns deles com verificação experimental foi sugerida mais recentemente por Corsini (in press). Segundo este autor é possível que no fenômeno da imunossupressão verificado nas tripanosomíases, atuem os seguintes fatores: a) desorganização estrutural dos órgãos linfóides (Murray *et al.*, 1974a, 1974b;

Clayton *et al.*, 1980; Lima Pereira, 1978; Corsini *et al.*, em preparação); b) redução da dose imunogênica efetiva por processamento alterado do antígeno pelo sistema mononuclear fagocitário (Murray *et al.*, 1974a; Ramos *et al.*, 1978); c) exaustão clonal (Corsini *et al.*, 1977; Askonas *et al.*, 1979; Corsini e Costa, 1981b); d) bloqueio da proliferação celular (Corsini *et al.*, 1980c); e) estimulação da função T supressora (Jayawardena e Waksman, 1977; Corsini *et al.*, 1977; Jayawardena *et al.*, 1978; Pearson *et al.*, 1979; Ramos *et al.*, 1979); f) estimulação de macrófagos com capacidade supressora (Corsini *et al.*, 1977; Eardley e Jayawardena, 1977); g) desequilíbrio entre populações de células T supressoras e células T auxiliares (Jayawardena *et al.*, 1978; Cunningham *et al.*, 1980); h) bloqueio da resposta imune através de imunocomplexos (Murray, 1974; Lambert e Houba, 1974; Nagle *et al.*, 1974; Wilson, 1974); i) ativação policlonal, com possível desencadeamento de doença auto-imune (Kobayakawa *et al.*, 1979; Ortiz-Ortiz *et al.*, 1980; Terry *et al.*, 1980); j) desequilíbrio de populações de células T, B e "Null" (Mayor-Withey *et al.*, 1978; Roelands *et al.*, 1979; Cunningham *et al.*, 1980). Sugere ainda Corsini (in press) outros possíveis mecanismos supressores podem ser mediados através de anticorpos anti-idiotípicos, rápido catabolismo de anticorpos e mediadores, bloqueio dos linfócitos ao nível dos receptores, ação inibitória ou citotóxica mediada por antígenos parasitários (Mitchell, 1980), assim como, alterações no sistema do complemento, das quininas e da coagulação (Fauve, 1980).

Visto que extratos preparados com as formas tripomas

trigotas de *T. brucei* mimetizam os efeitos da infecção experimental dos camundongos (Clayton *et al.*, 1979a; Selkirk *et al.*, 1980) propusemo-nos a estudar: a) o decurso da infecção pela cepa Y nos camundongos BALB/c empregando apenas 100 formas dos parasitos e seus efeitos sobre a resposta humoral a HC e ao DNFB; b) os efeitos dos extratos preparados a partir das formas tripomastigotas e epimastigotas do *T. cruzi* sobre estas mesmas respostas, procurando estabelecer possíveis mecanismos imunossupressores na infecção experimental pelo *T. cruzi*.

MATERIAL E MÉTODOS

1. Animais Utilizados

Foram utilizados camundongos BALB/c, CBA/J e Swiss-55, machos e fêmeas, com 6 - 8 semanas de idade, criados e mantidos em condições adequadas no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas.

2. *Trypanosoma cruzi*

A amostra Y de *Trypanosoma cruzi* (Pereira da Silva e Nussensweig, 1953) utilizada no presente trabalho, nos foi cedida pelo Dr. Zigman Brener (Belo Horizonte).

3. Manutenção do *Trypanosoma cruzi* em camundongo

A amostra de *Trypanosoma cruzi* foi mantida em camundongos por passagens semanais de 10^5 formas em camun-

dongos Swiss-55. Os animais foram sangrados através do plexo braquial no dia do pico parasitêmico (7 dias após a infecção) e o sangue coletado em solução estéril de citrato de sódio 3,8%, mantendo-se a mistura em banho de gelo. Após a contagem dos parasitos circulantes segundo o método de Brener (1968) e diluições em Meio Mínimo Essencial de Eagle (MME), novo lote de animais foi inoculado com 10^5 formas por via intraperitoneal (i.p.).

4. Infecção por *Trypanosoma cruzi*

Camundongos BALB/c foram infectados por via i.p. com 100 formas obtidas no pico parasitêmico de camundongos Swiss-55 infectados com 10^5 parasitos. Após a sangria dos animais através do plexo braquial o sangue foi coletado em MME contendo 1% de Sôro Fetal Bovino (SFB) com 10 UI/ml de heparina e a mistura mantida em banho de gelo. Os parasitos foram contados em câmara de Neubauer e as diluições finais foram realizadas com MME sem SFB.

5. Parasitemia

A contagem do número de parasitos no sangue periférico foi feita segundo o método de Brener (1968). Os camundongos foram sangrados através de pequeno corte da extremidade da cauda e após desprezar-se a primeira gota, o sangue foi coletado em pipeta de hemoglobina calibrada em nosso laboratório para coletar 5 mm^3 . O sangue coletado foi colocado em lâmina de microscópio e coberto por lamínula

22 X 22 mm, de tal maneira a se obter o sangue homogeneamente distribuído.

A preparação foi examinada em microscópio binocular com lente ocular 12,5 X e lente objetiva 40 X contando-se os parasitos em 100 diferentes campos microscópicos. Os camundongos foram marcados na pata trazeira de maneira que a parasitemia pudesse ser seguida diariamente em cada um dos animais.

6. Cultivo do *Trypanosoma cruzi* em meio líquido

O meio de Yaeger (LIT) preparado de acordo com as instruções de Fernandes e Castellani (1966), foi utilizado para o cultivo de *Trypanosoma cruzi*. Porções de 5 ml de inóculo foram semeados em 20 ml de meio de cultura e mantidos a 28°C durante 7 dias, obtendo-se nestas condições 95% dos parasitos na forma epimastigota.

7. Obtenção do extrato de epimastigotas (FAd)

Os parasitos contidos em 100 ml de cultura (aproximadamente 26×10^8 parasitos) foram lavados com solução gelada de NaCl 0,15M três vezes, a 1400 g, durante 15 minutos a 4°C e o sedimento ressuspense em 10 ml de água destilada. Esta solução foi imediatamente congelada e logo após liofilizada.

Porções de 250 mg do liofilizado foram sucessivamente lavadas a 3020 g, durante 15 minutos a 4°C com: aceto

na (2 vezes), mistura éter-acetona (2 vezes) e éter (2 vezes), previamente destilados e livres de peróxidos. O sedimento obtido foi secado com jato de ar e mantido a 4°C em vácuo até o momento do uso.

O material delipidado foi tratado com 25 ml de solução salina fisiológica a 4°C. A mistura foi mantida em banho de gelo durante 15 minutos e centrifugada a 12100 g durante 30 minutos. O sedimento obtido foi ressuspensão em solução tampão fosfato, 0,02M- pH 7,2 e a mistura incubada a 37°C durante 1 hora e então centrifugada a 12100 g por 30 minutos. O sobrenadante (FAd) após ser distribuído em volumes de 1 ml foi guardado a 20°C até o momento do uso (Tama-shiro, 1980).

8. Dosagem de proteínas

As proteínas totais dos extratos foram dosadas utilizando-se a técnica do biureto segundo Weichselbaun (1946).

9. Separação dos parasitos do sangue infectado

Cinco ml de sangue colhidos de camundongos Swiss-55 infectados com 10^5 parasitos, conforme descrito anteriormente, foram centrifugados a 121 g, em tubo plástico de fundo cônico, de 50 ml da marca Falcon (2070 tube- Falcon, Oxnard. USA), a temperatura ambiente, durante 10 minutos, e em seguida deixados em repouso, durante 1 hora na mesma tempera-

tura.

O plasma foi cuidadosamente removido e o sedimento ressuspense no volume inicial com MME contendo 1% de SFB. O procedimento era repetido e o sobrenadante misturado ao plasma anteriormente obtido. A mistura foi centrifugada a 2070 g durante 10 minutos e o sobrenadante desprezado. O sedimento contendo os parasitos foi lavado 3 vezes com MME sem SFB. A suspensão contendo o número de parasitos desejado foi guardada a -70°C .

10. Obtenção do extrato bruto de tripomastigotas (EBTri)

O extrato bruto de tripomastigotas (EBTri) foi preparado por congelamento e descongelamento (3 X) da suspensão de tripomastigotas contendo diferentes quantidades de parasitos em MME. A preparação foi então centrifugada a 10000 g durante 10 minutos a 4°C . O sedimento foi descartado e o sobrenadante chamado de Extrato Bruto de Tripomastigotas (EBTri) conservado a -70°C .

11. Imunização com hemácias de carneiro (HC)

As hemácias de carneiro foram obtidas por punção da veia jugular e coletadas em condições estéreis sobre o mesmo volume de solução de Alsever. As hemácias foram guardadas em refrigerador a 4°C , não mais de 15 dias.

No momento do uso, as hemácias foram lavadas 3

vezes em tampão fosfato pH 7,2 e 4×10^8 ou 2×10^8 células foram inoculadas na veia da cauda (i.v.) dos animais experimentais, num volume de 0,2 ml. As doses de reforço foram dadas 26 dias após as doses primárias com o mesmo número de hemácias usadas na imunização primária.

12. Determinação de células formadoras de placas (CFP)

As células formadoras de placas (CFP) foram determinadas utilizando-se a técnica de Jerne (1974) segundo descrição de Dresser (1978) no 4º dia após a imunização com hemácias de carneiro, tanto para a resposta primária como para a resposta secundária. Experimentos preliminares mostraram ser no 4º dia o pico da resposta.

Os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os baços recolhidos em MME contendo 1% de SFB. A suspensão celular foi obtida com macerador, sendo as células lavadas com o mesmo meio 3 vezes e após a última lavagem ressuspensas em 1 ml do meio.

Para determinação das placas indiretas (IgG) usou-se soro de coelho anti-IgG de camundongo.

13. Inibição das células formadoras de placas contra hemácias de carneiro fluoresceinadas

A fluoresceína foi ligada a hemácias de carneiro conforme instruções descritas por Calderon *et al.* (1975).

A solução de isotiocianato de fluoresceína, 0,5 mg/ml (Sigma-Chemical Company), diluída em tampão carbonato- bicarbonato 0,125 M - pH 9,2, foi preparada no momento de uso, sendo em seguida filtrada em papel de filtro Watman nº 3.

Sobre a suspensão de hemácias de carneiro, preparada em tampão carbonato-bicarbonato, foi adicionado gota a gota, sob agitação, igual volume da solução de fluoresceína e a mistura foi deixada à temperatura ambiente, durante 40 minutos sob agitação constante. A seguir, a mistura foi lavada 3 vezes com solução de NaCl 0,15M e o sedimento ressuspenso em MME na concentração de 7%.

Os experimentos de inibição foram realizados adicionando-se 10 μ l da solução de fluoresceína sobre a suspensão de células antes do plaqueamento.

14. Viabilidade celular

O número total de células foi obtido em câmara de Neubauer com a suspensão de células diluída em ácido acético 1%.

As células inviáveis foram determinadas pela diluição em solução de azul-tripan preparada segundo Alex Matter (comunicação pessoal): 1 ml de azul de tripan (2 mg/ml), 0,25 ml NaCl 4,25% e 1 ml de tampão fosfato pH 7,2.

15. Sensibilização ao dinitrofluorobenzeno (DNFB)

A sensibilização ao DNFB (British Drug Houses

Chemicals, Poole, Dorset) foi realizada de acordo com o descrito de Vadas et. al. (1975). Animais depilados no abdomen receberam 50 μ l de DNFB 10 mg/ml diluído em acetona-óleo de oliva (1:1). Após 5 dias receberam como dose desencadeante 5 μ l da mesma solução na orelha esquerda.

16. Determinação da hipersensibilidade retardada ao dinitrofluorobenzeno (DNFB)

Vinte e quatro horas após receberem a dose desencadeante os animais foram mortos por deslocamento cervical e as orelhas cortadas na base. A avaliação da reação foi feita pela relação entre o peso das orelhas que receberam a dose desencadeante e o peso das orelhas que não receberam esta dose, conforme técnica descrita por Corsini *et al.* (1979).

17. Determinação das unidades formadoras de colônia no baço (UFC)

A determinação das unidades formadoras de colônias no baço (UFC) foi realizada seguindo-se a técnica de Till e McCulloch (1961).

Camundongos CBA/J foram irradiados (750 rads) de uma fonte de Co^{60} e injetados i.v. 2 horas depois com 0,2 ml de suspensão contendo 3×10^4 células viáveis obtidas da medula óssea de animais isogênicos. Após 9 dias os animais foram sacrificados e os baços fixados em Bouin contendo 5% de ácido acético glacial.

O número de nódulos existentes em cada baço foi determinado com uma lupa de 8 x de aumento.

18. Exame histológico

As orelhas foram fixadas em formaldeído 4% e processadas para hematoxilina-eosina e exame histológico segundo indicação de Burke *et al.* (1972).

19. Análise estatística

As análises estatísticas foram feitas através do teste "t" de Student.

RESULTADOS

I - Resposta Imune em Camundongos Infectados com *Trypanosoma cruzi*

1. Parasitemia

Com a finalidade de verificar o decurso da infecção com a cepa Y em camundongos BALB/c, procuramos inicialmente estabelecer a curva parasitêmica nos animais infectados com 100 formas de parasitos.

A parasitemia foi detectada somente a partir do 7º dia, atingindo o pico parasitêmico no 10º dia de infecção (figura 1). A partir do 12º dia os animais controlaram a parasitemia havendo poucos parasitos circulantes até o 20º dia de infecção, com alta taxa de mortalidade(90%).

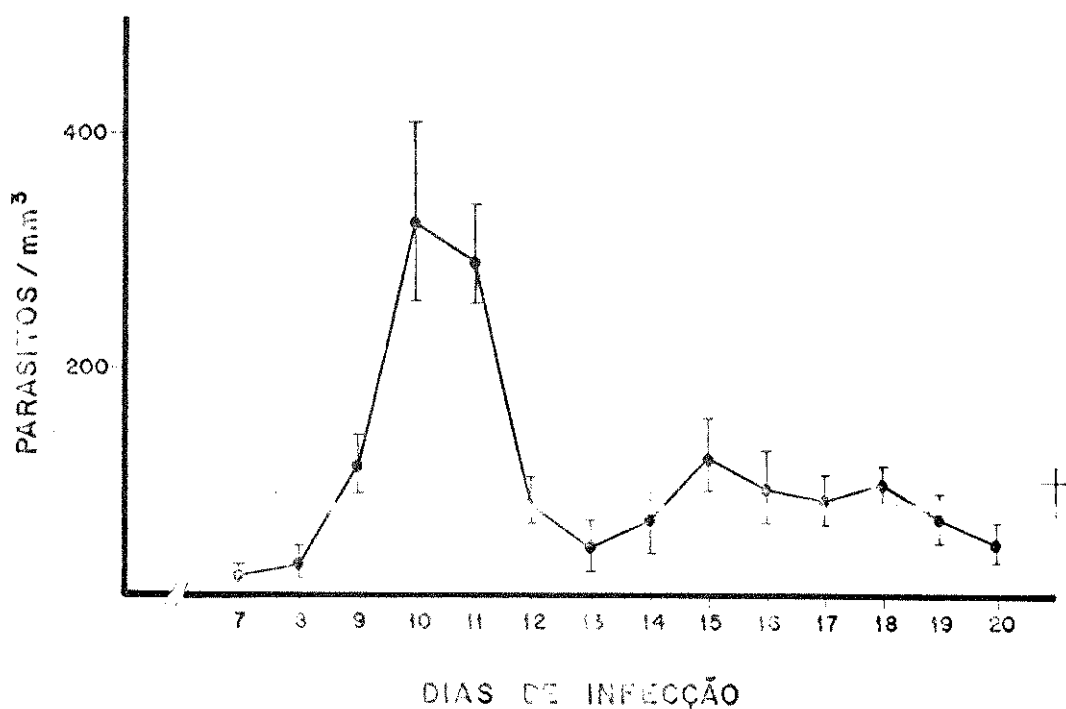


FIGURA 1 - Camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*. Cada ponto representa a média geométrica \bar{x} SD de 10 animais/dia até o 20º dia.

Até o 30º dia de infecção a sobrevivência dos animais infectados foi inferior a 5%, sem que nova onda parasitêmica tenha ocorrido, não havendo portanto correlação entre os altos níveis parasitêmicos e a taxa de mortalidade.

Nos experimentos realizados verificamos que, camundongos machos e fêmeas apresentaram comportamentos, praticamente, idênticos quanto à infecção. Da mesma maneira, não houve variações apreciáveis nos diferentes experimentos com relação ao padrão de infecção nestes animais.

2. Número de células esplênicas durante a infecção

A infecção experimental por *Trypanosoma cruzi*, geralmente determina esplenomegalia nos animais infectados. Com a finalidade de determinar o aumento do número de células esplênicas, camundongos BALB/c foram infectados com 100 formas de *Trypanosoma cruzi* e sacrificados em diferentes dias após a infecção. Observou-se um significativo aumento de aproximadamente 1,5 vezes no número de células após o 3º dia de infecção, atingindo o número máximo de 2,5 vezes mais células no 7º dia e permanecendo elevado nos restantes 20 dias de infecção.

A Figura 2 representa os resultados obtidos com grupos de 5 animais.

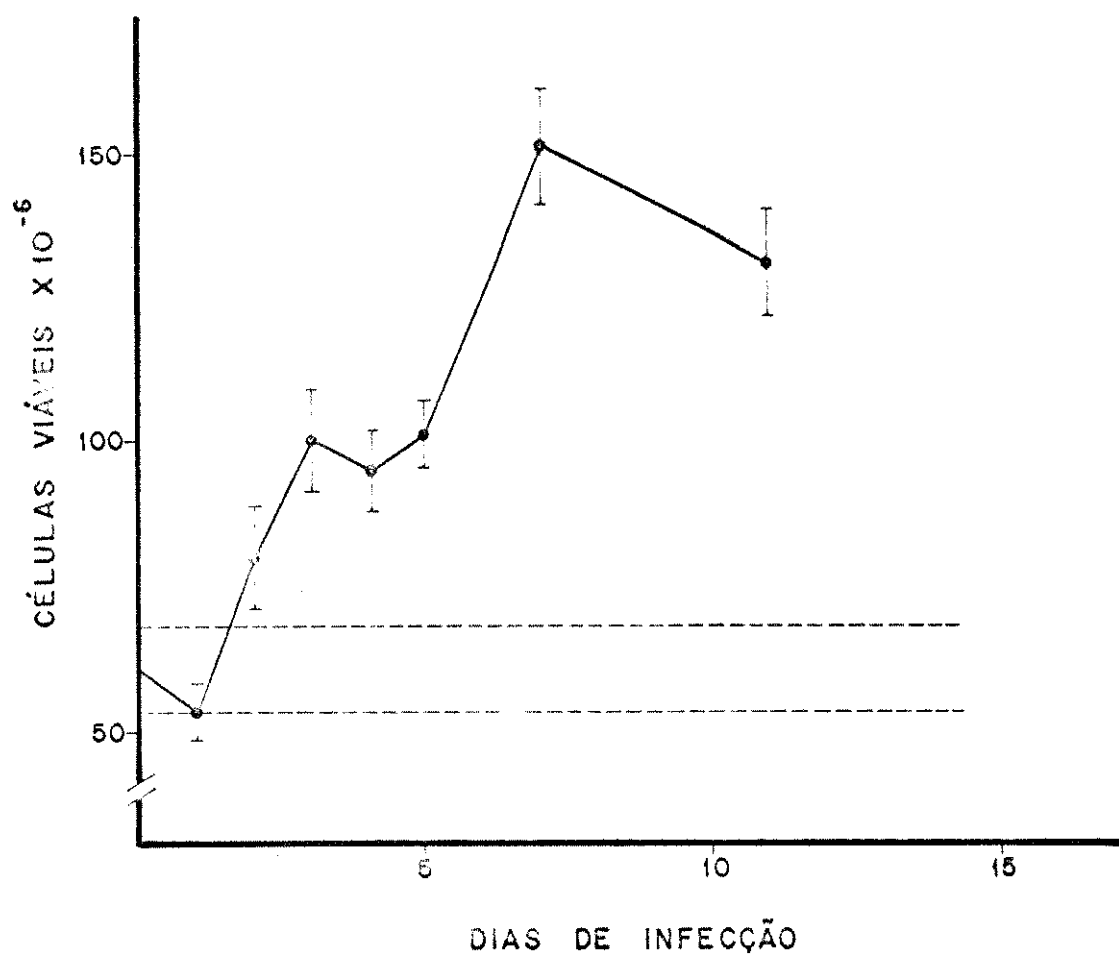


FIGURA 2 - Células viáveis em camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*. Cada ponto representa a média aritmética \pm 1 EPM (n=5). As linhas pontilhadas representam os valores normais \pm 2 EPM.

3. Supressão da resposta humoral em camundongos infectados

A imunossupressão em animais infectados por *Trypanosoma cruzi* tem sido demonstrada por vários autores (Clinton *et al.*, 1975; Ramos *et al.*, 1978), embora usualmente um grande inóculo (2×10^4 parasitos) tenha sido utilizado.

Com a finalidade de verificar se pequenos inóculos são também capazes de deprimir a resposta a hemácias de carneiro, camundongos BALB/c foram infectados com 100 formas de parasitos, imunizados em diferentes dias após a infecção e o número de CFP determinado 4 dias após a imunização.

De acordo com a Tabela 1 nota-se que 3 dias após a infecção, quando ainda não havia sido detectada a presença de parasitos circulantes, a resposta humoral contra hemácias de carneiro não se alterou, já que não houve modificação do número de CFP. No entanto, após 7 dias de infecção, quando os parasitos circulantes foram detectados, ocorreu uma alteração na resposta humoral a hemácias de carneiro com uma supressão de 63% no número de CFP. Depois de 11 dias de infecção quando o número de parasitos se encontra em torno do pico parasitêmico, ocorreu uma supressão de 76%. Estudamos a resposta humoral nos animais infectados somente até o 11º dia de infecção, visto que a partir do 12º dia tivemos um alto nível de mortalidade entre os animais.

TABELA 1 - Imunossupressão em camundongos BALB/c infectados com a cepa Y do *Trypanosoma cruzi*.

Dias de infecção	CFP/baço X 10 ⁻³	CFP/10 ⁶ cél. viáveis	% de supressão
0	135 ± 5,2	1120 ± 180	
3	120 ± 5,0	1195 ± 140	0
7	50 ± 3,5	288 ± 22	63
11	32 ± 1,3	313 ± 19	76

Camundongos BALB/c infectados com 100 parasitos i.p. . O número de CFP foi determinado 4 dias após a inoculação de 2 X 10⁸ hemácias de carneiro. Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

4. Aumento do número de células formadoras de placas (CFP) contra hemácias de carneiro em camundongos não imunizados e infectados com *Trypanosoma cruzi*.

Constatada a imunossupressão humoral nos animais infectados, procuramos verificar se havia aumento do número de CFP contra HC em animais infectados, porém não imunizados. Assim sendo, camundongos BALB/c foram infectados i.p. com 100 parasitos e o número de CFP contra hemácias de carneiro foi investigado durante o decurso da infecção.

Detectamos um aumento do número de CFP contra hemácias de carneiro, que atinge o pico no 3º dia de infecção, quando a parasitemia é ainda negativa. Este aumento do número de CFP em animais infectados não imunizados com hemácias de carneiro permanece alto e significativo até o 5º dia, decaindo a níveis normais depois do 7º dia de infecção (figura 3).

5. Resposta imune mediada por células em camundongos infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi*

Com a finalidade de se estudar a resposta mediada por células em camundongos BALB/c infectados com

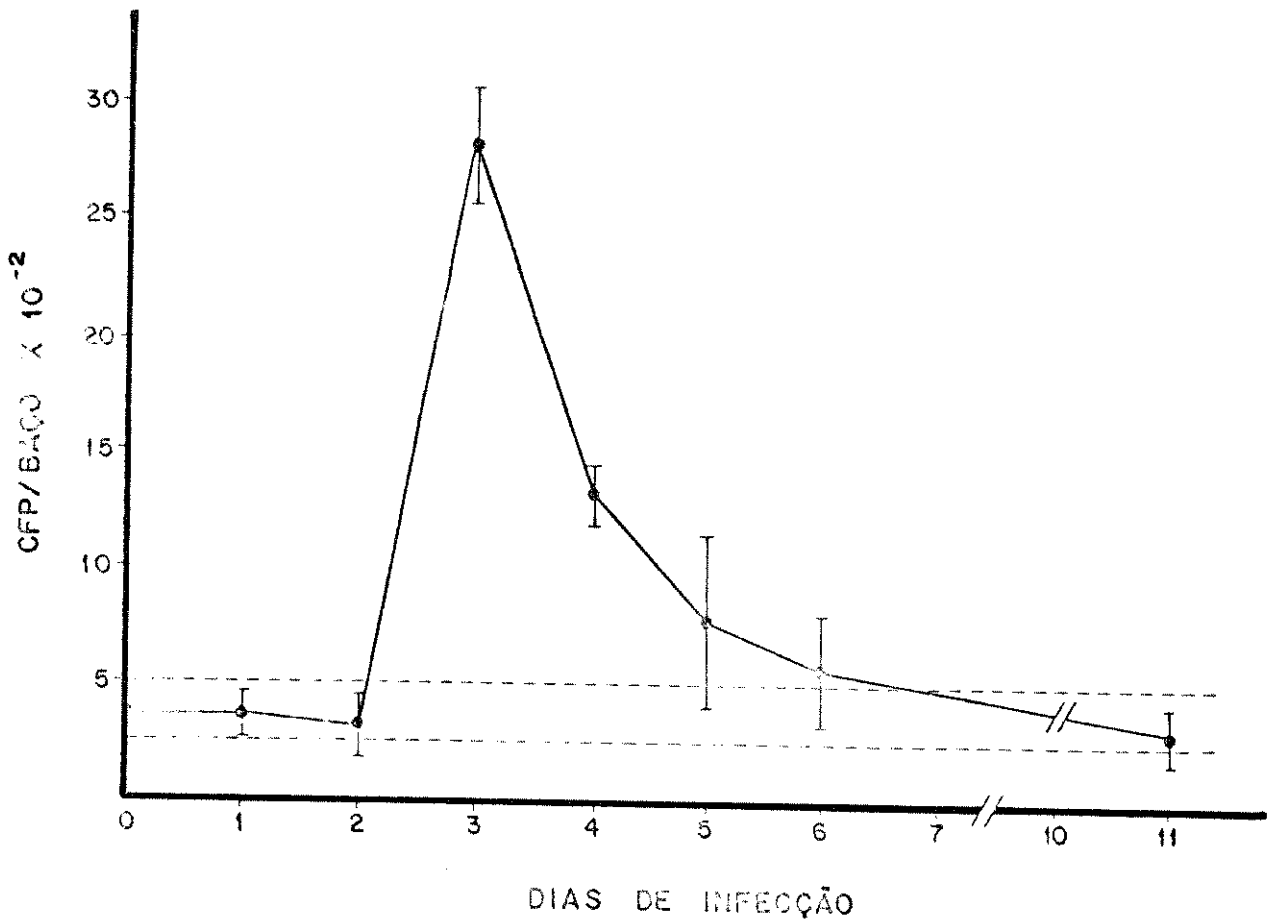


FIGURA 3 - CFP de camundongos BALB/c infectados com *Trypanosoma cruzi*. Cada ponto representa a média aritmética \pm 1 EPM (n=5). O intervalo entre as linhas pontilhadas representa os valores normais \pm 2 EPM.

100 formas de *T. cruzi* cepa Y, os animais foram sensibilizados com DNFB em diferentes dias após a infecção e receberam a dose desencadeante 5 dias após a sensibilização.

Tais animais infectados foram divididos em dois grupos: um dos grupos recebeu a dose sensibilizante no 6º dia após a infecção e o outro grupo recebeu essa mesma dose no 11º dia de infecção. O grupo controle foi constituído de animais normais que receberam as mesmas doses sensibilizantes e desencadeantes de DNFB.

A relação dos pesos obtidos das orelhas esquerdas e direitas (E/D) 24 horas após a dose desencadeante (Tabela 2) mostrou que não há diferença significativa entre o grupo controle e aqueles infectados. Concluimos portanto que diferentemente da supressão humoral, não há alteração da resposta imune mediada por células ao DNFB nos camundongos BALB/c infectados com 100 formas de parasitos.

Nossos resultados mostram portanto que camundongos BALB/c infectados com 100 formas de *T. cruzi* apresentaram significativa elevação do número de células esplênicas viáveis a partir do 3º dia de infecção, supressão da resposta humoral a hemácias de carneiro a partir do 7º dia de infecção e hipersensibilidade retardada ao DNFB normal. Verificamos também um aumento espontâneo do número de CFP contra hemácias de carneiro.

Constatada, portanto, a verificação de supressão humoral e possível ativação policlonal existentes em camundongos infectados, procuramos estudar os efeitos de extratos

TABELA 2 - Resposta imune mediada por células em camundongos infectados por *Trypanosoma cruzi* cepa Y.

Dias após a infecção	E/D
0	2,00 \pm 0,2
6	2,05 \pm 0,1
11	2,17 \pm 0,1

Resposta imune mediada por células avaliada pela relação entre os pesos das orelhas esquerda/direita (E/D). Os camundongos sensibilizados ao DNFB receberam a dose desencadeante 5 dias após a sensibilização. Os resultados expressam a média aritmética \pm 1 EPM (n = 5).

obtidos das formas epimastigotas e tripomastigotas sobre a resposta imune, assim como a ação desses extratos em UFC do baço de camundongos.

II - Efeito do Extrato de Epimastigotas (FAd) na Resposta Imune

1. Depressão da resposta imune primária a hemácias de carneiro pelo FAd

O efeito de FAd na resposta imune primária a hemácias de carneiro foi verificada em camundongos BALB/ c imunizados com 4×10^8 hemácias de carneiro e injetados 15 minutos antes do antígeno com 10, 35, 70, 140, 280 e 400 μg de proteína de FAd contidos em 0,2 ml.

De acordo com os dados da tabela 3 notamos que 10 μg de proteína de FAd não alterou a resposta imune a hemácias de carneiro. No entanto, as demais doses testadas suprimiram entre 50% e 62% o número de CFP. Este fato indica que grandes variações de doses (entre 70 e 400 μg de proteína de FAd) não diferem significativamente quanto a supressão determinada nos animais inoculados. Com 35 μg de proteína de FAd ocorreu supressão do número de CFP em somente 50% dos animais.

TABELA 3 - Efeito de FAd na resposta imune primária a hemácias de carneiro.

Doses (μg de proteína) de FAd	CFP/baço $\times 10^{-3}$	% de inibição
0	48,0 \pm 1,2	
10	50,0 \pm 0,82	0
35	24,1 \pm 2,0	50,0
70	20,3 \pm 0,98	58,0
140	21,3 \pm 1,1	56,0
280	18,1 \pm 1,6	62,0
400	21,6 \pm 1,1	55,0

Os resultados expressam a média aritmética \pm 1 EPM (n = 5).

Camundongos BALB/c imunizados com 4×10^8 HC.

2. Efeito do intervalo de tempo entre a inoculação do FAd e do antígeno na inibição da resposta humoral

O efeito do intervalo de tempo entre a inoculação do FAd e do antígeno foi investigado mediante inoculação de 100 µg de proteína de FAd em diferentes tempos antes ou depois do antígeno (4×10^8 hemácias de carneiro). Assim sendo, camundongos BALB/c foram inoculados com o FAd entre 15 minutos e 24 horas antes das hemácias de carneiro. Outros grupos de animais receberam o FAd numa única dose 8 horas após as hemácias de carneiro ou em 3 doses seguidas nos dias 0, 1 e 2 após a imunização.

Os resultados obtidos nas Tabelas 4 e 5 mostram que ao se inocular FAd entre 15 minutos e 6 horas antes do antígeno, houve uma supressão (52% a 72%) no número de CFP. No entanto, quando o FAd foi inoculado 24 horas antes das hemácias de carneiro nenhum efeito foi constatado. Verificamos que o tempo limite da injeção de FAd foi 12 horas antes do antígeno, visto que com esse tempo somente 50% dos animais apresentaram inibição (35%) no número de CFP. Quando 100 µg de proteína de FAd foram divididos em 5 doses de 20 µg e administradas a cada 12 horas, sendo a primeira dose 60 horas e a última 12 horas antes do antígeno, nenhum efeito foi verificado no número de CFP.

De acordo com os resultados da tabela 5 observamos que nenhuma inibição foi verificada em camundongos injetados com uma única dose de FAd após a imunização

TABELA 4 - Efeito do intervalo de tempo entre a injeção de FAd e HC na resposta imune primária.

FAd (100 µg de proteína) antes de HC	CFP/baço X 10 ⁻³	% de inibição
15 minutos	21,1 ± 1,4	72,0
3 horas	24,8 ± 1,5	67,0
6 horas	36,0 ± 1,0	52,0
12 horas	49,0 ± 6,3	35,0
24 horas	79,0 ± 1,6	0
5 doses de 20 µg cada 12 horas	74,0 ± 1,2	0
Controle	75,0 ± 1,0	-

Os resultados representam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5), em camundongos BALB/c imunizados com 4 x 10⁸ HC.

TABELA 5 - Efeito da injeção de FAd na resposta imune primária a HC.

FAd (100 µg de proteína) após HC	CFP/baço X 10 ⁻³	% de inibição
8 horas em uma única dose	75,0 ± 2,8	0
3 doses de 100 µg cada 24 horas	24,7 ± 1,8	67,0
Controle	74,7 ± 3,0	-

Os resultados representam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5), em camundongos BALB/c imunizados com 4 x 10⁸ HC.

com hemácias de carneiro. Contudo, os animais que receberam 100 µg de proteína de FAd a cada 24 horas após a imunização apresentaram 67% de inibição no número de CFP.

3. Depressão da resposta imune secundária a hemácias de carneiro pelo FAd

Com a finalidade de verificar o efeito da fração FAd na resposta imune secundária a hemácias de carneiro, camundongos BALB/c foram imunizados i.v. com 4×10^8 hemácias de carneiro e 26 dias após receberam a mesma quantidade de antígeno como dose de reforço. A fração FAd contendo 100 µg de proteína em 0,2 ml foi injetada antes da dose reforço ou antes da imunização primária. Determinou-se o número de CFP tanto diretas (IgM) quanto indiretas (IgG). Os resultados apresentados na Tabela 6 estão expressos em % de inibição por grupos de 5 animais/grupo.

Observamos uma diminuição do número de CFP tanto para IgM (76%) como para IgG (60%) quando os animais receberam FAd antes da dose reforço. Quando o FAd foi injetado antes da imunização primária, verificamos diminuição de 33% no número de CFP indiretas (IgG), não ocorrendo diminuição do número de placas diretas (IgM).

Concluimos portanto que o FAd suprime a resposta imune tanto primária quanto secundária a hemácias de carneiro, desde que inoculada antes da dose de reforço,

TABELA 6 - Supressão da resposta imune secundária a HC pelo FAd.

100 µg de proteína de FAd	CFP/baço X 10 ⁻³	
	Direta	Indireta
3 horas antes da dose primária	32,8 ± 6,5	435,7 ± 7,8 (33,0)
3 horas antes da dose reforço	7,9 ± 1,7 (76,0)	264,4 ± 1,7 (60,0)
Controle	32,7 ± 5,0	653,8 ± 6,9

Os valores expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5). Os valores em parenteses expressam % de supressão. Camundongos BALB/c imunizados com 4 x 10⁸ HC.

visto que quando inoculado antes da dose primária suprime apenas placas indiretas (IgG).

4. Supressão da resposta imune mediada por células pelo FAd

O efeito da fração FAd na resposta imune mediada por células foi avaliada através da resposta ao DNFB em camundongos BALB/c. Para tanto, os animais foram sensibilizados com 50 μ l de DNFB e receberam 5 μ l do antígeno como dose desencadeante 5 dias após na orelha esquerda. A fração FAd contendo 100 μ g de proteína foi injetada i.v. durante 3 dias seguidos após a sensibilização ou em dose única de 100 μ g no dia em que animais receberam a dose desencadeante. Os animais foram sacrificados 24 horas após a dose desencadeante e as orelhas cortadas e pesadas.

Os resultados mostrados na Tabela 7 expressam a relação entre os pesos das orelhas esquerdas e os pesos das orelhas direitas (E/D) por grupos de 5 animais.

Notamos uma depressão quando estabelecida a relação E/D ($p < 0,01$) em animais injetados com FAd durante 3 dias ou em animais injetados somente no dia que receberam a dose desencadeante.

As Figuras 4, 5 e 6 mostram nos exames histológicos das orelhas um menor infiltrado de células mononucleares e um edema menos acentuado nos animais que recebe-

TABELA 7 - Resposta imune mediada por células em camundongos inoculados com FAd.

Grupos	Relação de pesos entre as orelhas E/D	Significância Estatística
Controle	2,0505 ± 0,04	-
FAd durante 3 dias	1,6713 ± 0,04	p < 0,01
FAd no dia da dose desencadeante	1,3566 ± 0,04	p < 0,01

Camundongos BALB/c foram imunizados com DNFB e receberam FAd (100 µg) durante 3 dias após a sensibilização ou no dia da dose desencadeante. Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

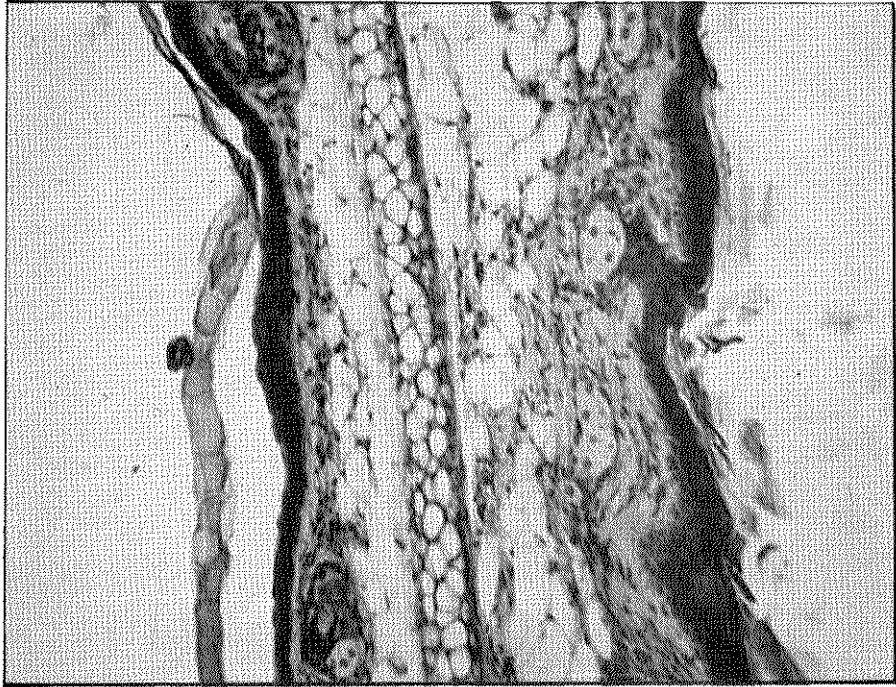


FIGURA 4



FIGURA 5

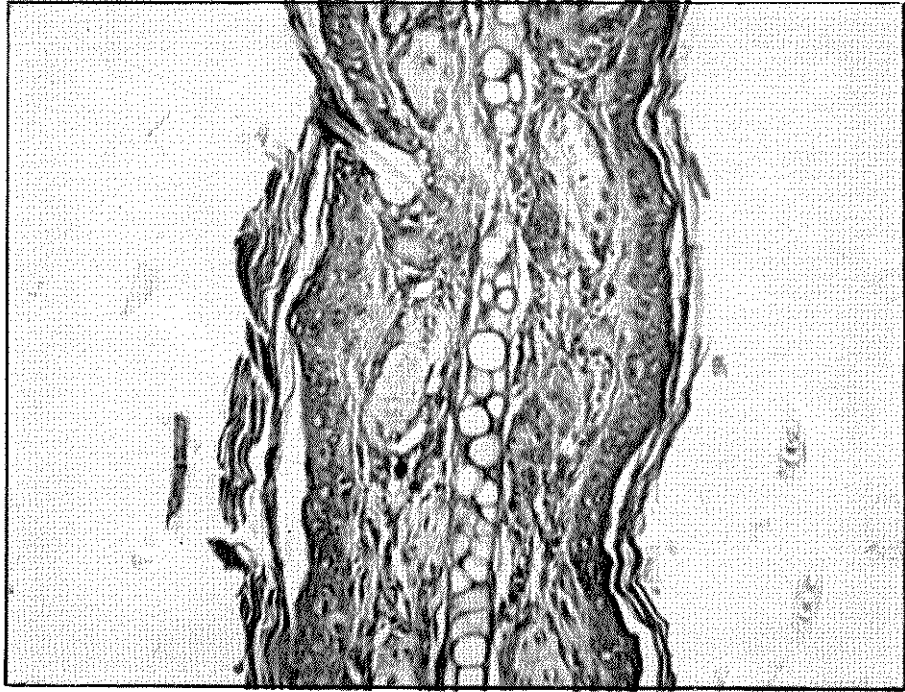


FIGURA 6

FIGURAS 4, 5 e 6 - Hipersensibilidade retardada ao DNFB em camundongos inoculados com FAd. Corte histológico das orelhas de camundongos BALB/c sensibilizados com DNFB. Aumento de 100 X.

Figura 4 - Animais que receberam FAd no dia da dose desencadeante.

Figura 5 - Controle (animais sensibilizados).

Figura 6 - Controle (animais não sensibilizados).

Notar uma menor infiltração de células mononucleares e menor edema nos animais sensibilizados que receberam FAd (Figura 4).

ram FAd.

Os resultados apresentados demonstram a ocorrência de supressão pelo FAd da resposta imune mediada por células quando avaliada através da resposta ao DNFB.

5. Unidade formadora de colônias (UFC) no baço de camundongos inoculados com FAd.

Procurando verificar se o FAd teria algum efeito bloqueador sobre a proliferação celular, testou-se esta possibilidade através de seu efeito sobre as UFC nos baços de camundongos. Para tanto, camundongos CBA/J irradiados com 750 rads foram injetados i.v., 2 horas após a irradiação, com 3×10^4 células viáveis obtidas da medula óssea de animais isogênicos. Estes animais receberam i.v. a fração FAd (100 µg de proteína) numa única dose ou 3 doses seguidas nos dias 0, 1 e 2 após a transferência das células.

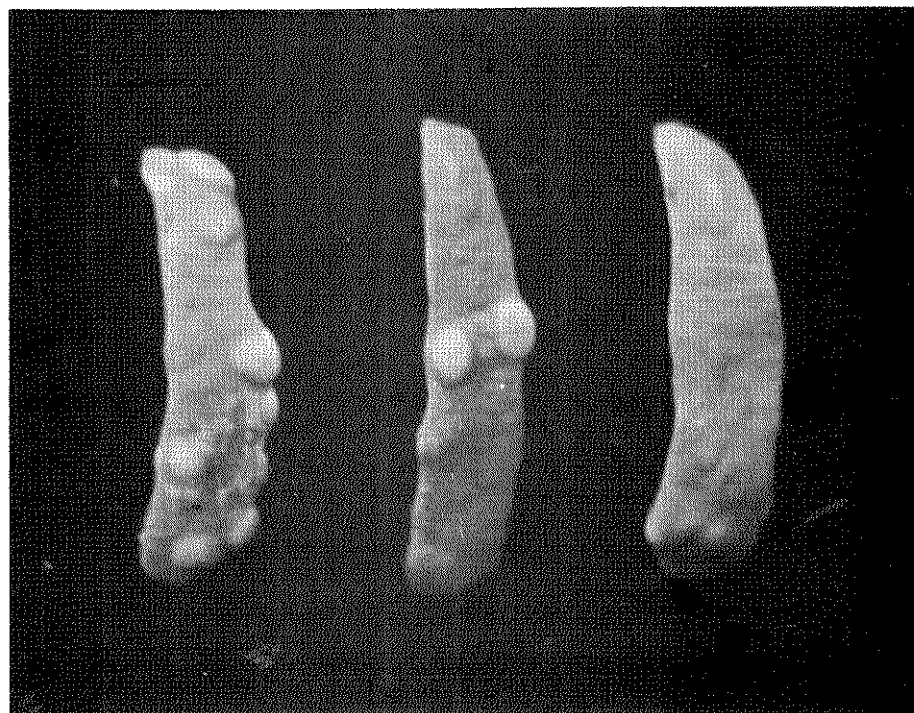
Os resultados (Tabela 8) mostram uma diminuição no número de UFC em animais inoculados tanto com uma única dose, como em animais inoculados com 3 doses de FAd. Este último grupo de animais, além de apresentar uma diminuição no número de UFC apresenta uma nítida diminuição no tamanho dos nódulos (Figura 7).

Concluimos portanto que o FAd diminui tanto o número quanto o tamanho das UFC sugerindo portanto, uma ação bloqueadora sobre a proliferação celular das células da medula óssea.

TABELA 8 - Unidades Formadoras de Colônias no baço de camundongos CBA/J irradiados e inoculados com FAd.

Grupos	UFC/baço	Significância Estatística
Controle	15,0 ± 0,90	-
FAd no dia de transferência	8,6 ± 0,78	P < 0,01
FAd durante 3 dias	4,8 ± 0,48	P < 0,01

Os resultados apresentados representam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).



A

B

C

FIGURA 7 - Unidades Formadoras de Colonias em camundongos CBA/J irradiados e injetados com FAd.

A - Grupo controle

B - Animais que receberam FAd no dia da transferência das células

C - Animais que receberam FAd durante 3 dias

Notar diminuição tanto do número quanto do tamanho dos nódulos (UFC).

6. Atividade mitogênica do FAd

A capacidade do FAd interferir na proliferação celular, levou-nos a verificar se o mesmo é capaz de exercer uma atividade mitogênica. Para tanto, camundongos BALB/c foram inoculados com 100 µg de proteína de FAd e determinado o número de CFP contra hemácias de carneiro 72 h, 48 h, 24 h, 12 h, 6 h e 3 horas após a inoculação, procurando-se desta maneira detectar um aumento no número de CFP nos animais apenas inoculados com a fração em questão.

Todos os resultados foram negativos, não mostrando nenhuma alteração no número de CFP em relação ao grupo controle, sugerindo portanto não haver atividade mitogênica no FAd.

III - Efeito do Extrato de Tripomastigotas (EBTri) na Resposta Imune.

1. Atividade mitogênica do EBTri.

Uma vez verificada a existência de ativação policlonal na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* através do aumento do número de CFP no baço e considerando a inexistência de atividade mitogênica na fração obtida de epimastigotas (FAd) que, ao contrário, mostra uma atividade de bloqueio da divisão celular, procuramos mediante

tais fatos verificar os efeitos do EBTri sobre a resposta imune. Para tanto, camundongos BALB/c foram inoculados i.v. com 0,2 ml de concentrações variáveis de extrato e o número de CFP contra hemácias de carneiro verificado entre 2 e 6 dias após a inoculação.

Os resultados expressos na Tabela 9 mostram que em todas as doses testadas ocorre um significativo aumento no número de CFP a partir do 3º dia, ocorrendo o pico no 4º dia após a inoculação do EBTri, quando então verificamos um aumento de 20 a 30 vezes do número de CFP (Tabela 10).

Uma vez determinado o aumento do número de CFP procuramos estudar a cinética dessa atividade mitogênica. Para tanto, camundongos BALB/c foram inoculados i.v. com 0,2 ml de EBTri contendo 2×10^6 parasitos/ml e o número de CFP determinado entre 1 e 8 dias após a inoculação. Os resultados expressos na Figura 8 mostram um significativo aumento do número de CFP no 2º dia após a inoculação do EBTri, atingindo o pico no 4º dia. Até o 6º dia o número de CFP permanece elevado atingindo os níveis normais somente a partir do 7º dia após a inoculação do EBTri.

Considerando a possibilidade da existência de determinantes antigênicos comuns entre o *Trypanosoma cruzi* e as hemácias de carneiro e, conseqüentemente estarmos medindo na realidade a reação cruzada e não a atividade policlonal do extrato, determinamos também o número de CFP contra hemácias de carneiro fluoresceinadas 3, 4 e 5 dias

TABELA 9 - Atividade mitogênica do EBTri.

Dias após a inoculação	Quantidade de EBTri (parasitos/ml)		
	1 X 10 ⁶	2 X 10 ⁶	4 X 10 ⁶
0	110 ± 7,6	110 ± 7,6	110 ± 7,6
2	-	192 ± 11,8	256 ± 28
3	832 ± 28,4	1180 ± 40	1264 ± 46,8
4	1720 ± 108	1976 ± 175,6	2352 ± 50
5	1408 ± 197	1056 ± 71	1570 ± 53
6	-	480 ± 24,6	216 ± 9,1

Camundongos BALB/c inoculados com 0,2 ml de EBTri. Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

TABELA 10 - CFP contra HC em camundongos inoculados com EBTri.

Quantidade de EBTri (Parasitos/ml X 10 ⁶)	CFP/baço	CFP/10 ⁶ células viáveis
4,0	2352 ± 50	30,6 ± 2,4
2,0	2320 ± 87,6	31,4 ± 3,0
1,0	1720 ± 108	21,7 ± 2,5
0	110 ± 17	1,1 ± 0,2

Camundongos BALB/c inoculados com EBTri. O número de CFP foi determinado 4 dias após a inoculação. Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

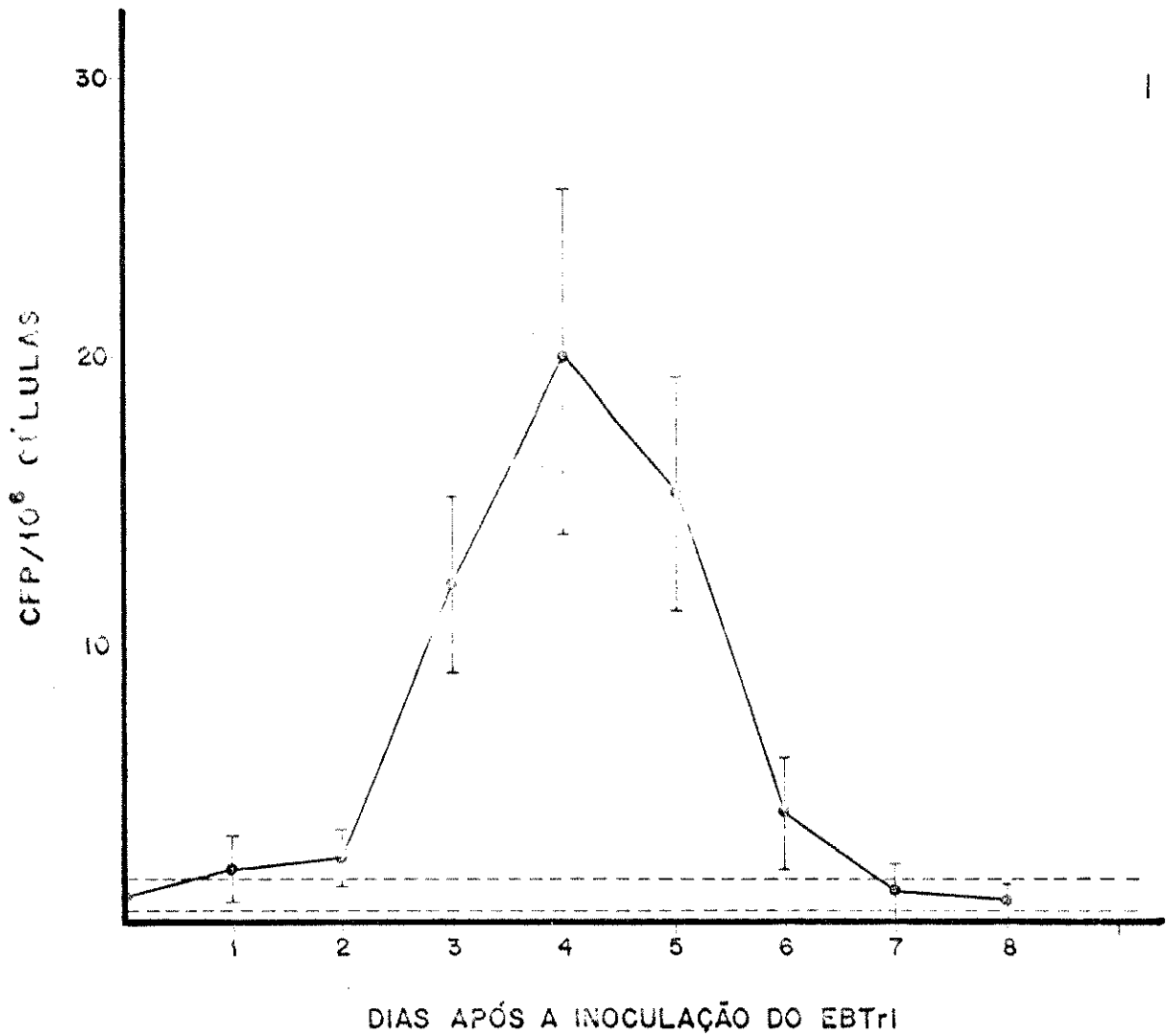


FIGURA 8 - CFP em camundongos BALB/c injetados com 0,2 ml de EBTri (2×10^6 parasitos/ml). Cada ponto representa a média aritmética ± 1 EPM (n=5). As linhas pontilhadas representam os valores normais ± 2 EPM.

após a inoculação de 0,2 ml de amostras do EBTri.

Os resultados expressos na Tabela 11 mostram um aumento do número de CFP quando os animais foram inoculados com 0,2 ml das suspensões preparadas entre $0,25 \times 10^6$ e 2×10^6 parasitos/ml, aumento este mais evidente no 4º dia após a inoculação.

Mediante os resultados obtidos procuramos confirmar a especificidade da reação adicionando fluoresceína à suspensão de células esplênicas antes do plaqueamento. Os resultados expressos na Tabela 12 mostram uma inibição do número de CFP em relação ao grupo controle.

2. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) em baço de camundongos inoculados com EBTri.

Visto que os experimentos anteriores demonstraram que a infecção experimental por *Trypanosoma cruzi* ou a inoculação de extratos de tripomastigotas (EBTri) provocam um aumento no número de CFP, procuramos verificar se o EBTri interfere com a formação de UFC em camundongos. Para tanto, camundongos CBA/J irradiados receberam i.v. 2 horas após a irradiação 3×10^4 células obtidas de animais isogênicos. A suspensão de EBTri (0,2 ml) contendo 2×10^6 tripomastigotas/ml foi injetada i.v. no dia da transferência celular ou em 3 doses seguidas nos dias 0, 1 e 2 após a transferência das células.

TABELA 11 - CFP contra HC conjugadas a fluoresceína em camundongos inoculados com EBTri.

Parasitas/ml X 10 ⁶	CFP/Baço		
	3 dias	4 dias	5 dias
2,0	1120 ± 45,8	1920 ± 45,6	1136 ± 32,2
1,0	928 ± 94,4	1112 ± 45,2	608 ± 40,8
0,5	496 ± 25	856 ± 28	640 ± 27,6
0,25	272 ± 24	1152 ± 65,8	736 ± 34,6
0,1	N. R.	416 ± 11,8	260 ± 46,0
0	-	80 ± 6,4	-

Camundongos BALB/c inoculados i.v. com 0,2 ml de EBTri. Os resultados expressam a média aritmética

± 1 EPM (n = 5).

TABELA 12 - Inibição do número de CFP contra HC fluoresceïnadas

Grupos	CFP/baço	CFP/10 ⁶ células viáveis
HC + Fluoresceína	85 ± 22 ^a	1,4 ± 0,5
Controle	381 ± 37 ^b	5,6 ± 1,0

a - b p < 0,001

Camundongos BALB/c inoculados com 0,2 ml de EBTri (2 X 10⁶ parasitos/ml). O aumento do número de CFP obtidos nos animais que não receberam EBTri (155 ± 23) foi descontado do número de CFP obtido nos grupos experimentais. Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

TABELA 13 - Unidades Formadoras de Colonias em camundongos
CBA/J irradiados e inoculados com EBTri.

Grupos	UFC/baço
Controle	14,4 \pm 0,42
EBTri no dia da transferência	16,6 \pm 0,78
EBTri durante 3 dias	14,6 \pm 0,42

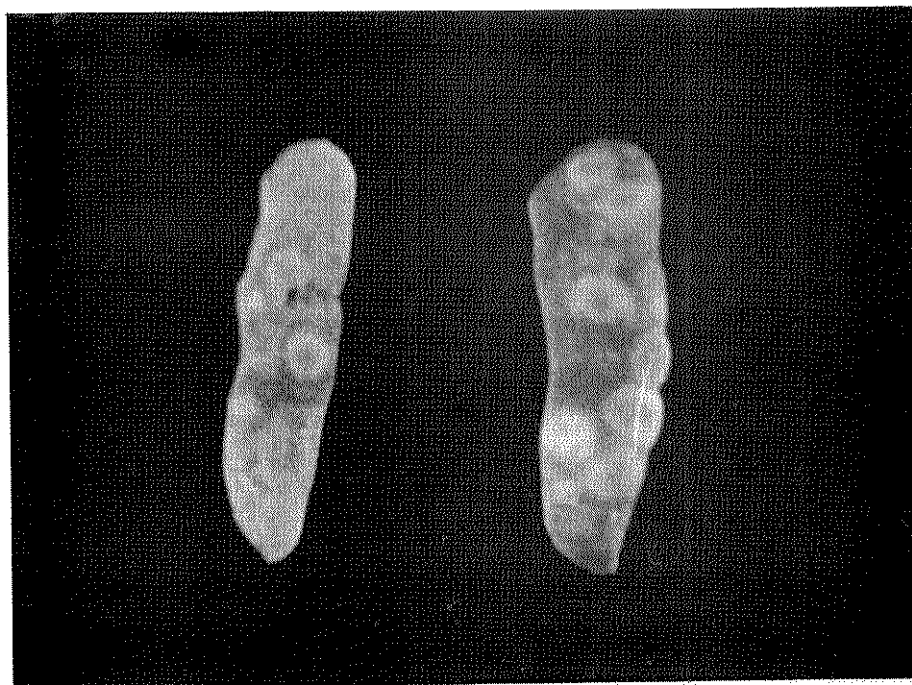
Os resultados expressam a média aritmética \pm 1 EPM (n = 5).

Os resultados obtidos mostram não haver alteração do número de UFC/baço nos animais que receberam EBTri (Tabela 13). No entanto, podemos observar na Figura 9 que o tamanho dos nódulos dos baços de animais que receberam EBTri são, consideravelmente maiores que os apresentados em animais controles. O aumento do tamanho dos nódulos é, particularmente, maior nos animais que receberam o EBTri no dia da transferência das células.

3. Supressão da resposta imune humoral primária a hemácias de carneiro pelo EBTri.

Visto que os nossos resultados demonstraram um efeito mitogênico do EBTri no sistema imune, procuramos verificar a ação do EBTri sobre a resposta humoral a hemácias de carneiro. Para tanto, camundongos BALB/c foram inoculados i.v. com 0,2 ml de EBTri contendo 2×10^6 parasitos/ml antes ou depois de 2×10^8 hemácias de carneiro, determinando-se o número de CFP 4 dias após a imunização.

Os resultados expressos na Tabela 14 demonstram uma supressão entre 30 e 46% no número de CFP quando o EBTri foi inoculado no período entre 2 a 6 dias antes do antígeno. No entanto, quando o EBTri foi inoculado 15 minutos antes ou 24 horas depois a resposta imune primária não foi afetada.



A

B

FIGURA 9 - Unidades Formadoras de Colonias em baços de camundongos CBA/J irradiados e injetados com EBTri.

A - Grupo controle

B - Animais que receberam EBTri no dia da transferência das células

Notar o aumento do tamanho dos nódulos no grupo B inoculado com EBTri.

TABELA 14 - Supressão da resposta imune primária a HC por EBTri em camundongos BALB/c.

EBTri antes (-) ou depois (+) de HC em dias	CFP/baço X 10 ⁻³	% de supressão
Controle	234 ± 15,0	-
- 15 minutos	214 ± 5,0	-
- 2	153 ± 5,0	35
- 3	152 ± 16,0	35
- 4	167 ± 14,0	29
- 5	126 ± 9,0	46
- 6	142 ± 7,0	39
+ 1	214 ± 5,4	-

Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

4. Supressão da resposta imune secundária a hemácias de carneiro

Visto que observamos no experimento anterior supressão da resposta primária a hemácias de carneiro quando estas são inoculadas depois do EBTri, procuramos verificar também uma possível supressão da resposta secundária. Para tanto, camundongos BALB/c receberam i.v. 0,2 ml de EBTri contendo 2×10^6 parasitos/ml 3 ou 4 dias antes da dose de reforço do antígeno. Além do grupo controle que recebeu a dose de reforço, tivemos mais dois grupos controles:- um deles não recebeu a dose de reforço do antígeno e o outro ao invés da dose de reforço recebeu somente EBTri. Determinou-se o número de CFP tanto diretas (IgM) quanto indiretas (IgG).

Conforme podemos observar na Tabela 15 houve uma supressão tanto de CFP diretas (IgM) como de CFP indiretas (IgG), quando EBTri foi inoculado 3 ou 4 dias antes da dose de reforço, mostrando portanto, que ocorre uma supressão tanto para IgM como para IgG, quando o EBTri foi inoculado 3 ou 4 dias antes da dose de reforço.

Por outro lado, os animais que receberam o EBTri ao invés da dose de reforço do antígeno, apresentaram uma significativa elevação do número de CFP diretas (IgM) quando comparados com os animais que receberam somente a primeira dose de antígeno e não receberam o EBTri. O mesmo fato não se verifica em relação a CFP indiretas (IgG).

TABELA 15 - Supressão da resposta imune secundária a HC por EBTri em camundongos BALB/c.

EBTri antes da dose reforço em dias	CFP/baço X 10 ⁻³	
	Direta	Indireta
Controle	78 ± 3,7 ^a	898 ± 62 ^d
- 3	57 ± 7,1 ^b (27)	537 ± 28 ^e
- 4	48 ± 5,8 ^c (40)	647 ± 77 ^f
sem dose reforço	0,4 ± 0,5	3,5 ± 1,3
somente EBTri	2,5 ± 4,2	3,6 ± 1,2

Os valores em parênteses expressam % de supressão. a - b p < 0,05; a - c p < 0,01; d - e p < 0,01; d - f p < 0,05. Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

5. Efeito do EBTri sobre a resposta imune mediada por células

Como já verificado anteriormente, camundongos infectados com *Trypanosoma cruzi* não apresentaram alteração da resposta imune mediada por células avaliada através da resposta ao DNFB. No entanto, a fração FAd suprimiu esta mesma resposta quando inoculada durante 3 dias após a sensibilização ou em apenas uma única dose no dia da dose desencadeante. Assim sendo, procuramos verificar se o mesmo ocorre em animais inoculados com EBTri. Para tanto, Camundongos BALB/c foram sensibilizados ao DNFB e receberam 0,2 ml de EBTri contendo 2×10^6 parasitos/ml durante 3 dias seguidos após a sensibilização ou uma única dose do extrato no dia em que os animais receberam a dose desencadeante do antígeno.

Os resultados da Tabela 16 mostram a relação entre os pesos das orelhas esquerdas e diretas (E/D) em grupos de 5 animais/grupo. Verificamos que a relação E/D não é significativa ($p > 0,05$) se comparada ao grupo controle.

Similarmente ao que ocorre em camundongos infectados experimentalmente, o EBTri não interfere com reações de hipersensibilidade retardada ao DNFB.

TABELA 16 - Resposta imune mediada por células em camundongos BALB/c inoculados com EBTri.

Grupos	Relação de pesos entre as orelhas E/D
Controle não inoculado	1,70 ± 0,1
EBTri no dia da dose desencadeante	1,46 ± 0,1
EBTri no dia da sensibilização	1,18 ± 0,07
EBTri durante 3 dias após sensibilização	1,60 ± 0,1

Os resultados expressam a média aritmética ± 1 EPM (n = 5).

DISCUSSÃO

A imunossupressão da resposta imune é um dos fenômenos mais característicos da infecção experimental dos camundongos pelos parasitos do gênero *Trypanosoma*. Assim, Murray *et al.* (1974a e 1974b) demonstraram a supressão da resposta humoral a HC, através das técnicas de hemaglutinação e CFP, em camundongos infectados por *T. brucei*. Da mesma maneira, Hudson *et al.* (1976) assinalaram uma rápida elevação do número de CFP para IgM seguida de uma supressão da resposta a HC, enquanto que Assoku e Tizard (1979) observaram elevação do número de CFP e depressão da resposta a HC e a polissacáride de pneumococo tipo III (SIII) em camundongos infectados por *T. congolense*.

A imunossupressão da resposta humoral a antígenos não relacionados, sejam eles particulados ou solúveis, tem sido também descrita na tripanosomíase americana experimental. Assim, Clinton *et al.* (1975) verificaram supressão

da resposta humoral a hemácias de burro em camundongos CF-I infectados com cepas miotrópica e reticulotrópica (não identificadas) de *T. cruzi*. Ramos *et al.* (1978) utilizando a mesma raça de camundongos e a mesma cepa de *T. cruzi* verificaram supressão a hemácias de burro, agregados de GGH e a antígenos T-independentes DNP-Ficoll e LPS, enquanto que Lima Pereira (1978) observou supressão a HC utilizando camundongos Swiss infectados com a cepa Y.

Nossos resultados também indicam que durante a fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* ocorre acentuada supressão da resposta imune a HC. Esta supressão, no entanto, somente foi detectada após o 7º dia da infecção, quando foram detectados parasitos circulantes, acentuando-se no 11º dia, isto é, no pico parasitêmico. Estes resultados são semelhantes aos obtidos por outros autores em camundongos infectados por *T. cruzi* (Clinton *et al.*, 1975; Ramos *et al.*, 1978; Lima Pereira, 1978) e mostram uma relação direta entre o aumento do nível parasitêmico e a indução da imunossupressão.

Nossos experimentos demonstraram também a alta susceptibilidade dos camundongos BALB/c quando infectados com 100 formas da cepa Y, visto que 90% dos animais morreram após 20 dias de infecção. Curiosamente, no entanto, o padrão da curva parasitêmica (fig. 1), isto é, duração do período pré-patente (7 dias) e dia do pico parasitêmico (11º dia após a infecção) foi semelhante àquele encontrado nas demais raças isogênicas estudadas no nosso laboratório (Corsini *et al.*, 1980b).

No entanto, já a partir do 2º dia de infecção observamos um aumento do número de células esplênicas viáveis que perdura durante toda a infecção correspondendo, portanto, à grande esplenomegalia verificada nos animais infectados. Além disso, durante o período pré-patente, verificamos um aumento do número de CFP à HC. Assim sendo, após o 3º dia de infecção, o número de CFP/baço foi 30 vezes maior que o verificado no grupo controle não infectado. Esse aumento de CFP se restringiu, no entanto, somente ao período pré-patente, visto que houve uma diminuição do número de CFP/baço, quando os animais apresentaram parasitos circulantes, retornando este número aos níveis normais (Fig. 3).

Estes fatos sugerem que importantes alterações nas populações das células esplênicas ocorreram durante o período pré-patente da infecção, isto é: paralelamente ao aumento do número de células esplênicas ocorreu a diferenciação de clones produtores de anticorpos anti-HC, independentemente da imunização com este antígeno, sugerindo, portanto, a existência de ativação policlonal na infecção pelo *T. cruzi* a exemplo do que ocorre também na infecção pelo *T. brucei* (Assoku e Tizard, 1979; Hudson *et al.*, 1976; Kobayakawa *et al.*, 1979).

Estes resultados estão de acordo com aqueles obtidos por Ortiz-Ortiz *et al.* (1980) os quais trabalhando com camundongos A/J infectados pela cepa Cocula (miotrópica e reticulotrópica) de *T. cruzi* detectaram o aparecimento de CFP ao TNP e eritrócitos de várias espécies animais, assim também como a HC isólogas envelhecidas durante, o período pré-pa

tente, coincidindo a diminuição do número de CFP com o aparecimento de tripomastigotas na circulação sanguínea.

No entanto, enfatizamos que não obtivemos supressão da resposta humoral a HC, quando os camundongos foram imunizados durante o período pré-patente da infecção. Pelo contrário, a ocorrência de depressão (63%) foi verificada somente após o 7º dia de infecção quando a parasitemia era positiva. Além disto, a depressão da resposta humoral a HC aumentou consideravelmente (76%), quando os camundongos foram imunizados no 11º dia de infecção, isto é, no pico parasitêmico (Tabela 1).

Considerando, porém a alta susceptibilidade dos camundongos BALB/c mesmo a baixos inóculos da cepa Y, não pudemos verificar os efeitos da infecção sobre a resposta humoral secundária. No entanto, Corsini *et al.* (1980a) obtiveram supressão da resposta humoral secundária (IgG) em camundongos (CBA x C57Bl/10) F_1 imunizados com HC e infectados com 10^2 formas da cepa Y oito dias antes da dose reforço. Curiosamente, foi detectado apenas supressão das CFP do tipo indireto (IgG) mas não do tipo direto (IgM). Estes fatos confirmam a grande susceptibilidade da resposta humoral, particularmente IgG, à infecção pelo *T. cruzi* a exemplo de que ocorre nas infecções pelos tripanosomas africanos (Sacks *et al.*, 1980; Sacks e Askonas, 1980).

Entretanto, verificamos que os animais infectados não apresentaram alteração da hipersensibilidade retardada ao DNFB. Assim sendo, estes resultados confirmam aqueles

obtidos por Corsini *et al.* (1980d) em camundongos C3H/HeJ (susceptíveis) e camundongos (CBA x C57B1/10)F₁ (resistentes), mostrando portanto que a reação de hipersensibilidade retardada ao DNFB em camundongos infectados com *T. cruzi*, independe da resistência destes camundongos a cepa Y. Além do mais, nos camundongos C₃H/HeJ a hipersensibilidade retardada mostrou-se aumentada, fenômeno este anteriormente descrito por Askonas *et al.* (1979) nas infecções por *T. brucei* em camundongos (CBA x C57B1/6)F₁.

Estes resultados contudo, diferem dos obtidos por Reed *et al.* (1977) os quais demonstraram supressão da resposta imune mediada por células em camundongos Swiss infectados com a cepa Tulahuen e sensibilizados com Adjuvante Completo de Freund ou Oxazolona. Da mesma forma Lima Pereira (1978) demonstrou a ocorrência de supressão da resposta imune mediada por células a HC em camundongos Swiss infectados com a cepa Y, e Rowland e Kuhn (1978) obtiveram supressão da hipersensibilidade retardada ao PPD e a um extrato de epimastigotas de cultura. Observa-se, no entanto, que em todos estes experimentos foram utilizados altos inóculos. Conseqüentemente, a diferença dos resultados obtidos, talvez possa ser atribuída às diferentes cepas utilizadas, e/ou, mais provavelmente ao grande inóculo utilizado por aqueles autores para a infecção dos animais (Corsini *et al.*, 1980d),

Assim sendo, concluímos que desde que pequenos inóculos (10^2 formas) da cepa Y sejam utilizados para a infecção dos camundongos, a resposta imune mediada por células, medida através da hipersensibilidade retardada ao DNFB não está

suprimida, contrariamente à resposta humoral primária a HC.

Da mesma maneira, na tripanosomíase africana experimental pelo *T. brucei* não foi detectada supressão de hipersensibilidade retardada ao DNFB (Askonas *et al.*, 1979) e à oxazolona (Murray *et al.*, 1974b). Aliás esta é a única reação imune do tipo mediado por células que não se encontra suprimida nesta tripanosomíase, visto que a rejeição de aloenxertos (Pearson *et al.*, 1978) a reação mista de linfócitos (Askonas *et al.*, 1979; Pearson *et al.*, 1979) e as respostas "in vitro" a PHA (Corsini *et al.*, 1977; Jayawardena e Waksman, 1977) e Con A (Pearson *et al.*, 1978) mostraram-se suprimidas.

A razão da relativa resistência das reações de hipersensibilidade retardada ao efeito imunossupressor das tripanosomíases, são ainda obscuras (Askonas *et al.*, 1979; Corsini *et al.*, 1980d). No entanto, três hipóteses foram aventadas: a) as sub-populações de células T mediadoras das reações de hipersensibilidade retardada são mais resistentes a supressão causada pelos tripanosomas (Askonas *et al.*, 1979); b) outras células efetoras da hipersensibilidade retardada, tais como macrófagos, tem sua função preservada nas tripanosomíases (Clayton, 1979); c) o aumento absoluto ou relativo do número de macrófagos no local de desencadeamento de reações de hipersensibilidade retardada, poderia superar a eventual supressão das células T (Corsini *et al.*, 1980d).

Tais fatos revelam o profundo desconhecimento das causas determinantes da imunossupressão nas infecções experi

mentais pelos tripanosomas, de enorme importância prática, visto que fenômenos idênticos tem sido descritos nas infecções humanas pelo *Trypanosoma gambiense* (Greenwood, 1974) e *Trypanosoma cruzi* (Vilela, 1980; Corsini *et al.*, 1981).

O estudo, portanto, dos efeitos de frações obtidas dos parasitos poderia elucidar possíveis mecanismos imunossupressores existentes nas infecções por tripanosomas, revelando importantes pontos das interações hospedeiro - parasito de possível aplicação no controle das tripanosomíases (WHO, 1975).

Assim sendo, estudamos o efeito de dois extratos de *T. cruzi* sobre a resposta imune a saber: a) a fração antigênica denominada FAd, obtida por incubação em tampão fosfato de lisados (congelamento e descongelamento sucessivos) de epimastigotas cultivados em meio de LIT (Fernandes e Castellani, 1966) seguindo as instruções de Tamashiro (1980) e b) o extrato denominado EBTri obtido de formas tripomastigotas circulantes de *T. cruzi*, também por congelamento e descongelamento sucessivos (3 vezes).

A fração FAd causou importante supressão da resposta humoral primária a HC quando inoculada antes do antígeno em doses que variaram de 35 µg a 400 µg. A dose de 35 µg determinou supressão em apenas 50% dos animais, sugerindo ser esta o limite da dose supressiva (Tabela 3).

Os efeitos supressivos da FAd sobre a resposta primária foram dependentes do momento da administração da fração em relação ao antígeno. Assim sendo, 100 µg de proteína de

FAd inoculados 15 minutos, 3h e 6h antes do antígeno determinaram significativa supressão (entre 52% e 71,8%) enquanto que esta dose de FAd administrada 12 horas antes do antígeno determinou supressão em apenas 50% dos animais, o que sugere ser este o tempo limite entre a administração de FAd e do antígeno para a obtenção de supressão (Tabela 4).

A administração, contudo, desta mesma dose supressiva (100 µg) em 5 doses de 20 µg, administradas a cada 12 horas antes do antígeno foi incapaz de suprimir a resposta humoral (Tabela 4). Este fato nos sugere que o organismo seria capaz de superar o efeito supressor destas pequenas doses de FAd, contrariamente à administração de uma única dose de 100 µg de FAd.

Por outro lado, esta mesma dose de 100 µg de proteína de FAd, inoculada apenas uma vez, após as HC não determinou supressão da resposta humoral (resultados não mostrados). Contudo, a administração de 100 µg/dia nos dias seguintes a imunização, durante 3 dias consecutivos, causou supressão de 66,8% (Tabela 5).

Observamos também, em nossos experimentos que as placas obtidas a partir de camundongos inoculados com FAd sempre se apresentaram bem menores do que as placas obtidas dos animais controles (resultados não mostrados). Este fato sugere a possibilidade de que os anticorpos secretados pelas células dos animais que receberam FAd sejam de menor afinidade do que aqueles obtidos nos animais controle (Klaus e Humphrey, 1974).

A fração FAd (100 µg) foi também capaz de suprimir a resposta humoral secundária a HC, visto que ocorreu diminuição de 76% das placas do tipo IgM (diretas) e de 60% das placas do tipo IgG (indiretas) quando da aplicação de FAd 3 horas antes da dose reforço (tabela 6). Contudo, a administração de FAd apenas antes da dose primária seguida da dose de reforço suprimiu em 33% apenas as placas do tipo indireto (IgG) (Tabela 6).

Não foi verificado nos experimentos tanto de resposta primária quanto secundária mudança no pico das respostas, isto é, tanto na resposta primária quanto na secundária os picos das respostas a HC ocorreram no 4º dia após a dose primária ou secundária, independentemente da administração ou não de FAd. Este fato nos sugere que a supressão é real e não decorre de alterações da dinâmica da resposta humoral.

Além da supressão das respostas humorais primárias e secundárias, a FAd causou também supressão da resposta imune mediada por células ao DNFB, particularmente quando a FAd foi inoculada após a dose desencadeante (Tabela 7). Assim sendo, a administração de 100 µg de FAd, tanto antes da dose desencadeante, quanto em 3 dias consecutivos após a sensibilização com o DNFB, suprimiu a hipersensibilidade retardada, diminuindo a relação OE/OD a 50% daquela verificada nos animais controles. Estes dados foram confirmados histologicamente (Figs. 4, 5 e 6), onde se verificou diminuição de edema e do infiltrado inflamatório na orelha dos animais inoculados com FAd.

Da mesma maneira as Unidades Formadoras de Colonias (UFC), obtidas em camundongos CBA/J irradiados que receberam células de animais singênicos, apresentaram significativa de pressão tanto nos animais que receberam FAd no dia da transferência das células, quanto naqueles que receberam o extrato durante 3 dias seguidos após a transferência (Tabela 8 e Fig. 7). Assim sendo, verificamos uma diminuição tanto no número de UFC/baço nos animais inoculados, quanto uma diminuição do tamanho dos nódulos. Estes resultados foram mais evidenciados naqueles animais inoculados com FAd durante 3 dias consecutivos após a transferência das células singênicas.

Por outro lado, a inoculação de FAd em diversas doses (1 µg, 10 µg, 50 µg, 100 µg e 400 µg) não determinou aumento do número de células esplênicas e aumento do número de CFP contra HC nos animais inoculados com esta fração (resultados não mostrados) o que nos sugere a inexistência de atividade mitogênica nesta fração.

Resumindo, a fração FAd obtida de lisados de epimastigotas de *T. cruzi* parece ser desprovida de atividade mitogênica; suprime a resposta mediada por células ao DNFB; diminui tanto o número quanto o tamanho dos nódulos das UFC no baço e suprime, quando inoculada até 6 horas antes do antígeno, a resposta primária a HC, em doses de até 35 µg/proteína. A fração FAd também foi capaz de suprimir a resposta secundária tanto de IgM quanto de IgG, quando inoculada antes da dose de reforço, suprimindo no entanto apenas a resposta de IgG quando inoculada antes da dose primária.

Por outro lado, diferentemente da FAd o extrato bruto de tripomastigotas (EBTri) aumentou significativamente o número de CFP contra HC em todas as doses testadas, a partir do 3º dia de inoculação. Curiosamente, o tempo decorrido para que houvesse aumento do número de CFP em animais inoculados com EBTri foi praticamente igual àquele decorrido para animais infectados, isto é, camundongos inoculados com EBTri apresentaram o pico para CFP no 4º dia e camundongos infectados no 3º dia (Figs. 3 e 8).

A possibilidade da existência de reação cruzada entre possíveis determinantes comuns que poderiam existir no tripanosoma e nas HC, é pouco provável uma vez que detectamos CFP contra fluoresceína ligada a HC, o que segundo Coutinho e Möller (1975) seria uma medida eficiente de ativação policlonal de células B, isto é, a resposta humoral contra um hapteno ligado a HC. Assim, observamos que células esplênicas de animais inoculados com várias doses de EBTri apresentaram um significativo aumento do número de CFP contra Fl-HC, ocorrendo o pico no 4º dia após a inoculação (Tabela 11). A especificidade da reação foi confirmada quando a fluoresceína adicionada às células esplênicas no momento do plaqueamento, determinou uma inibição de 75% no número de CFP (Tabela 12).

Estes resultados sugerem fortemente a existência de atividade mitogênica no EBTri. A presença deste mitógeno foi ainda mais evidenciada com os resultados obtidos nos experimentos elaborados para se estudar o efeito do EBTri sobre as UFC/baço.

Assim sendo, embora não tenha sido notado um aumento do número de nódulos nos baços dos animais inoculados com EBTri, o tamanho destes nódulos foi significativamente maior nestes animais. Este fato sugere que: a) na presença do EBTri as células multiplicam-se mais rapidamente; b) mesmo células indiferenciadas da medula óssea são ativadas pelo EBTri. Portanto, o EBTri exerceria atividade mitogênica tanto sobre células diferenciadas dos órgãos linfóides secundários, quanto sobre as células indiferenciadas dos órgãos linfóides primários.

Verificamos também que tanto a resposta imune primária quanto a resposta imune secundária, foram suprimidas quando o EBTri foi inoculado antes do antígeno. A resposta imune primária foi suprimida entre 30 e 40% quando o EBTri foi inoculado entre 2 e 6 dias antes das HC (Tabela 14). Da mesma forma, na resposta imune secundária ocorreram inibições para IgM e para IgG quando o EBTri foi inoculado entre 3 e 4 dias, antes da dose de reforço (Tabela 15). Não foram realizados experimentos de resposta secundária, inoculando-se o EBTri somente antes da dose primária.

Por outro lado, nenhuma alteração foi notada na hipersensibilidade retardada ao DNFB, tanto nos camundongos que receberam o EBTri durante 3 dias seguidos após a sensibilização ao DNFB quanto nos camundongos que receberam o EBTri no dia da dose desencadeante (Tabela 16).

Resumidamente, o EBTri aumenta o número de CFP contra HC e Fl-HC no baço dos animais inoculados, aumenta o

tamanho dos nódulos das UFC/baço, não interfere com a hipersensibilidade retardada ao DNFB e suprime a resposta primária a HC somente quando inoculado antes do antígeno. Da mesma forma, a resposta secundária a HC foi suprimida quando o EBTri foi inoculado antes da dose de reforço.

Verificamos portanto, que os resultados obtidos com os 2 extratos, FAd e EBTri, indicam que ambos suprimem a resposta humoral a HC. Porém, algumas diferenças entre esses extratos foram notadas: a) a fração FAd determina supressão da hipersensibilidade retardada ao DNFB, contrariamente ao EBTri que não interfere com esta resposta; b) a fração FAd não determina aumento do número de CFP contra HC, porém deprime o número de UFC/baço, enquanto que o EBTri além de determinar um aumento do número de CFP contra HC e Fl-HC, não exerce nenhuma ação sobre o número de UFC, mas determina aumento do tamanho dessas UFC.

Estes fatos sugerem fortemente que o mecanismo de ação destes extratos levando à supressão da resposta humoral seriam diferentes.

Assim sendo, tem sido demonstrado que a produção de anticorpos pelos plasmócitos ocorre "in vitro" apenas após extensa proliferação das células precursoras (Zauderer e Askonas, 1976; Askonas e North, 1976; Kenshead *et al.*, 1977). Resultados semelhantes haviam sido obtidos por Dutton (1975) demonstrando que a geração de CFP "in vitro" envolve extensa proliferação de células B, seguida posteriormente de uma fase de diferenciação sob a influência das células

las T auxiliares. A fase de proliferação de células B é sensível a irradiação (Dutton, 1975; Kenshead *et al.*, 1977) e, conseqüentemente, uma eventual inibição da fase proliferativa determinaria uma inibição da resposta imune.

Desta maneira, com relação a fração FAd, visto que a maior depressão ocorreu quando a fração foi administrada em 3 doses de 100 µg nos dias imediatos à administração de antígeno, assim como nos dias subsequentes à sensibilização ao DNFB e também quando administrada no dia da dose desencadeante, sugerimos que a FAd atuaria bloqueando a divisão de células precursoras das células formadoras de anticorpos e também daqueles mediadores da hipersensibilidade retardada. Este fato, parece ser confirmado com as experiências de UFC, visto que ocorreram significativas diminuições no número e no tamanho dessas UFC, quando a FAd foi administrada em várias doses após a transferência das células ou ainda, em apenas uma dose no dia dessa transferência.

Este bloqueio ocorreria nas fases iniciais da proliferação de células B, o que explicaria a supressão da resposta secundária somente das placas indiretas (IgG) quando os animais receberam FAd antes da dose primária e supressão tanto para IgM como IgG, quando inoculados antes da dose de reforço.

No entanto, a administração de FAd depois do antígeno numa única dose de 100 µg de proteína ou em doses parceladas de 20 µg, não interfere com o número de CFP, sugerindo portanto que o sistema imune pode superar o efeito supressor

de FAd, visto que sua ação seria nas fases iniciais da proliferação das células B.

Além disto, o fato de obtermos também depressão da resposta imune mediada por células ao DNFB, leva-nos a supor que provavelmente o bloqueio da proliferação celular feito por FAd seja também ao nível das células T. Assim sendo, embora o mecanismo imunossupressor determinado pela FAd não tenha sido elucidado nestes experimentos, é possível que a FAd inibindo a proliferação das células T auxiliares, que proliferam intensamente após o estímulo antigênico (revisado por Katz, 1977), impediria a atuação destas células na fase de diferenciação das células B. Portanto, não somente os precursores das CFP seriam passíveis de bloqueio mediado pela FAd, mas também as células T auxiliares. Experimentos futuros poderão eventualmente confirmar estas hipóteses.

No entanto, não podemos excluir uma possível atuação de FAd a nível dos macrófagos, visto que essas células secretam um grande número de substâncias imunologicamente ativas (Unanue, 1978) e estão também envolvidas na resposta imune.

Assim sendo, a fagocitose de HC não foi alterada quando avaliada por ingestão das hemácias sensibilizadas com anticorpos (EA) em camundongos injetados i.p. 1 hora antes com 100 µg de proteína de FAd. Entretanto, os níveis de aminopeptidases sofreram alterações em macrófagos peritoneais colhidos de camundongos injetados diariamente durante 3 dias, com 100 µg de proteína de FAd (Corsini e Guimarães, resultados não publicados).

Por outro lado, os camundongos infectados ou inoculados com EBTri, habitualmente apresentaram aumento do número de CFP contra HC, seguido de supressão da resposta humoral a esse antígeno. Estes resultados sugerem que uma ativação policlonal de células B ocorra durante a infecção de camundongos por *T. cruzi*. Esta ativação policlonal tem sido observada por vários autores em camundongos infectados por *T. brucei* (Hudson *et al.*, 1976; Corsini *et al.*, 1977; Kobayakawa *et al.*, 1979) e poderia estar relacionada com a imunossupressão nas infecções por tripanosomas (Hudson *et al.*, 1976).

A possibilidade da existência de um mitógeno no EBTri foi evidenciado pelo fato de obtermos também aumento do número de CFP para IgM em camundongos que receberam este extrato, semelhantemente aos resultados obtidos com camundongos infectados. A possível existência deste mitógeno no extrato evidencia-se também através do aumento do tamanho dos nódulos de UFC nos animais que receberam o EBTri, sugerindo que mesmo as células imaturas da medula óssea são susceptíveis a ação mitogênica do extrato.

Vários autores (Esuruoso, 1976; Mansfield *et al.*, 1976; Assoku e Tizard, 1978; Assoku e Tizard, 1979) evidenciaram a mitogenicidade "in vitro" de lisados de *T. brucei* sobre células esplênicas. Clayton *et al.* (1979a) mostraram que frações da membrana de *T. brucei* obtidas por lise e centrifugação diferencial, além de elevarem os níveis de CFP diretas (IgM) contra antígenos não relacionados, suprimem a resposta a HC diminuindo o número de CFP tanto

diretas (IgM), quanto indiretas (IgG).

Estes autores verificaram também que a atividade mitogênica e/ou supressora exercida por essas frações de membrana, ocorre independentemente da presença de células T. Este fato, sugere que estaria excluída do mecanismo de supressão exercido pelos extratos a participação de células T supressoras (Clayton *et al.*, 1979b). No entanto, a participação de macrófagos ativados atuando como células de atividade supressora não estaria excluída. Este fato é importante e não foi analisado em nossos experimentos. Contudo, a participação de macrófagos de atividade supressora foi demonstrada por Corsini *et al.* (1977) nas infecções por *T. brucei*.

Estes fatos demonstram que além de haver estímulo mitogênico sem uma infecção ativa, visto que os animais receberam apenas o extrato preparado a partir das formas tripomastigotas, após esse estímulo ocorre também imunossupressão. Talvez possamos admitir que os mesmos ativadores policlonais de células B existentes no tripanosoma infectante estejam presentes no EBTri e que esses ativadores mediarão a supressão da resposta imune tanto em camundongos infectados como em camundongos que receberam o extrato.

Sugerimos que o mecanismo através do qual o EBTri determinaria a imunossupressão a HC, seja semelhante àquele descrito para o LPS (Diamantstein *et al.*, 1976), visto que a supressão somente foi verificada quando o EBTri foi inoculado antes do antígeno. Assim, o EBTri promovendo a expan-

são clonal das células B, seguida da produção de imunoglobulinas inespecíficas em virtude do estímulo blastogênico, determinaria a exaustão desses clones à semelhança da tripanosomíase africana (Corsini *et al.*, 1977; Askonas *et al.*, 1979).

Assim, tem sido demonstrado que as células produtoras de anticorpos necessitam de várias fases de proliferação e diferenciação antes de se tornarem células maduras, secretoras e produtoras de imunoglobulinas, principalmente do tipo IgG (Askonas e North, 1976; Zauderer e Askonas, 1976). A indução das células linfóides à proliferação, diferenciação e maturação seria através de sinais provindos do antígenos e/ou por interações celulares ou ainda por substâncias mitogênicas ou ativadores policlonais de linfócitos, como o LPS (Coutinho e Möller, 1975).

Corsini *et al.* (1977) sugerem que as células B que ainda estão em estágio primário de seu desenvolvimento são também imediatamente estimuladas a proliferação nas infecções por tripanosomas, de tal forma que toda a população de células B de camundongos infectados são levadas, através do estímulo blastogênico a exaustão clonal. Baseados no fato que o potencial de proliferação e diferenciação dos clones de células B é limitado (Williamson e Askonas, 1972), os autores sugerem que os camundongos infectados ou inoculados com estimuladores de células B, tornam estas células incapazes de responder ao estímulo antigênico.

A frequência destas células reativas aos ativadores

policlonais, como LPS, no baço dos camundongos é relativamente alta. Assim, Anderson *et al.* (1979) demonstraram que 1 em cada 3 células esplênicas reagem ao LPS, multiplicando-se e em seguida maturando-se em células secretoras de IgM. Frequências similares foram encontradas para células reativas do mitógeno do fungo *Nocardia* e às substâncias encontradas no soro fetal de bovinos, normalmente empregados em cultura de tecido. Além do mais, estes autores verificaram que uma vez ativadas as células esplênicas, estas passam a apresentar outros receptores a diferentes mitógenos, aumentando assim a possibilidade de ativação policlonal aos mitógenos normalmente encontrados na natureza.

Nossos resultados encontram apoio nestes dados, visto que o estímulo blastogênico ocorrido durante o período pré-patente exaure de tal forma os clones de células B, que o número de células reativas ao antígeno (CRA) (Nossal e Ada, 1971) diminui drasticamente após o período pré-patente. Em consequência, a imunização após a primeira semana de infecção resulta numa severa supressão. Estes fatos assumem maior importância, quando verificamos que o EBTri ativa também as células da medula óssea, o que poderia acarretar também exaustão clonal a nível dos órgãos primários.

No entanto, não conseguimos demonstrar efeito adjuvante de EBTri quando inoculado simultaneamente com o antígeno ou nos dias 1 e 2 após a imunização com HC, contrariamente ao efeito adjuvante exercido pelo LPS (Diamantstein *et al.*, 1976).

Contudo, Corsini *et al.* (1980a) utilizando camundon-

gos (CBA x C57Bl/10) F_1 , mostraram efeito adjuvante quando a infecção com 100 formas de *T. cruzi* se dava simultaneamente com a inoculação de HC ou quando este antígeno foi inoculado 24 e 48 horas antes ou 24 horas após a infecção.

É possível também que a(s) substância(s) mitogênica verificada no EBTri esteja presente na circulação dos animais infectados. Assim, experimentos preliminares (Costa e Corsini, resultados não publicados) demonstraram atividade supressora no soro de animais infectados. Da mesma forma, Cunningham *et al.*, 1978, 1980) demonstraram a presença de uma substância, por eles denominada supressora, no soro de animais infectados. Visto que o EBTri foi preparado a partir de tripomastigotas circulantes é possível que proteínas do soro estejam presentes no extrato.

Os resultados mostrando estímulo blastogênico seguido de imunossupressão reforçam ainda mais a hipótese de Hudson *et al.* (1976), os quais afirmam que a alta produção de IgM detectada por CFP e a imunossupressão estão relacionadas e que ambas são conseqüências do estímulo blastogênico da infecção.

Nossos resultados mostram, portanto, um efeito mitogênico determinado pela infecção do *T. cruzi* ou do extrato de sua forma circulante (EBTri), ativando a expansão clonal de células B e síntese de anticorpos inespecíficos. Como conseqüência deste efeito, verificamos a ocorrência de depressão da resposta humoral, provavelmente por mecanismo de exaustão clonal.

Por outro lado, na fração obtida das formas epimastigotas de cultivo de *T. cruzi* (FAd), não detectamos a presença de substâncias mitogênicas. No entanto, esta fração determina supressão tanto da resposta humoral como da resposta imune mediada por células, provavelmente através de um bloqueio celular determinado por esta fração ao nível das células B e/ou T. Todavia, outros mecanismos poderão estar envolvidos na imunossupressão exercida pelos parasitos ou seus extratos (Mitchell, 1979, 1980; Corsini, in press).

Trabalhos futuros deverão ser realizados na tentativa de isolamento e caracterização bioquímica das substâncias envolvidas na imunossupressão experimental mediada pelo *T. cruzi*.

RESUMO E CONCLUSÕES

Verificamos no presente trabalho, que camundongos BALB/c infectados com 100 formas de *T. cruzi* cepa Y são muito susceptíveis à infecção por esta cepa. Os animais infectados apresentaram aumento do número de células formadoras de placas (CFP) contra hemácias de carneiro (HC) somente durante o período pré-patente demonstrando portanto a existência de ativação policlonal na infecção pelo *T. cruzi*. A supressão da resposta humoral ocorreu somente após o 79 dia de infecção, quando a parasitemia era positiva. Esta supressão foi tanto maior quanto mais intensa era a parasitemia e mais se acentuou quando os animais foram imunizados no pico parasitêmico. No entanto, durante a infecção não se detectou nenhuma alteração da hipersensibilidade retardada ao dinitrofluorobenzeno (DNFB).

No estudo dos efeitos da fração FAd obtida a partir de lisados das formas epimastigotas sobre a resposta imune do camundongo, verificamos não haver aumento do número

de CFP contra HC, nos animais que receberam esta fração, o que sugere que a FAd não possui atividade mitogênica demonstrada por estes experimentos.

Esta fração determinou no entanto, supressão da resposta humoral primária a HC quando inoculada antes do antígeno ou durante 3 dias consecutivos após a imunização. A resposta secundária também foi suprimida, visto que obtivemos significativas diminuições do número de placas diretas (IgM) e de placas indiretas (IgG), quando a FAd foi inoculada antes da dose de reforço do antígeno. Esta fração dada antes da dose primária determinou supressão somente das placas indiretas (IgG).

Estes fatos levam-nos a supor que a fração FAd agiria bloqueando a divisão celular. Este bloqueio ocorreria nas fases iniciais da proliferação de células B.

Além da supressão da resposta humoral, a FAd também exerceu ação sobre a hipersensibilidade retardada ao DNFB, visto que essa reação mostrou-se suprimida pela ação dessa fração, o que nos sugere que a FAd exerceria seu efeito de bloqueio da proliferação celular também ao nível de células T.

Além do mais, a fração FAd foi capaz de determinar diminuições no tamanho e no número de nódulos das unidades formadoras de colônias (UFC), o que parece tornar mais evidente o fato desta fração agir nas fases iniciais da divisão celular bloqueando sua proliferação.

Contrariamente, a essa fração e semelhantemente ao que ocorre durante a infecção, o extrato bruto de tripomastigotas (EBTri), determinou aumento do número de CFP contra HC e hemácias de carneiro conjugadas a fluoresceína (Fl-HC), sugerindo igualmente ao que ocorre na infecção pelo *T. cruzi*, uma ativação policlonal do sistema imune mediada por este extrato. O EBTri parece evidenciar essa atividade mitogênica, pelo fato de determinar aumento no tamanho dos nódulos das UFC.

De maneira similar ao que ocorre na infecção pelo *T. cruzi*, após a ativação policlonal de células B, ocorre supressão das respostas humorais primárias e secundárias a HC, nos animais que receberam o EBTri, sugerindo que a ativação policlonal, provavelmente, exaure os clones de células B, originando conseqüentemente a supressão da resposta humoral.

Igualmente, ao que ocorre nas infecções experimentais, o EBTri não alterou a hipersensibilidade retardada ao DNFB.

Os resultados obtidos permitem sugerir as seguintes conclusões:

1. Os camundongos BALB/c são muito susceptíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

2. Durante a infecção pelo *T. cruzi* ocorre ativação policlonal de células B durante o período pré-patente, provavelmente devido a ação de substância(s) mitogênica(s).

3. A supressão da resposta humoral a HC parece ter uma relação direta com a elevação do nível parasitêmico.

4. Os efeitos da ativação policlonal levam provavelmente a uma exaustão dos clones de células B, diminuindo significativamente o número de CRA, ocorrendo por consequência a supressão da resposta humoral.

5. Os dois extratos, FAd e EBTri, apresentam mecanismos de ação diferentes ao determinarem supressão da resposta imune.

6. A fração FAd é desprovida de ação mitogênica.

7. A fração FAd exerceria efeito supressor através de bloqueio da proliferação celular, tanto a nível das células B, quanto das células T.

8. O EBTri mimetiza os efeitos da infecção experimental pelo *T. cruzi* na resposta imune, visto que ambos promovem a ativação policlonal de células B, seguido de supressão da resposta humoral.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ANDERSON, J.; COUTINHO, A. & MELCHERS, F. Mitogen - activated B-cell blasts reactive to more than one mitogen. *J. Exp. Med.* 149: 553-564, 1979.
- ASKONAS, B.A. & NORTH, R.J. The lifestyle of C cell. Cold Spring Harbor Symp. Quant. *Biology.* 41: 749, 1976.
- ASKONAS, B.A.; CORSINI, A.C.; CLAYTON, C.E. & OGILVIE, B. M. Functional depletion of T-and B-memory cells and other lymphoid cell subpopulations during trypanosomiasis. *Immunol.* 36: 313-321, 1979.
- ASSOKU, R.K.G. & TIZARD, I.R. Mitogenicity of autolysates of *Trypanosoma congolense*. *Experientia* 32: 127-129, 1978.
- ASSOKU, R.K.G. & TIZARD, I.R. Immunosuppression in Experimental African Trypanosomiasis Polyclonal B-cell activa-

- tion and mitogenicity of trypanosome-derived saturated fatty acids. *Int. Archs. Allergy appl. Immun.* 59: 298-307, 1979.
- BRENER, Z. Terapêutica Experimental da Doença de Chagas. In: CANÇADO, J.R. ed. *Doenças de Chagas*. Belo Horizonte, Brasil, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p. 501-516.
- BURKE, J.D.; WEYMOUTH, R.J.; SEIBEL, H.R. Histological methods. In: *Essentials of histology*. New York: Barron's Educational Seires, 1972. p. 5-17.
- CALDERON, J.; KIELY, J.M.; LEFKE, J.L. & UNANUE, E.R. The modulation of lymphocyte functions by molecules secreted by macrophages. I - Description and partial biochemical analysis. *J. Exp. Med.* 142: 151-164, 1975.
- CHAGAS, C. Nova tripanosomíase humana. Estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n. gen. n. sp. agente etiológico de nova entidade mórbida no homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, 1: 159-218, 1909.
- CLAYTON, C.E. Immunosuppression in Trypanosomiasis and Malaria. In: *The role of the spleen in the Immunology of Parasitic Diseases*. Proceedings of the meeting held in Geneva, 1978. Basel, Schwabe, 1979. p. 97-114 (Tropical Diseases Research Series, 1).

- CLAYTON, C.E.; SACKS, D.L.; OGILVIE, B.M. & ASKONAS, B.A.
Membrane fractions of trypanosomes mimic the immunosuppressive and mitogenic effects of living parasites on the host. *Paras. Immunol.* 1: 241-249, 1979a.
- CLAYTON, C.E.; OGILVIE, B.M. & ASKONAS, B.A. *Trypanosoma brucei* infection in nude mice: B lymphocyte function in suppressed in the absence of T lymphocytes. *Parasite. Immunol.* 1: 39-48, 1979b.
- CLAYTON, C.E.; SELKIRK, M.E.; CORSINI, A.C.; OGILVIE, B.M. & ASKONAS, B.A. Murine Trypanosomiasis: Cellular proliferation and functional depletion in the blood, peritoneum and spleen related to changes in bone marrow stem cells. *Infect. Immun.* 28: 824-831, 1980.
- CLINTON, B.A.; ORTIZ-ORTIZ, L.; GARCIA, W.; MARTINEZ, T. & CAPIN, R. *Trypanosoma cruzi*: Early immune responses in infected mice. *Exp. Parasitol.* 37: 417-425, 1975.
- CORSINI, A.C.; CLAYTON, C.; ASKONAS, B.A. & OGILVIE, B.M. Suppressor cells and loss of B-cell potential in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *Clin. Exp. Immunol.* 29: 122-131, 1977.
- CORSINI, A.C.; BELLUCCI, S.B. & COSTA, M.G. A simple method of evaluating delayed type hypersensitivity in mice. *J. Immunol. Methods.* 30: 195-200, 1979.

- CORSINI, A.C.; OLIVEIRA, O.L.P. & COSTA, M.G. Humoral suppression in *Trypanosoma cruzi* infection in relation to the timing of antigen presentation. *Z. Parasitenkd.* 64: 85-95, 1980a.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I. J.B. & STELINI, A. Susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 22(4): 192-196, 1980b.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I. J.B. & RANGEL, H.A. A fraction (FAd) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. *Immunol.* 40: 505-511, 1980c.
- CORSINI, A.C.; OLIVEIRA, O.L.P. & COSTA, M.G. Unimpaired delayed type hypersensitivity reactions in mice infected with *Trypanosoma cruzi* strain Y. *Z. Parasitenkd.* 61: 179-185, 1980d.
- CORSINI, A.C. The immune response in animals with experimental trypanosomiasis. *Afr. J. Clin. Exp. Immunol.*, in press.
- CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). I - Evidences of polyclonal B cell activation in experimental infections mimicked by an extract prepared from circulating trypomastigotes. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 23(3): 114-121, 1981a.

- CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. Immunosuppression in mice infected with *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909) II - Trypomastigote Crude Extract (TCE) suppress the humoral immune response in mice. *Rev. Inst. Med. trop. São Paulo* 23(3): 122-123, 1981b.
- CORSINI, A.C.; VILELA, M.M.S. & PIEDRABUENA, A.E. Chronic Chagas' Disease: Unimpaired delayed type hypersensitivity reactions in contrast with humoral suppression to typhoid vaccine. *Tropenmed. Parasit.* 32: 82-86, 1981.
- COUTINHO, A.; MÖLLER, G. Thymus independent B cell induction and paralysis. *Adv. Immunol.* 21: 113-236, 1975.
- CUNNINGHAM, D.S.; KUHN, R.E. & ROWLAND, E.C. Suppression of humoral responses during *Trypanosoma cruzi* infections in mice. *Infect. Immun.* 22: 155-160, 1978.
- CUNNINGHAM, D.S.; BENAVIDES, G.R. & KUHN, R.E. Differences in the regulation of humoral responses between mice infected with *Trypanosoma cruzi* and mice administered *T. cruzi* - induced suppressor substance. *J. Immunol.* 125: 2317-2321, 1980.
- DIAMANTSTEIN, T.; KEPPLER, W. & BLITSTEIN-WILLINGER, E. Suppression of the primary immune response in vivo to sheep red blood cells by B-cell mitogens. *Immunol.* 30: 401-407, 1976.

- DIAS, E. Estudos sobre o *Schizotrypanum cruzi*. Mem. Inst. Oswaldo Cruz, 28: 1-110, 1934.
- DIAS, J.C.P. & DIAS, R.B. Aspectos Sociais da Doença de Chagas. In: *Pesquisa Básica em Doença de Chagas*. Ca-xambú - Minas Gerais, 1978. p. 16-26. Resumos.
- DRESSER, D.W. Assays for immunoglobulin-secreting cells. In: WEIR, D.M., ed. *Handbook of experimental immunology*. Oxford Blackwell Scientific Publications, 1978. p. 28.1-28.25.
- DUTTON, R.W. Separate signals for the initiation of proliferation and differentiation in the B cell response to antigen. *Transplant. Rev.*, 23: 66, 1975.
- EARDLEY, D.D. & JAYAWARDENA, A.N. Suppressor cells in mice infected with *Trypanosoma brucei*. *J. Immunol.*, 119: 1029-1033, 1977.
- ESUROSÓ, G.O. The demonstration in vitro of the mitogenic effects of trypanosomal antigen on the spleen cells of normal, athymic and cyclophosphamide-treated mice. *Clin. Exp. Immunol.*, 23: 314-317, 1976.
- FAUVE, R.M. Inflammation and natural immunity. In: FOU-GEREAU & DAUSSET. *Immunology 80 Progress in Immunology IV*. London, Academic Press, 1980. p. 737.

- FERNANDES, J.F. & CASTELLANI, O. Growth characteristics and chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.*, 18: 195-202, 1966.
- GOBLE, F.C. South American Trypanosomiasis. JACKSON, G. J.; HERMAN, R. & SINGER, J. In: *Immunity to Parasitic Animals*. New York, Appleton. 2: 597-689, 1970.
- GREENWOOD, B.M. Immunosuppression in malaria and trypanosomiasis. In: *Symposium on Parasites in the Immunized Host: Mechanisms of Survival*, held at the Ciba Foundation, London, 1973. Amsterdam, Elsevier, 1974. p.137-146.
- HUDSON, K.M.; BYNER, C.; FREEMAN, J. & TERRY, R.J. Immunodepression, high IgM levels and evasion of the immune response in murine trypanosomiasis. *Nature*, 264: 256-258, 1976.
- JAYAWARDENA, A.N. & WAKSMAN, B.H. Suppressor cells in experimental trypanosomiasis. *Nature*, 265: 539-541, 1977.
- JAYAWARDENA, A.N.; WAKSMAN, B.H.; EARDLEY, D.D. Activation of distinct helper and suppressor T cells in experimental trypanosomiasis. *J. Immunol.*, 121: 622-628, 1978.
- JERNE, N.K. Towards a network theory of the immune system. *Ann. Immunol. (Inst. Pasteur)*, 125C: 373-389, 1974.

- KATZ, D.H. Specificity of T cells mediating delayed-type hypersensitivity. In: _____ *Lymphocyte differentiation, recognition, and regulation*. New York, Academic Press, 1977. p. 210-214.
- KEMSHEAD, J.T.; NORTH, J.R. & ASKONAS, B.A. IgG anti-hapten antibody secretion in vitro commences after extensive precursor proliferation. *Immunol.*, 33: 485-490, 1977.
- KIERSZENBAUM, F.; HAYES, M.M. & BUDZKO, D.B. Role of lymphocytes and the immune response in transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. PREUD'HOMME, J.L. & HAWKEN, V.A.L., ed. *International Congress of immunology of the international union of Immunological societies (IUIS)*, 4., Paris, 1980. 12.3.16. Abstracts.
- KLAUS, G.G.B. & HUMPHREY, J.H. The immunological properties of haptens coupled to thymus-independent carrier molecules. I. The characteristics of the immune response to dinitrophenyl-lysine-substituted pneumococcal polysaccharide (SIII) and levan. *Eur. J. Immunol.*, 4: 370-377, 1974.
- KOBAYAKAWA, T.; LOUIS, J.; IZUI, S. & LAMBERT P. H. Autoimmune response to DNA, red blood cells and thymocyte antigens in association with polyclonal antibody synthesis during experimental African trypanosomiasis. *J. Immunol.*, 122: 296-301, 1979.

- KÜBERLE, F. Patogenia da moléstia de Chagas. In: CANÇADO, J.R. ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Brasil, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p. 238-260.
- LAMBERT, P.H. & HOUBA, V. Immune complexes in parasitic diseases. In: BRENT & HOLBOROW (1974) *Progress in Immunology II*. Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1974. Vol. 5. p. 57.
- LIMA PEREIRA, F.E. Observações sobre a imunodepressão durante a fase aguda da infecção do camundongo albino pelo *Trypanosoma cruzi*. Tese de doutorado apresentada na Universidade Federal de Minas Gerais, 1978.
- MACEDO, V. Forma indeterminada da Doença de Chagas. *J. Bras. de Medicina*, 38: 34, 1980.
- MANSFIELD, J.M. & BAGASRA, O. Lymphocyte function in experimental African Trypanosomiasis I. B cell responses to helper T cell-independent and -dependent antigens. *J. Immunol.*, 120: 759-765, 1978.
- MANSFIELD, J.M.; CRAIG, S.A. & STELZER, G.T. Lymphocyte function in experimental African Trypanosomiasis: Mitogenic effects of trypanosome extracts in vitro. *Infect. Immun.*, 14: 976-981, 1976.
- MAYOR-WITHEY, K.S.; CLAYTON, C.E.; ROELANDS, G.E. & ASKONAS, B.A. Trypanosomiasis leads to extensive proliferation

- of B- and T- and null cell in spleen and bone marrow.
Clin. Exp. Immunol., 34: 359-363, 1978.
- MITCHELL, G.M. Responses to infection with Metazoan and Protozoan parasites in mice. *Adv. Immunol.*, 28: 451-511, 1979.
- MITCHELL, G.F. T cell dependent effects in parasitic infection and disease. In: FOUGEREAU & DAUSSET (1980) *Immunology 80. Progress in Immunology IV.* London, Academic Press, 1980. p. 794.
- MURRAY, M. The pathology of African trypanosomiasis. In: BRENT & HOLBOROW (1974) *Progress in Immunology II.* Amsterdam, North Holland Publishing Company, 1974. Vol.4. p. 181.
- MURRAY, P.K.; JENNINGS, F.W.; MURRAY, M. & URQUHART, G. M. The nature of immunosuppression in *Trypanosoma brucei* infections in mice. I. The role of the macrophage. *Immunol.*, 27: 815-824, 1974a.
- MURRAY, P.K.; JENNINGS, F.W.; MURRAY, M. & URQUHART, G. M. The nature of immunosuppression in *Trypanosoma brucei* infections in mice. II. The role of T and B lymphocytes. *Immunol.*, 27: 825-840, 1974b.
- NAGLE, R.B.; WARD, P.A.; LINDSLEY, H.B.; SADUN, E. H.; JOHNSON, A.J.; BERKAW, R.E. & HILDEBRAND, P.K. Expe-

rimental infections with African trypanosomes. VI - Glomerulonephritis involving the alternate pathway of complement activation. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, 23: 15-26, 1974.

NOSSAL, G.J.V. & ADA, G.L. Behavior patterns of lymphoid cells. In: _____ *Antigens, lymphoid cells and the immune response*. New York, Academic Press, 1971, p. 85-106.

ORTIZ-ORTIZ, L.; PARKES, D.E.; RODRIGUES, M. & WEIGLE, W.O. Polyclonal B lymphocyte activation during *Trypanosoma cruzi* infection. *J. Immunol.*, 124: 121-124, 1980.

PEARSON, T.W.; ROELANDS, G.E.; LUNDIN, L.B. & MAYOR-WITHEY, K.S. Immune depression in trypanosome-infected mice. I. Depressed T lymphocyte responses. *Eur. J. Immunol.*, 8: 723-727, 1978.

PEARSON, T.W.; ROELANDS, G.E.; PINDER, M.; LUNDIN, L.B. & MAYOR-WITHEY, K.S. Immune depression in trypanosome-infected mice. III. Suppressor cells. *Eur. J. Immunol.*, 9: 200-204, 1979.

PEREIRA MENDES, R.; TAKEHARA, H.A. & MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: Homocytotropic antibody response in mice immunized with unrelated antigens. *Exp. Parasitol.*, 48: 345-351, 1979.

- PEREIRA DA SILVA, L.H. & NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cepa de *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol.* São Paulo, 20: 191-201, 1953.
- PRATA, A. Formas Clínicas da Doença de Chagas. In: CANÇADO, J.R. ed. *Doença de Chagas*. Belo Horizonte, Brasil, Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais, 1968. p. 344-358.
- RAMOS, C.; LAMOYI, E.; FEOLI, M.; RODRIGUEZ, M.; PEREZ, M. & ORTIZ-ORTIZ, L. *Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed responses to different antigens in the infected mouse. *Exp. Parasitol.*, 45: 190-199, 1978.
- RAMOS, C.; SCHADLER-SIWON, I. & ORTIZ-ORTIZ, L. Suppressor cells present in the spleens of *Trypanosoma cruzi* infected mice. *J. Immunol.*, 122: 1243-1247, 1979.
- REED, S.G.; LARSON, C.L. & SPEER, C.A. Suppression of cell-mediated immunity in experimental Chagas' disease. *Z. Parasitenkd.*, 52: 11-17, 1977.
- ROELANDS, G.E.; PEARSON, T.W.; MAYOR-WITHEY, K.S. & LUNDIN, L.B. Immune depression in trypanosomie-infected mice II. Characterization of the spleen cell types involved. *Eur. J. Immunol.*, 9: 195-199, 1979.

- ROWLAND, E.C. & KUHN, R.E. Suppression of cellular responses in mice during *Trypanosoma cruzi* infections. *Infect. Immun.*, 20: 393-397, 1978.
- SACKS, D.L. & ASKONAS, B.A. Trypanosome-induced suppression of anti-parasite responses during experimental African trypanosomiasis. *Eur. J. Immunol.*, 10: 971-974, 1980.
- SACKS, D.L.; MURRAY, S.; OGILVIE, B.M. & ASKONAS, B. A. Intrinsic immunosuppressive activity of different trypanosome strains varies with parasite virulence. *Nature*, 283: 476-478, 1980.
- SELKIRK, M.E.; SACKS, D.L.; OGILVIE, B.M.; ASKONAS, B.A. & PLATTS-MILLS, T.A.E. Mitogenic activity of a trypanosome-derived membrane fraction. PREUD'HOMME, J.L. & HAWKEN, V.A.L., ed. *International Congress of immunology of the international union of Immunological societies (IUIS)*, 4., Paris, 1980. 12.3.20. *Abstracts*.
- TALIAFERRO, W.H. & PIZZI, T. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. *J. Infect. Dis.*, 96: 199-226, 1955.
- TAMASHIRO, W.M.S.C. Isolamento e caracterização parcial de uma fração antigênica da superfície do *Trypanosoma cruzi* (Chagas, 1909). Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1980.

- TERRY, R.J.; FAGHIHI SHIRAZI, M. & HUDSON, K.M. Autoantibodies in experimental trypanosomiasis. PREUD'HOMME, J.L.; HAWKEN, V.A.L., ed. *International Congress of immunology of the international union of Immunological societies* (IUIS), 4., Paris, 1980. 12.3.23. *Abstracts*.
- TILL., J.E. & McCULLOGH, E.A. A direct measurement of the radiation sensitivity of normal mouse bone marrow cells. *Radiat. Res.*, 14: 213-222, 1961.
- UNANUE, E. The regulation of lymphocyte functions by macrophages. *Immunol. Rev.*, 40: 227, 1978.
- VADAS, M.S.; MILLER, J.F.A.P.; GAMBLE, J. & WHITELOW, A. A radioisotopic method to measure delayed-type hypersensitivity in the mouse. I. Studies in sensitized and normal mice. *Int. Archs. Allergy appl. Immunol.*, 49: 670-692, 1975.
- VILELA, M.M.S. Estudo Imunológico da Doença de Chagas Crônica. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, 1980.
- WEICHSELBAUN, T.E. An accurate and rapid method for the determination of protein in small amount of blood serum and plasma. *Am. J. Cli. Path.*, 10: 40, 1946.
- WILLIAMSON, A.R. & ASKONAS, B.A. Senescence of an Antibody-forming Cell Clone. *Nature*, 238: 337-339, 1972.

- WILSON, R.J.M. Soluble antigens as blocking antigens.
In: Symposium on parasites in the Immunized Host: Mechanisms of Survival, held at the Ciba Foundation, London, 1973. Amsterdam, Elsevier, 1974. p. 185-203.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Immunologia y enfermedades parasitarias. Informes de um Comitê de Expertos de 1ª OMS.* Genebra. (Séries de Informes Técnicos nº 315), 1965.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Memoranda. Immunology of Chagas' Disease. *Bulletin of the World Health Organization.* 50(5): 459-472, 1974.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Report of meeting of the task force on chemotherapy of African Trypanosomiasis.* TDR/WP/76-12. Genebra. 1975. p. 1-33.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *Report of the first meeting of the scientific working group on Chagas' Disease.* TDR/CHA-SWG(1)/77.3. Buenos Aires, Argentina, 1977. p. 1-45.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. *The membrane pathobiology of Tropical Diseases.* Chapter V - UNDP/World Bank/WHO. Basel, Schwabe, 1979.
- ZAUDERER, M. & ASKONAS, B.A. Several proliferative phases precede maturation of IgG-secreting cells in mitogen-stimulated cultures. *Nature*, 260: 611-613, 1976.