



CÉLIA APARECIDA ALMEIDA CHAVES GARCIA

**ESTUDO DA FRAÇÃO ANTIGÊNICA DE Trypanosoma
cruzi (FAd) NA REGULAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS
EXPERIMENTAL.**

CAMPINAS
1994

6	G165e	24604/BC	xemplar corresponde à redação final se defendida pelo (a) candidato (a) <i>Célia Aparecida Almeida</i>	<i>Célia Garcia</i>	e aprovada pela Comissão Julgadora.	<i>18/10/94</i>

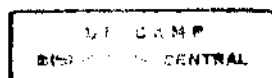
CÉLIA APARECIDA ALMEIDA CHAVES GARCIA

**ESTUDO DA FRAÇÃO ANTIGÊNICA DE *Trypanosoma cruzi*
(FAd) NA REGULAÇÃO DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL.**

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP -
para obtenção do grau de MESTRE, em Ciências
Biológicas na área de Imunologia.

ORIENTADORA: Profa.Dra. *LEONILDA MARIA BARBOSA SANTOS*

Departamento de Microbiologia e Imunologia - Instituto de Biologia -
Universidade Estadual de Campinas - UNICAMP.
CAMPINAS - SÃO PAULO



Dedico este trabalho

Aos meus pais, Sebastião e Olívia,
com carinho e gratidão, por terem me estimulado ao estudo e pelos ensinamentos de
humildade e perseverança.

Aos meus irmãos: Celso, Célio e Alfeu,
pela amizade e apoio constantes.

Ao David, meu esposo,
com muito amor e gratidão, pela imensa compreensão e constante incentivo.

À Profa. Leonilda, a Leo,
pela orientação pautada no apoio e amizade.

"Um dos momentos mais gratificantes da vida ocorre naquela fração de segundo em que aquilo que nos é familiar assume, de repente, a aura estonteante do que é profundamente novo... Esses instantes de iluminação são demasiadamente infrequentes, mais incomuns do que comuns; a maior parte do tempo, permanecemos imersos no que é mundano e trivial. Aí vem a surpresa: o que parece mundano e trivial é a própria essência das descobertas. A única diferença é a nossa perspectiva, nossa disposição de colocar as peças de maneira diferente e ver configurações onde, um momento antes, víamos somente sombras".

EDWARD B. LINDMAN

ÍNDICE

1-	INTRODUÇÃO.....	1
2-	OBJETIVOS.....	11
3-	MATERIAIS E MÉTODOS.....	13
3.1-	Animais.....	14
3.2-	Reagentes.....	14
3.3-	Parasitas.....	14
3.4-	Infecção com <i>T.cruzi</i>	14
3.5-	Obtenção da fração antigênica de <i>T.cruzi</i> (FAd).....	15
3.6-	Administração da fração FAd.....	15
3.7-	Administração de anticorpo anti-IFN- γ	16
3.8-	Obtenção de células mononucleares esplênicas.....	16
3.9-	Cultura de células esplênicas.....	16
3.10-	Produção de citocinas.....	17
3.11-	Elisa de captura.....	17
3.12-	Testes estatísticos.....	18
4-	RESULTADOS.....	19
4.1-	Sobrevida de animais CBA/J após a administração (i.v.) de FAd e infecção com 10^5 formas de <i>T.cruzi</i>	20
4.2-	Efeito da FAd na resposta linfoproliferativa.....	20
4.3-	Efeito da administração "in vivo" da FAd na resposta linfoproliferativa à Con-A.....	21
4.4-	Níveis de TGF- β no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais, estimuladas ou não pela Con-A.....	22
4.5-	Quantificação dos níveis de TGF- β no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" a fração FAd.....	23

4.6-	Quantificação dos níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de linfócitos esplênicos normais estimulados por Con-A, na presença da fração FAd.....	24
4.7-	Quantificação dos níveis de IFN- γ no sobrenadante de células esplênicas de animais que receberam "in vivo" a fração FAd.....	24
4.8-	Efeito da administração de anticorpo anti-IFN- γ a camundongos CBA/J protegidos com FAd.....	25
5-	DISCUSSÃO.....	34
6-	CONCLUSÕES.....	46
7-	APÊNDICE.....	48
8-	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	58

ABREVIACÕES

BSA -	Soroalbumina bovina
Con A -	Concanavalina A
FAd -	Fração antigênica derivada da forma epimastigota de <i>T.cruzi</i>
IFN - γ -	Interferon-gama
IL-2 -	Interleucina 2
IL- 4-	Interleucina 4
IL-5-	Interleucina 5
IL-10-	Interleucina 10
PBS -	Salina tamponada fosfatada
TGF β -	Fator transformador de proliferação β

1-INTRODUÇÃO

As interações entre parasitas protozoários e o sistema imune de seus hospedeiros são variadas e complexas, representando, quase sempre, grande desafio no que diz respeito ao estudo das mesmas. Os parasitas são antigenicamente complexos e a maioria tem ciclos de vida complicados, nos quais os vários estágios de desenvolvimento, frequentemente ocupando diferentes sítios, diferem antigenicamente um do outro. Somado a isso, os parasitas, embora capazes de elicitar resposta imunológica, têm desenvolvido numerosos mecanismos para evadir às consequências do ataque imune (COX & LIEW, 1.992).

Os hospedeiros vertebrados servem-se de variados mecanismos imunes efetores para protegerem-se contra a invasão de parasitas. Incluem-se entre eles, a ação dos anticorpos, o processo de fagocitose, a ativação de células "natural killer" (NK), linfócitos T citotóxicos (CTLs), ativação de neutrófilos, macrófagos, entre outros (FINKELMAN & URBAN, 1.992). Os mecanismos efetores imunes selecionados são, em geral, especificamente condizentes com o parasita. Visto que parasitas variam muito em tamanho, fisiologia, localização dentro do hospedeiro, e capacidade para neutralizar o potencial de defesas do hospedeiro, os mecanismos que podem proteger contra um grupo de parasitas, podem ser de pouco valor protetor contra um grupo diferente. Desde que diferentes mecanismos efetores podem ser mutuamente antagonistas, podendo ser prejudiciais tanto ao hospedeiro como ao parasita, é de considerável benefício para o hospedeiro a capacidade de selecionar um grupo particular de mecanismos em resposta à infecção por um determinado parasita.

Linfócitos T desempenham papel central na regulação da resposta imune, modulando, virtualmente, todos os seus aspectos. Os linfócitos T são células que se originam de precursores da medula óssea e são dependentes do timo para que sua maturação ocorra. Apresentam grande heterogeneidade de funções e especificidade antigênica. As células T auxiliam células B, outras células T, macrófagos, células citotóxicas naturais, entre outras, através de interações celulares diretas e através da secreção de

linfocinas. Os linfócitos T com estas funções são chamados linfócitos T auxiliares e expressam na sua superfície a molécula CD4. Algumas células T são também capazes de matar outras células que expressam antígenos não próprios e são denominadas de células T citotóxicas. A maioria das células T citotóxicas expressam a molécula CD8 na sua superfície. A expressão de moléculas CD4 ou CD8 está geralmente correlacionada com a especificidade do receptor da célula T. Células T CD4⁺ reconhecem antígenos em associação com proteínas classe II do complexo principal de histocompatibilidade (MHC), enquanto que células T CD8⁺ reconhecem antígenos em associação com proteínas de classe I do MHC.

Nos últimos anos, o conhecimento da imunologia e imunopatologia das doenças infecciosas tem sido revolucionado pelo papel das citocinas no desenvolvimento da resposta imune. Citocinas são mensageiros peptídicos produzidos e reconhecidos pelas células do sistema imune, controlando muitos aspectos da resposta imunológica em uma complexa rede de interações. Devido à disponibilidade de técnicas celulares e moleculares, têm sido possíveis estudos mais precisos das funções das citocinas. Através de técnicas de clonagem gênica, tem sido permitida a identificação de várias delas, sua produção em formas recombinantes, e o uso de anticorpos monoclonais para inibir a ação de citocinas selecionadas.

Estudos relativamente recentes mostraram que os linfócitos CD4 de murinos, poderiam ser divididos em dois subgrupos, baseados no repertório de citocinas produzido. As citocinas utilizadas para diferenciar essas populações foram IL-2 e IFN- γ , produzidas por células designadas Th1, e IL-4 e IL-5, produzidas pelo subgrupo designado Th2 (MOSMANN et al., 1986). A heterogeneidade das populações de linfócitos CD4⁺, com relação ao perfil de citocina liberado, explicaria a função auxiliar tanto para a síntese de anticorpo como para as reações de hipersensibilidade. Assim, as subpopulações Th1 produzem IL-2 e IFN- γ , estando envolvidas na função auxiliar das reações de hipersensibilidade, enquanto as subpopulações de Th2 produzem IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, participando na função auxiliar da produção de anticorpos.

Vários estudos demonstraram a importância das subpopulações Th1, produtoras de IL-2, IFN- γ e fator de necrose tumoral (TNF) no controle de

parasitas intracelulares (LIEW et al., 1.990; LEIST et al. 1.989; KARUPIAH et al.,1.991; LOCKSLEY & SCOTT, 1.991).

O entendimento da resposta protetora das subpopulações Th1 no caso dos parasitas intracelulares, se deve principalmente a uma série de estudos realizados em animais infectados com *Leishmania major*. Neste modelo foi demonstrada a importante participação do IFN- γ na indução de imunidade protetora (SHER & COFFMAN,1.992). Interferon- γ é uma glicoproteína homodímera contendo subunidades de aproximadamente 21 a 24 KD, sendo produzida tanto por células T CD4⁺, como por CD8 (KHAN et al.,1.994) e células NK (TEIXEIRA & KAUFMANN, 1.994; DENKERS et al., 1.993). A resposta protetora observada com a ativação da subpopulação Th1 é mediada, principalmente pela capacidade do IFN- γ ativar o sistema monocítico-fagocitário.

A administração de IFN- γ a camundongos infectados com *L.major* induz macrófagos a gerarem nitritos que controlam a infecção das formas amastigotas. Reforçando a atuação do IFN- γ , uma única injeção de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ pôde reverter a resistência de camundongos susceptíveis, quando o mesmo foi administrado nas primeiras semanas de infecção. Tratamentos repetidos com o anticorpo durante o desenvolvimento e/ou recuperação da lesão, e não durante o início da resposta, são ineficazes (BELOSEVIC et al., 1.989). Quando camundongos C57Bl/6, que são resistentes, e que secretam predominantemente IFN- γ em resposta à infecção por *L.major*, receberam uma única dose de anticorpo anti-IFN- γ ao mesmo tempo da infecção, desenvolveram infecção disseminada. A administração de anticorpo anti-IFN- γ induziu a produção de IgE, sugerindo aumento de IL4 (SADICK et al. 1.990). O tratamento de camundongos C3H/HeN com anticorpo anti-IFN- γ demonstra os mesmos resultados (SCOTT, 1.991). Por outro lado, camundongos Balb/c, que são susceptíveis, e que predominantemente secretam IL-4 em resposta ao mesmo parasita, após a administração de uma única dose de anticorpo anti-IL-4, passam a secretar IFN- γ e controlar a infecção. Estas evidências sugerem que citocinas produzidas pelas subpopulações de linfócitos CD4 têm a propriedade de regular a proliferação, síntese e atividade biológica das citocinas produzidas pelas

populações opostas (MOSMANN & MOORE, 1.991). Assim, IFN- γ pode inibir a síntese de IL-4 e IL-4 por sua vez, inibe a síntese de IFN- γ .

A participação de IFN- γ como uma citocina protetora contra parasitas intracelulares, inclui protozoários como *Toxoplasma gondii* e *Trypanosoma cruzi* (SILVA et al., 1.991; GAZZINELLI et al., 1.991).

De particular interesse para nós, é o estudo da infecção de camundongos com *Trypanosoma cruzi* como modelo experimental para o estudo da Doença de Chagas. A Doença de Chagas constitui-se num grande problema de saúde pública em muitos países da América Latina. Infecção com esse parasita pode ser aguda ou crônica e frequentemente envolve o desenvolvimento de patologia progressiva em tecidos do coração, esôfago e cólon. *In vitro* e *in vivo*, os parasitas infectam uma variedade de células nucleadas, incluindo macrófagos (SILVA et al., 1.991).

Estudos experimentais demonstraram a importância das citocinas produzidas pelas subpopulações Th2, como IL-3, IL-4 e IL-5 na ativação de mastócitos e indução de imunoglobulina E (IgE) e respostas de eosinófilos (COFFMAN et al., 1.988, FINKELMAN & URBAN 1.992), estando associadas com resposta imune a parasitas nematódeos. Com exceção da IL-3, que é produzida pelos dois grupos de células T CD4⁺, as citocinas que estão frequentemente associadas com respostas a parasitas extravasculares e multicelulares, são produzidas por células Th2, mas não por Th1. Trabalhos realizados com o nemátodo *Heligmosomoides polygyrus* mostraram que uma dose de anti-IL-4 bloqueia a capacidade dos camundongos de resistirem à propagação dos parasitas. Reforçando estas observações os autores demonstraram que a administração de IFN γ e IFN- α exacerba a infecção com *H. polygyrus* ou com outro nemátodo *Nippostrongylus brasilienses* (FINKELMAN & URBAN, 1.992; URBAN et al. 1.993). Evidência genética para a ação das citocinas também foi previamente demonstrada. Camundongos Balb/k que apresentam predominantemente resposta do tipo Th2 resistem e expõem o parasita *Trichuris muris*. Por outro lado, os camundongos B10BR que apresentam resposta Th1 quando infectados pelo mesmo parasita, não são capazes de controlar a infecção. Há ainda evidências da participação das citocinas produzidas pela subpopulação Th2 na imunidade

protetora em camundongos infectados por *Strongyloides venezuelensis* (KORENAGA et al., 1.991).

Até o momento, pelo menos três citocinas com moléculas quimicamente bem definidas, foram descritas pela capacidade de inibir função de outras citocinas. São elas as IL-4, IL-10 e TGF- β (NACY, 1.984; SRIMAL & NATHAN, 1.990; BOGDAN et al. 1.991).

Tanto IL-4 como IL-10 são produzidas seletivamente por células CD4⁺ , pertencendo ao subgrupo Th2, entretanto, essas citocinas podem ser produzidas por uma variedade de outros tipos celulares (SHER et al. ,1.992). IL-4 estimula a geração de efetores Th2 (SWAIN et al., 1.991; LE GROS et al., 1.990), enquanto inibe o desenvolvimento de células expressando IL-2 e/ou IFN- γ (SWAIN et al.,1.991). No caso da IL-10 , além de suprimir a expressão de IL-2 e IFN- γ pelas células Th1 e células CD8⁺ (MOSMANN et al.,1.991; MOSMANN & MOORE,1.991), influencia a atividade acessória de macrófagos (FIORENTINO et al.,1.991), inibindo a produção de TNF-alfa , o que resulta em supressão da atividade NK (SHER et al.,1.992).

TGF- β é uma citocina que, entre outras funções, está associada com a regulação da resposta imune, não se enquadrando como produto de linfócitos Th1 ou Th2. Essa proteína de 25 KD é produzida por muitas células, incluindo B, T, e macrófagos ativados (KEHRL et al.,1.986; ASSOIAN et al.,1.987). É secretada na forma biologicamente inativa ou latente, devido à associação não covalente com uma proteína associada à latência (LAP). Alguns procedimentos como tratamento com enzimas proteolíticas ou acidificação transiente do meio, podem ativar a molécula latente e liberar a TGF- β na forma ativa (MIYAZONO et al. 1.993). Em termos de quantificação em ensaios imunoenzimáticos, ficou demonstrado que apenas a forma ativa do TGF- β tem capacidade de se ligar aos anticorpos (LUCAS et al. 1.990). TGF- β consiste da família de citocinas, cujas sequências de aminoácidos são muito bem conservadas filogeneticamente (FLANDERS et al.1.988, DANIELPOUR et al. 1.989), permitindo o emprego de anticorpos de diferentes espécies nos ensaios imunoenzimáticos. Essa citocina tem sido implicada como mediadora de imunossupressão, inibindo a indução de receptor de IL-2 (KEHRL et al., 1.986), a proliferação de timócitos induzida por IL-1 (WAHL et al.,1.988),

diferenciação e proliferação de células B (KEHRL et al. 1.986), expressão de antígeno classe II induzida por IFN- γ (CZARNIECKI et al., 1.988), geração de linfócito citotóxico, e células "killer" ativadas por citocinas (MULE et al. 1.988).

Devido a estas propriedades reguladoras da resposta imune, citocinas como TGF- β e IL-10 podem induzir efeitos dramáticos na resistência à infecção *in vivo* por parasitas intracelulares. Novamente, estudos conduzidos nos modelos de *Leishmania* têm sido de extrema utilidade no esclarecimento da participação de TGF- β neste modelo de infecção parasitária. Na Leishmaniose, observou-se que TGF- β é potente inibidor da atividade leishmanicida por macrófagos ativados por IFN- γ (NELSON et al. 1991, BARRAL-NETO et al. 1992). Injeções locais de TGF- β aumentam a susceptibilidade à infecção com parasitas normalmente avirulentos, assim como com formas virulentas, em camundongos geneticamente resistentes . Injeções de anti-TGF- β em camundongos Balb/c, que são susceptíveis, com posterior infecção, inibem o desenvolvimento de lesões (BARRAL-NETO et al. 1992). Nestes modelos com *Leishmania* foi demonstrado que a infecção com o parasita influencia a produção de TGF- β pelos macrófagos. Macrófagos peritoneais de animais infectados com *L. amazonensis* produzem TGF- β ativo detectável cerca de 72 horas após infecção. O mesmo foi observado para células mononucleares humanas (BARRAL-NETO e BARRAL, A., 1.994). Macrófagos infectados com a forma amastigota de *L. major* promove aumento de TGF- β cerca de cem vezes o nível basal (NACY et al. 1.991) . A produção de TGF- β também foi verificada em macrófagos infectados com *Mycobacterium avium* (BERMUDEZ, 1.993). TGF- β , na forma latente é produzida por macrófagos não infectados em cultura. A ativação de TGF- β ocorre com o tratamento dos macrófagos pelo IFN- γ (WAHL, 1.992). Recombinante de TGF- β foi adicionado a macrófagos peritoneais de murinos antes da infecção com *L. brasiliensis* . Progressivo aumento do número intracelular de formas amastigotas foi observado , enquanto no grupo controle o número de parasitas permaneceu constante (BARRAL et al., 1993). Somado a estas observações que falam a favor do aumento na produção de TGF- β por macrófagos de animais infectados *in vitro*, há a observação realizada *in vivo*, onde os autores demonstram aumento de produção de TGF- β nas patas de camundongos inoculados com *Leishmania* , avaliada por cortes histológicos, 24 horas após a infecção com *L. amazonensis* (BARRAL-NETO et al. 1992).

Níveis baixos de TGF- β endógeno parecem importantes para a sobrevivência dos parasitas, uma vez que a administração de anticorpos monoclonais anti- TGF- β leva à redução progressiva de amastigotas no interior de macrófagos (BARRAL et al. 1993).

Na infecção com *T.cruzi*, o TGF- β parece exercer efeito semelhante ao descrito no modelo de *Leishmania*. TGF- β administrado ao mesmo tempo da infecção, diminui a resistência, evidenciada pelo aumento da parasitemia e mortalidade, e também pela neutralização dos efeitos protetores da administração de IFN- γ (SILVA et al. 1991).

Diante do exposto, pode-se entender que a produção seletiva de determinadas citocinas pelo hospedeiro de parasitas intracelulares ou multicelulares pode tanto levar a mecanismos estimuladores como supressores da resposta imune, na dependência do subtipo celular estimulado pelo antígeno.

Os mecanismos pelos quais as populações celulares se diferenciam em Th1 ou Th2 nas infecções parasitárias, ainda não estão totalmente esclarecidos. Algumas evidências têm sugerido que a natureza e a forma como o antígeno é apresentado parecem ser fundamentais na seleção dos mecanismos efetores. A regulação da diferenciação das subpopulações de linfócitos T produtoras de diferentes padrões de citocinas depende das citocinas presentes no meio de cultura, durante o processo de desenvolvimento. Assim, células Th1 são preferencialmente obtidas quando células CD4 são clonadas na presença de IFN- γ (GAJEWSKI & FITCH, 1988). Por outro lado, a presença de IL-4 durante o desenvolvimento de células CD4 "in vitro" aumenta o desenvolvimento de células secretoras de IL-4 e IL-5, enquanto suprime a diferenciação de células produtoras de IL-2 e IFN- γ .

O tipo de célula apresentadora de antígeno (APC) também influencia a diferenciação do subtipo de linfócito CD4. Células apresentadoras de antígeno do fígado apresentam-no a células Th1 mas não a Th2 (MAGILAVY et al., 1989).

A natureza do antígeno influencia a diferenciação dos diferentes subtipos de linfócitos T CD4 . Recentemente, autores descreveram que enzimas proteolíticas produzidas por muitos parasitas multicelulares induzem preferencialmente a resposta de células Th2 (FINKELMAN & URBAN, 1992). Esta hipótese está baseada nas observações de que algumas proteases são potentes alérgenos, que podem induzir forte resposta Th2 (CHUA et al.,1988). No modelo de infecção com *L.major*, os autores demonstraram que os antígenos solúveis do parasita geravam clones com características de Th1 , com ação protetora e clones com características de Th2, com resposta não protetora. (SCOTT et al. 1988; MULLER & LOUIS, 1989).

Estas observações poderiam explicar porque determinadas frações antigênicas dos parasitas podem induzir imunidade protetora no hospedeiro. É importante notar que a indução de imunidade protetora em resposta a *T.cruzi* , claramente requer o efeito combinado de uma série de mecanismos além das células T CD4 e CD8; a produção de anticorpos líticos, e atividade das células N.K. têm papel de extrema importância.

A procura de determinantes antigênicos nos diferentes tipos de parasitas, e no *T.cruzi* de forma particular, com capacidade de induzir imunidade protetora, sendo portanto, candidatos a vacinas, tem motivado o trabalho de inúmeros pesquisadores. Estudos anteriores mostraram que diferentes subfrações antigênicas de *T.cruzi* podem induzir imunidade protetora. Desta forma, subfrações de *T.cruzi* com capacidade protetora foram descritas por SEGURA e col., 1976. TAIBI e col., 1993, demonstraram que antígenos solúveis liberados pelo parasita também poderiam levar à proteção. Entretanto, parecem ser os componentes da superfície do parasita que melhor induzem imunidade protetora (SCOTT e SNARY, 1979; SNARY, 1983). O estudo dos componentes da membrana dos parasitas assume importância biológica, uma vez que é através das estruturas de superfície que o parasita entra em contato com o sistema imune do hospedeiro.

Em trabalhos realizados em nosso laboratório, por CORSINI & COSTA (1981), foi demonstrado que um extrato preparado da forma circulante de *T.cruzi* , TCE (trypomastigote crude extract), suprimia a resposta humoral primária e secundária de camundongos Balb/c infectados .

Mostrando que uma mesma fração antigênica pode tanto estimular como suprimir a resposta imune, os mesmos autores mostraram que a fração TCE levava à ativação policlonal das células B . Os autores verificaram ainda, que outra fração de *T.cruzi* , FAd, obtida da forma epimastigota, suprimia tanto a resposta humoral como unidades formadoras de colônias, no baço de camundongos CBA/J. Assim sendo, foi proposto que esta fração antigênica interferia em algum estágio da divisão celular (CORSINI et al.,1.980). Dando continuidade a esta linha de pesquisa, TAMASHIRO e colaboradores (TAMASHIRO et al., 1.983), trabalhando com a fração FAd, analisaram suas propriedades físico-químicas, bem como suas características antigênicas e imunogênicas. A fração, obtida em condições padronizadas, continha proteínas, enzimas, glicoproteínas e polissacarídes. Os autores verificaram que, embora com baixos títulos, soros produzidos contra a fração FAd foram capazes de revelar a sua localização na superfície das formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do *T.cruzi*.

Diante do avanço no conhecimento da biologia das citocinas e seu envolvimento com a resposta imune do hospedeiro, favorecendo ou inibindo a ação dos parasitas, o presente estudo retoma as observações realizadas por Corsini e colaboradores com relação à fração antigênica de *T.cruzi* (fração FAd), estudando seu efeito no sistema imune do hospedeiro, no que diz respeito à produção de IFN- γ e TGF- β .

2-OBJETIVOS

No presente estudo tivemos como objetivos:

- 1 - Estudar as alterações que a fração antigênica de *T.cruzi* (FAd) induz no sistema imune do hospedeiro.
- 2 - Avaliar a resposta imune celular de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" a fração FAd, assim como o efeito da fração antigênica adicionada à cultura de linfócitos.
- 3 - Determinar os níveis de TGF- β nas situações onde a fração FAd foi administrada "in vivo" ou adicionada às culturas de linfócitos "in vitro".
- 4 - Determinar os níveis de IFN- γ em cultura de linfócitos quando FAd é adicionada "in vitro" ou administrada "in vivo".

3-MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 - Animais: Camundongos da linhagem CBA/J, fêmeas, de 8 a 12 semanas de idade, foram fornecidos pelo Centro de Bioterismo da UNICAMP. Estes animais foram mantidos durante a fase de experimentação no biotério do Departamento de Microbiologia e Imunologia, sob condições convencionais.

3.2 - Reagentes: Para a quantificação dos níveis de TGF- β os seguintes anticorpos foram utilizados: anticorpo policlonal anti-TGF- β humano, obtido em galinha (R&D, USA), anticorpo monoclonal anti-TGF- β bovino, obtido em camundongo (Genzyme, MA, USA), anti-IgG de camundongo marcado com biotina (Vector, lab. USA). Com relação às dosagens de IFN- γ , empregamos os seguintes anticorpos: anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de murinos obtidos em hamster (Genzyme, MA, USA) e anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de camundongos marcado com biotina (Pharmingen, CA, USA). Para a construção das curvas empregamos recombinante de IFN- γ de camundongos e TGF- β humano purificado (ambos obtidos da Genzyme, MA, USA). Avidina-peroxidase foi obtida da Sigma Chemical Co.

3.3 - Parasitas: Foi utilizada a cepa de *Trypanosoma cruzi* Y2 original, gentilmente cedida pela Profa. Dra Teresa Kipnis (USP). O estoque Y2Tc foi obtido, semeando-se parasitas da cepa Y2 original em cultura de células LLC-MK2 que foram repicadas dez vezes consecutivas. Em seguida, os tripomastigotas de cultura foram inoculados em camundongos CBA/J mantidos em isolador tipo Trexler. O estoque Y2Tc vem sendo mantido, por inoculação intraperitoneal (i.p.), em camundongos CBA/J através de passagens semanais de 10^5 formas tripomastigotas obtidas no pico parasitêmico.

3.4 - Infecção por *T. cruzi* : Camundongos CBA/J foram infectados por via i.p. com 10^5 formas obtidas no pico parasitêmico (7º dia após infecção), de camundongos da mesma linhagem infectados com 10^5 parasitas, através de

sangramento pelo plexo braquial, sendo este sangue coletado em solução estéril de citrato de sódio 3,8%. Os parasitas foram contados em câmara de Neubauer e as diluições finais realizadas em PBS.

3.5 - Obtenção da fração antigênica de *Trypanosoma cruzi* (FAd) : A fração FAd empregada nos experimentos foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada, e obtida segundo protocolo de CORSINI e colaboradores (1.980) com pequenas modificações. Brevemente, parasitas de 100 ml de cultura (aproximadamente 3×10^9 epimastigotas) foram lavados três vezes em solução gelada de NaCl 0,15 M, por centrifugação, a 1.400 g durante 15 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 10 ml de água destilada, imediatamente congelado e liofilizado. Alíquotas de 200 mg do material foram incubadas com 25 ml de solução de NaCl 0,15 M a 0°C por 10 minutos e a seguir, centrifugadas a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O sedimento foi ressuspensão em 10 ml de PBS pH 7.2 e incubado em banho-maria a 37°C por 1 hora, sendo centrifugado a 12.000 g por 30 minutos a 4°C. O sobrenadante, chamado FAd, foi mantido a -20°C em alíquotas de 1 ml. O conteúdo proteico foi avaliado pelo Folin-Ciocalteu, segundo indicações de LOWRY et al (1951).

3.6 -Administração da fração FAd: Vários protocolos de administração da fração FAd foram testados, sendo utilizados os seguintes: grupo de animais recebeu o total de 400 µg ou 600 µg de FAd, por via intravenosa (i.v.) sendo 100 µg a cada 2 dias, e a última dose administrada nas 3 horas anteriores à infecção com o parasita. Outro grupo de animais recebeu, 48 horas antes da infecção, a fração FAd na concentração de 800 µg/animal. Os animais controles receberam proteína BSA nas mesmas condições, ou foram infectados com 10^5 formas de *T.cruzi*, sem nenhum tratamento anterior.

3.7 - Administração de anticorpo anti-IFN- γ : Administrou-se anticorpo policlonal anti-IFN- γ (Calbiochem, CA, USA) a dois grupos experimentais. O primeiro grupo recebeu 7500 U de anticorpo neutralizante anti-IFN- γ , por via endovenosa, seguido da inoculação com 10^5 formas de *T.cruzi*. O segundo, paralelamente ao protocolo de indução de proteção, descrito no item anterior, recebeu a mesma dose do anticorpo anti-IFN- γ , 48 horas antes da infecção com 10^5 formas de *T.cruzi*.

3.8 - Obtenção de células mononucleares do baço dos animais: Baço de animais normais, ou sensibilizados com a fração FAd foram removidos assepticamente, 24 horas após a administração da FAd em diferentes concentrações, e colocados em placas de Petri estéreis, contendo meio RPMI. As células foram liberadas cuidadosamente utilizando-se pequenas peneiras, e posteriormente, as hemácias lisadas com solução de cloreto de amônio 0,82% e lavadas três vezes com meio de cultura (RPMI) estéril.

3.9 - Cultura de células esplênicas: Células esplênicas obtidas de acordo com o item anterior foram ajustadas para 2×10^5 células/poço, em placa de 96 poços, num volume total de 200 μ l de RPMI-1640 suplementado com 5% de soro bovino fetal (Microbiológica-RJ), penicilina (100 μ g), garamicina (5mg/ml), estreptomicina (100 U/ml), 25 mM de HEPES e 2-ME 1:100. O ensaio foi realizado em triplicata. Avaliou-se a transformação blástica de linfócitos estimulados pela Con-A, fração FAd e Con-A na presença de FAd em diferentes concentrações. As células foram incubadas 48 horas com o mitógeno e 96 horas com o antígeno em estufa contendo tensão constante de CO₂, a 37°C. Aproximadamente 18 horas antes do término do período de incubação ótima para os diferentes estímulos, 1 μ Ci de timidina tritiada (New England Nuclear MA, USA) foi adicionada a cada poço. Após este período, o excesso de material radioativo foi retirado, lavando-se as células em um coletor (Cell Harvester-modelo 200 A-Cambridge Technology, Inc.). As células livres de excesso radioativo foram depositadas em tiras de fibra de vidro (Cambridge

Tech., USA) e colocadas em tubos padronizados na presença de líquido de cintilação. O conteúdo radioativo foi determinado em cintilador beta (Beckman) . Os resultados estão expressos em contagem por minuto (cpm), sendo considerada a média das triplicatas.

3.10 - Produção das citocinas: Células do baço de animais foram obtidas de acordo com o item 3.8, ajustadas para 2×10^6 /ml e cultivadas em placas de cultura de 24 poços. Para a produção de TGF- β , as células foram cultivadas em meio livre de soro (meio SF- Gibco, USA) por 72 horas de acordo com protocolo já empregado anteriormente (3.9). O tempo ideal para produção de IFN- γ foi de 60 horas e 72 horas para TGF- β . Após o período de incubação, os sobrenadantes foram retirados e centrifugados a 1.200 rpm por 10 minutos, e os níveis de citocinas quantificados utilizando-se o método de ELISA de captura.

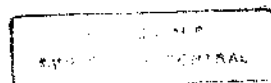
3.11 - ELISA de captura: Para determinar os níveis de TGF- β utilizamos o método de ELISA de captura, que foi desenvolvido baseado em métodos previamente descritos por LUCAS et al.(1.990).

Os sobrenadantes obtidos de acordo com o item anterior foram acidificados com HCl 1 N durante 10 minutos a temperatura ambiente, seguido de neutralização com NaOH 1 N. Após este tratamento, foram distribuídos nas microplacas devidamente cobertas com os anticorpos. A sensibilização foi obtida através da incubação de microplacas de ELISA (Immulon I NUNC, Roskilde , Dinamarca) com 1 μ g/ml de anticorpo policlonal anti-TGF- β humano, obtido em galinha (R& D,CA, USA) em tampão carbonato 0.05M pH 9.6. Após 18 horas de incubação a 4° C, as placas foram lavadas três vezes com PBS contendo 0.05% de Tween 20 e 0.01% de thimerosal. As reações inespecíficas foram bloqueadas com 200 μ l de BSA 3% em PBS, por 2 horas a temperatura ambiente. Para a construção da curva padrão, utilizamos TGF- β humano purificado (Genzyme, MA, USA). Os sobrenadantes e os padrões foram incubados por 18 horas a 4° C. Após este tempo, as microplacas foram lavadas três vezes com PBS e adicionado o anticorpo monoclonal anti-TGF- β bovino obtido em camundongo (Genzyme, MA, USA) diluído em PBS com 0.1% de BSA. TGF- β bovino conserva quase 100% de homologia com o humano e de

camundongo, justificando o emprego das citocinas de diferentes origens. As microplacas foram incubadas por 1 hora a temperatura ambiente e lavadas após este tempo. Adicionou-se então anticorpo anti-IgG de camundongo marcado com biotina (Vector lab., MA, USA), na diluição de 1:2000 e as placas foram novamente incubadas por 1 hora a temperatura ambiente. Novamente as placas foram lavadas e adicionou-se então avidina-peroxidase na concentração de 1:400 em PBS, e 10% de soro bovino fetal. Após 30 minutos de incubação o substrato constituído por 2,2 Azino-bis (3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid) (Sigma Co, USA) foi adicionado, e procedeu-se à leitura a 405 nm.

Para quantificação de IFN- γ , as microplacas da mesma procedência foram cobertas com 1 μ g/ml de anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de camundongo obtido em hamster (Genzyme, MA, USA), em tampão carbonato pH 9.6, por 18 horas. As placas foram lavadas e IFN- γ de camundongo recombinante (Genzyme, MA, USA) foi adicionado em diferentes concentrações para construção de curva padrão, assim como os sobrenadantes. As amostras foram incubadas por 18 horas a 4° C. As placas foram lavadas e adicionou-se anticorpo monoclonal anti-IFN- γ de camundongo marcado com biotina (Pharmingen, CA, USA). As placas foram incubadas pelo período de 1 hora em temperatura ambiente. Após este tempo, as microplacas foram lavadas e adicionou-se avidina-peroxidase seguido de substrato e leitura, como descrito para TGF- β .

3.12 - Testes estatísticos: Teste de Friedman: teste não paramétrico para mais de dois grupos relacionados (LEVIN, 1.987) utilizado para comparar o efeito das diferentes concentrações de FAd sobre a resposta linfoproliferativa e nos ensaios imunoenzimáticos. Nos casos em que resultou estatística significativa, o teste de Friedman foi complementado com os testes de Wilcoxon e Mann-Whitney, testes não paramétricos utilizados para comparar dois grupos de amostras relacionadas. O nível de significância foi de $\alpha=0.05$ para todos os testes empregados.



4-RESULTADOS

4.1 - Sobrevida de animais CBA/J após a administração i.v. de FAd e infecção com 10^5 formas de *T.cruzi*. Camundongos CBA/J receberam 400 μg /animal de FAd distribuídas em uma semana, sendo a última dose administrada 3 horas antes do inóculo de 10^5 formas do parasita. Com este protocolo, verificamos que 85% dos animais sobreviveram a, pelo menos, 30 dias após o inóculo do parasita (Figura 1).

A fração FAd na concentração de 800 μg /animal foi administrada 48 horas antes da infecção com *T.cruzi*. Observamos que o grupo de animais que recebeu esta dose da proteína FAd, apresentou 20% de sobrevida após o 10º dia de infecção, comparado a 80% de sobrevida dos animais que foram somente infectados com *T.cruzi*.

Os animais controles foram tratados com proteína BSA e não sobreviveram ao 12º dia após a infecção.

A sobrevida dos animais está indicada em termos de porcentagem.

4.2 - Efeito da FAd na resposta linfoproliferativa. A resposta de linfócitos utilizando Con-A como mitógeno é um método clássico de avaliação da resposta imune celular "in vitro". A seguinte série de experimentos foi conduzida no sentido de se estudar o efeito desta fração antigênica na resposta proliferativa de linfócitos T. Para tanto, a fração FAd foi adicionada à células esplênicas de camundongos CBA/J normais estimuladas por Con-A. A tabela I mostra que a fração FAd pode tanto inibir como potencializar o efeito mitogênico da Con-A, na dependência da dose empregada. Quando a fração antigênica de *T.cruzi* foi adicionada nas concentrações entre 1 e 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ observou-se aumento do efeito mitogênico da Con-A. O aumento da resposta proliferativa foi máximo quando foi adicionado 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da fração, sendo estes

valores estatisticamente significativos ($p < 0.01$). Nas concentrações superiores a $5 \mu\text{g/ml}$ observou-se que a resposta linfoproliferativa é gradativamente suprimida. Na concentração de $40 \mu\text{g/ml}$ observou-se 79% de supressão da resposta blastogênica, valor estatisticamente significativo ($p < 0.05$). Os resultados estão expressos em contagem por minuto, sendo os valores apresentados igual a delta cpm, ou seja, subtraiu-se previamente cpm dos poços que não foram estimulados com Con-A, sendo que estes valores variaram de 844 ± 200 a 1460 ± 340 cpm. A média foi colocada na tabela apenas para facilitar a análise, uma vez que não foi utilizada nos testes estatísticos, na medida em que este tipo de variável exige o emprego de métodos não paramétricos.

A supressão da resposta linfoproliferativa observada não se deve à ação citotóxica da fração antigênica. A viabilidade celular foi acompanhada pelo método de exclusão do Azul Trypan, sendo que acima de 80% dos linfócitos estavam viáveis após incubação com altas doses da fração FAd.

Como controle utilizamos BSA. Células do baço dos camundongos foram cultivadas na presença de BSA nas mesmas concentrações utilizadas para a fração FAd. Não se observou inibição ou potencialização do efeito mitogênico da Con-A. A figura 2 apresenta os resultados da média dos valores de contagem por minuto (cpm) das culturas realizadas tanto na presença de FAd como BSA.

A tabela II mostra um grupo de experimentos conduzidos no sentido de verificar se a fração FAd tinha efeito mitogênico. Células esplênicas de camundongos CBA/J normais foram estimuladas por diferentes concentrações de FAd por 96 horas. Não se observou atividade mitogênica em nenhuma das concentrações empregadas (fig.2).

4.3 - Efeito da administração "in vivo" da FAd na resposta linfoproliferativa à Con A. O seguinte grupo de experimentos foi realizado com o objetivo de avaliar a resposta proliferativa de linfócitos de camundongos CBA/J que receberam previamente "in vivo" diferentes concentrações da fração antigênica de *T.cruzi*. A tabela III mostra que a administração de FAd

"in vivo" pode levar tanto à inibição como à potencialização da resposta blastogênica à Con-A, dependendo da dose de antígeno empregada. Quando os animais receberam a fração FAd na concentração de 400 μg de acordo com protocolo já descrito, observou-se aumento da resposta proliferativa dos linfócitos à Con-A, em níveis estatisticamente significativos ($p < 0,05$). Em concentrações superiores a 400 μg /animal observou-se diminuição da resposta linfoproliferativa, sendo que, com 800 μg /animal, marcada supressão da resposta blastogênica foi observada (71% $p < 0,05$). Nos experimentos controles, administrou-se BSA nas mesmas concentrações que a fração FAd. Não observamos redução da resposta linfoproliferativa quando BSA foi administrada aos animais. Na figura 3 apresentamos a média dos seis experimentos realizados onde os animais receberam FAd ou BSA.

4.4 - Níveis de TGF- β no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais, estimulados ou não pela Con-A. A seguinte série de experimentos foi programada com o objetivo de verificar o efeito da fração FAd "in vitro" em relação à produção da TGF- β por células esplênicas de camundongos normais. A observação de que mitógenos inespecíficos podem estimular a produção de TGF- β foi previamente descrita (LUCAS et al.1990). Analisando os resultados apresentados nas tabelas IV e V verificamos discreto aumento da produção de TGF- β nas células estimuladas com Con-A, na ausência da fração FAd, que não chegou, contudo, a atingir valores significativos em termos de estatística. Quando as células foram cultivadas e estimuladas por Con-A, na presença de FAd, verificamos aumento dos níveis de TGF- β nas concentrações superiores a 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$. O aumento da produção de TGF- β foi mais consistente na situação em que as células foram estimuladas com Con-A na presença de 20 e 40 μg de FAd atingindo valores estatisticamente significativos ($p=0.01$) quando a concentração de 40 μg foi empregada, comparada ao grupo estimulado com Con-A na ausência de FAd.

Quando células normais foram cultivadas na presença de FAd observou-se discreto aumento da produção de TGF β na concentração de 40 $\mu\text{g}/\text{ml}$, estes valores atingiram níveis estatisticamente significativos ($p=0.05$) (Tabela V).

A figura 4 evidencia a média dos resultados dos grupos de experimentos realizados.

4.5 - Quantificação dos níveis de TGF- β no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" a fração FAd. Este grupo de experimentos foi conduzido no sentido de verificar alterações na produção de TGF- β , quando a fração FAd foi administrada "in vivo" a camundongos CBA/J normais. Os níveis de TGF- β foram quantificados quando as células obtidas dos animais que receberam diferentes concentrações de FAd, foram estimuladas "in vitro" por Con-A, fração FAd e na ausência de estímulo. Os resultados expressos nas tabelas VI e VIII mostram discreto aumento dos níveis de TGF- β por células estimuladas pela Con-A em grupo de animais que não receberam previamente a fração FAd. Estes valores, contudo, não são estatisticamente significativos ($p > 0.05$). Nos grupos de animais onde FAd foi administrada em concentrações superiores a 400 $\mu\text{g}/\text{animal}$, a produção de TGF- β foi significativamente maior, quando as células foram estimuladas por Con-A em comparação com o grupo de animais que não recebeu FAd "in vivo" e foram somente estimulados com Con-A (2.14×4.71 $p = 0.01$). Foi possível detectar discreto aumento da secreção de TGF- β no sobrenadante de linfócitos esplênicos sem estímulo (liberação espontânea), quando a fração FAd foi administrada nas concentrações de 600 e 800 $\mu\text{g}/\text{animal}$ (Tabela VIII). Estes valores no entanto, não são significativos, em termos de estatística ($p > 0.05$).

A tabela VII mostra que a estimulação das células esplênicas pela fração FAd "in vitro" não resultou em aumento da produção de TGF β , além dos níveis já observados para as células não estimuladas. O discreto aumento observado no grupo dos animais que receberam 800 μg de FAd "in vivo" e estimulados por 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de FAd "in vitro", não difere, em termos estatísticos, do grupo que recebeu a fração "in vivo" e não foram estimulados em cultura (liberação espontânea) ($p > 0.05$).

Na figura 5 estão representadas as médias dos resultados obtidos nos quatro grupos estudados.

4.6 - Quantificação dos níveis de IFN- γ no sobrenadante de cultura de linfócitos esplênicos normais estimulados por Con-A, na presença da fração FAd. Esta série de experimentos foi executada com o objetivo de verificar o efeito da fração FAd sobre a produção de IFN- γ por células normais. Células esplênicas foram cultivadas por 60 horas na presença de Con-A e diferentes concentrações da fração FAd. Cultivou-se também células apenas na presença de FAd. Analisando a tabela X verificou-se que células esplênicas de camundongos normais, cultivadas na presença da fração FAd, não produzem níveis significativos de IFN- γ em nenhuma das concentrações empregadas. Quando células normais foram estimuladas por Con-A na ausência da fração FAd, verificou-se aumento significativo dos níveis de IFN- γ ($p < 0.05$) comparado aos níveis de células normais cultivadas sem estímulo (0.86) expresso na tabela X. A adição da fração FAd às células normais estimuladas pela Con-A não modifica os níveis de IFN- γ até a concentração de 5 $\mu\text{g/ml}$. Concentrações superiores a 5 $\mu\text{g/ml}$ de FAd, no entanto, suprimem a produção de IFN- γ induzida pela estimulação com a Con-A.

A figura 6 mostra a média dos resultados obtidos nestes 4 grupos de experimentos realizados. A supressão observada a partir de 10 $\mu\text{g/ml}$ da fração FAd é significativa em termos estatísticos ($p < 0.05$).

4.7 - Quantificação dos níveis de IFN γ no sobrenadante de células esplênicas de animais que receberam "in vivo" a fração FAd. Esta série de experimentos foi conduzida no sentido de verificarmos o efeito da fração FAd sobre a produção de IFN- γ , quando a mesma foi administrada aos animais. Camundongos CBA/J receberam diferentes concentrações de FAd e 24 horas após a última dose, células esplênicas foram retiradas e IFN- γ quantificado nos sobrenadantes das células estimuladas por Con-A, fração FAd e na ausência de estímulo. Comparando-se os valores das tabelas XI e XIII verificou-se que a estimulação de linfócitos com Con-A leva a aumento da produção de IFN- γ , quando os animais não receberam a fração FAd "in vivo". Trata-se de observação clássica, ou seja, linfócitos ativados tanto por mitógenos inespecíficos como antígeno-específico, normalmente produzem níveis detectáveis de IFN- γ . No entanto, quando células derivadas de animais que receberam 400 μg , de acordo com o protocolo utilizado para proteção, e foram estimuladas por Con A "in vitro" verificamos aumento na produção de IFN- γ

em relação às células dos animais que não foram tratados com a fração FAd mas estimuladas "in vitro" com a Con A. ($p < 0.05$). Quando a fração FAd foi administrada na concentração de 800 $\mu\text{g}/\text{animal}$ observou-se marcada diminuição da produção de IFN- γ induzida pela estimulação com a Con-A ($p < 0.05$).

Quando células de animais que receberam "in vivo" a fração FAd foram estimuladas "in vitro" com 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ da fração (tabela XII) observou-se discreto aumento da produção na concentração de 400 $\mu\text{g}/\text{animal}$. Embora discretos, estes valores são significativos em termos estatísticos ($p = 0.05$). Estes valores, no entanto, não diferem do observado no sobrenadante de células de animais do mesmo grupo, que não sofreram qualquer estímulo "in vitro" (liberação espontânea). Os dados da tabela XIII, mostram aumento discreto da produção espontânea de IFN- γ pelo grupo de animais que receberam "in vivo" 400 $\mu\text{g}/\text{animal}$ da fração FAd, quando comparados ao grupo que não recebeu nenhum tipo de tratamento ($p = 0.01$).

A figura 7 resume os resultados obtidos nos grupos de experimentos realizados.

4.8 - Efeito da administração de anticorpo anti-IFN- γ a camundongos CBA/J protegidos com FAd. A fim de verificarmos a importância do IFN- γ na proteção observada com FAd, anticorpo neutralizante anti- IFN- γ foi administrado ao grupo de animais protegidos. Como controle, administrou-se BSA nas mesmas concentrações que a fração FAd e todos os grupos foram infectados com 10^5 formas de *T.cruzi* . A fig. 8 mostra que os animais que receberam FAd, segundo o protocolo descrito para proteção, atingiram 85% de sobrevida. O grupo que recebeu BSA e o que foi somente inoculado com *T.cruzi* , tiveram comportamento semelhante, não sobrevivendo ao 12º dia pós infecção. A administração de anticorpo anti-IFN- γ reverteu totalmente a proteção observada no grupo que recebeu previamente a fração FAd. Os animais que receberam anticorpo anti-IFN- γ e foram posteriormente inoculados com *T.cruzi* , não sobreviveram ao 10º dia pós- infecção.

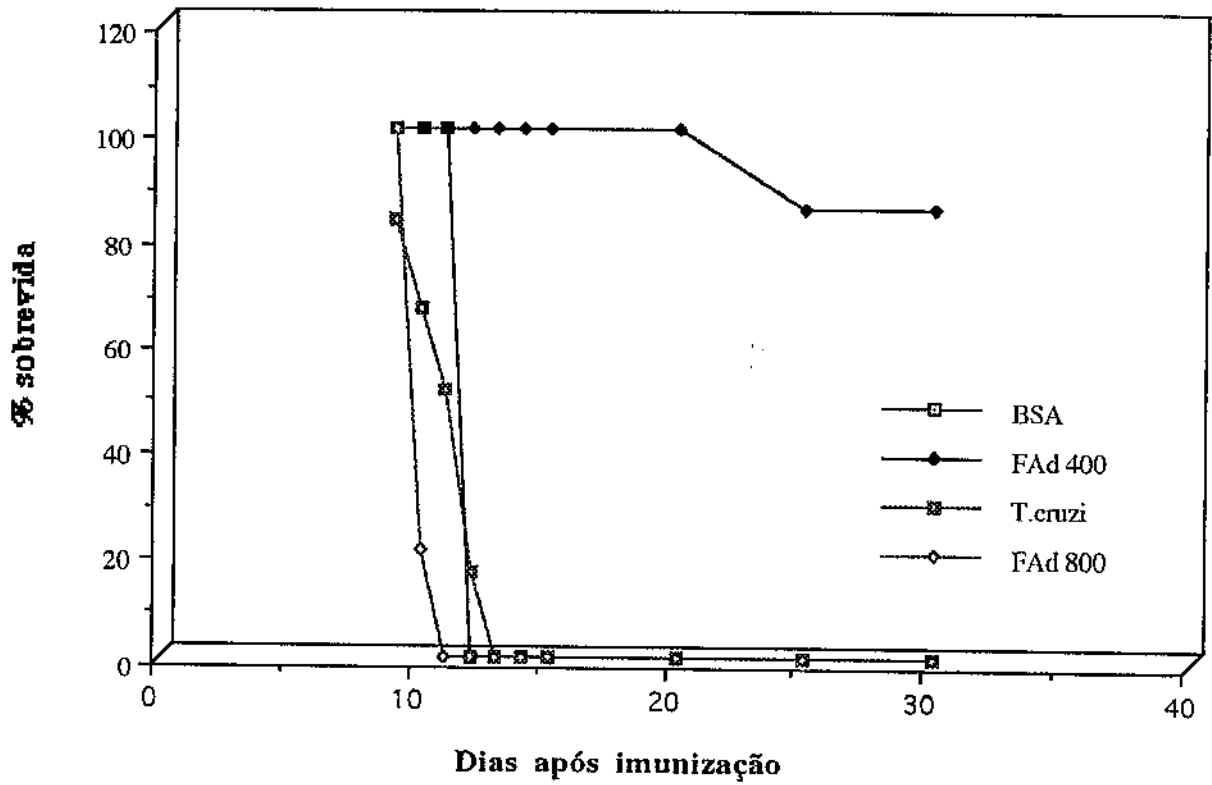


Figura 1. Sobrevida de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" a fração FAd e BSA antes da infecção com *T.cruzi*. A fração FAd e proteína controle BSA foram administradas aos animais nas concentrações indicadas. Todos os grupos foram infectados com 10^5 formas de *T.cruzi*, e a sobrevida acompanhada pelo período de 30 dias.

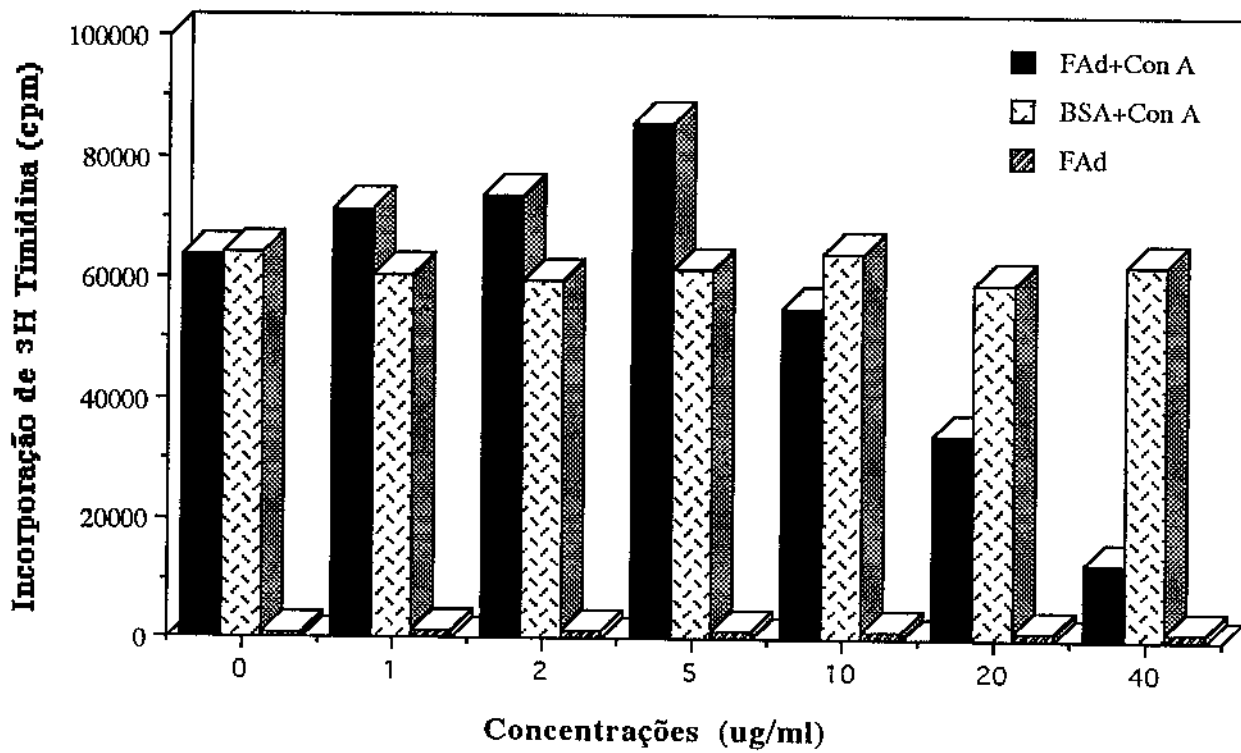


Figura 2. Efeito da adição da fração FAd e BSA às culturas de linfócitos de animais normais estimulados com Con A, e FAd na ausência de Con A. Células esplênicas de camundongos CBA/J normais foram estimuladas "in vitro" por Con A, na presença de FAd e BSA, ou ainda foram cultivadas somente na presença da fração FAd. A resposta foi avaliada através da leitura da incorporação de timidina tritiada.

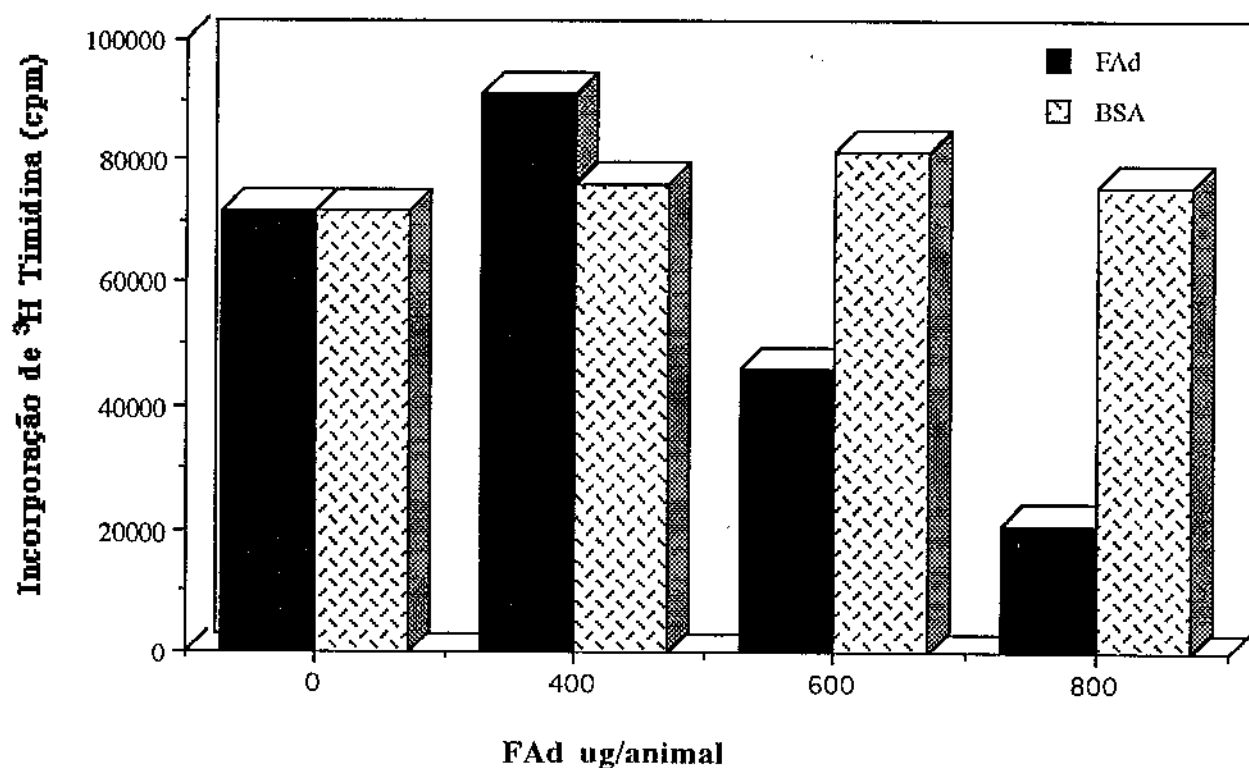


Figura 3. Resposta proliferativa à Con A por linfócitos esplênicos de camundongos que receberam "in vivo" a fração FAd e BSA. A fração FAd foi administrada a camundongos CBA/J nas concentrações indicadas. As células esplênicas foram estimuladas "in vitro" por Con-A, e a resposta avaliada através da leitura da incorporação de timidina tritiada.

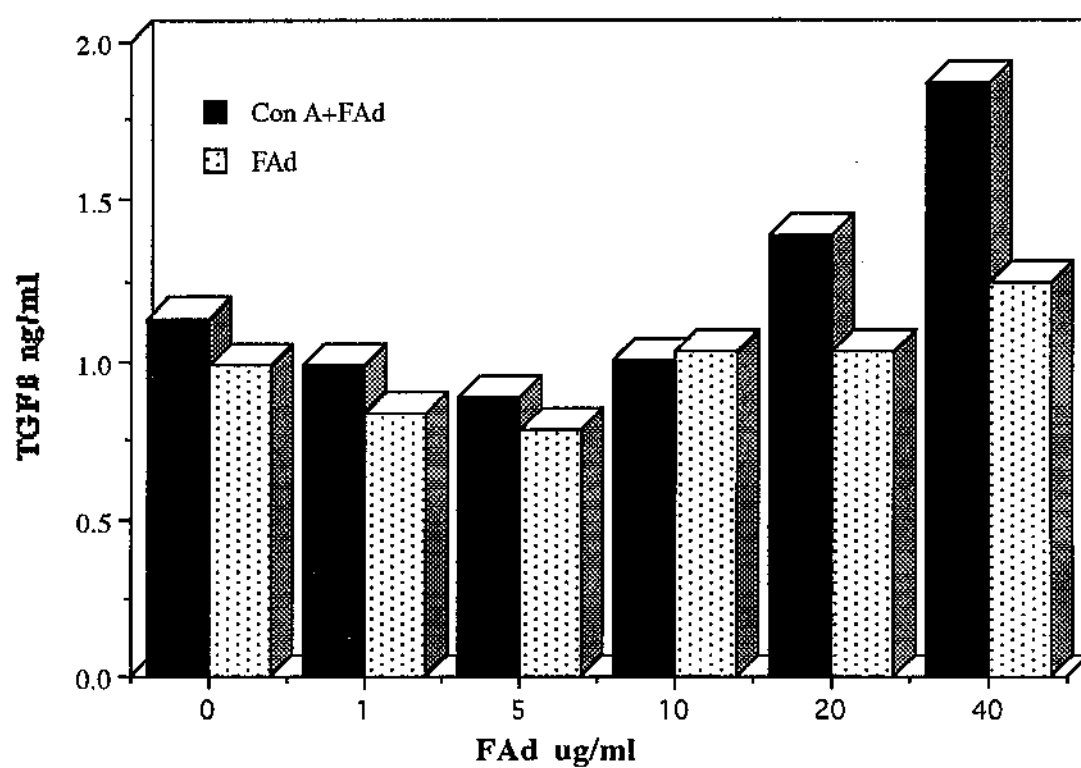


Figura 4. Níveis de TGF- β (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais estimuladas com Con A, ou não estimuladas, na presença da fração FAd. Células do baço de animais normais foram colocadas em cultura e estimuladas por Con A na presença de diferentes concentrações de FAd. Os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de TGF- β quantificados em ensaio de ELISA de captura.

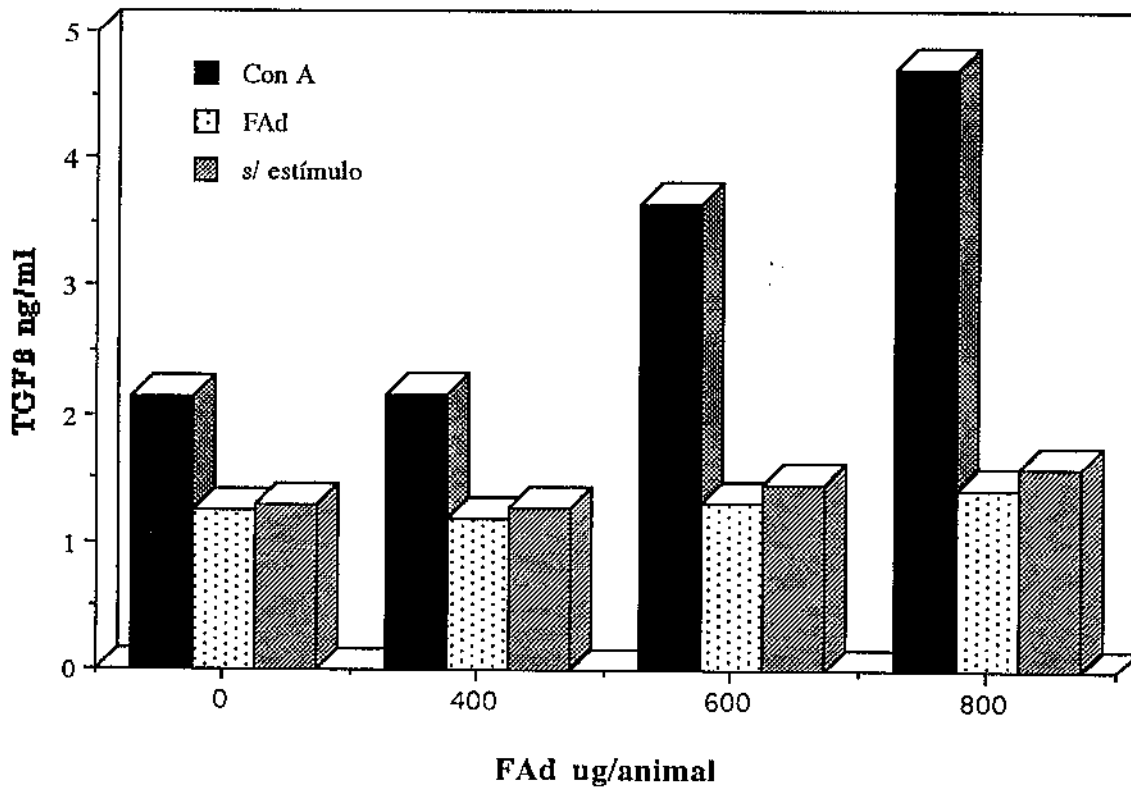


Figura 5. Níveis de TGF β (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de animais que receberam diferentes concentrações da fração FAd "in vivo", posteriormente estimuladas por Con A, FAd ou na ausência de estímulo "in vitro". A fração FAd foi administrada nas concentrações indicadas, a camundongos CBA/J. Os baços foram retirados e as células estimuladas por Con-A, FAd, ou cultivadas na ausência de estímulo. Os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de TGF- β quantificados utilizando-se o método de ELISA de captura.

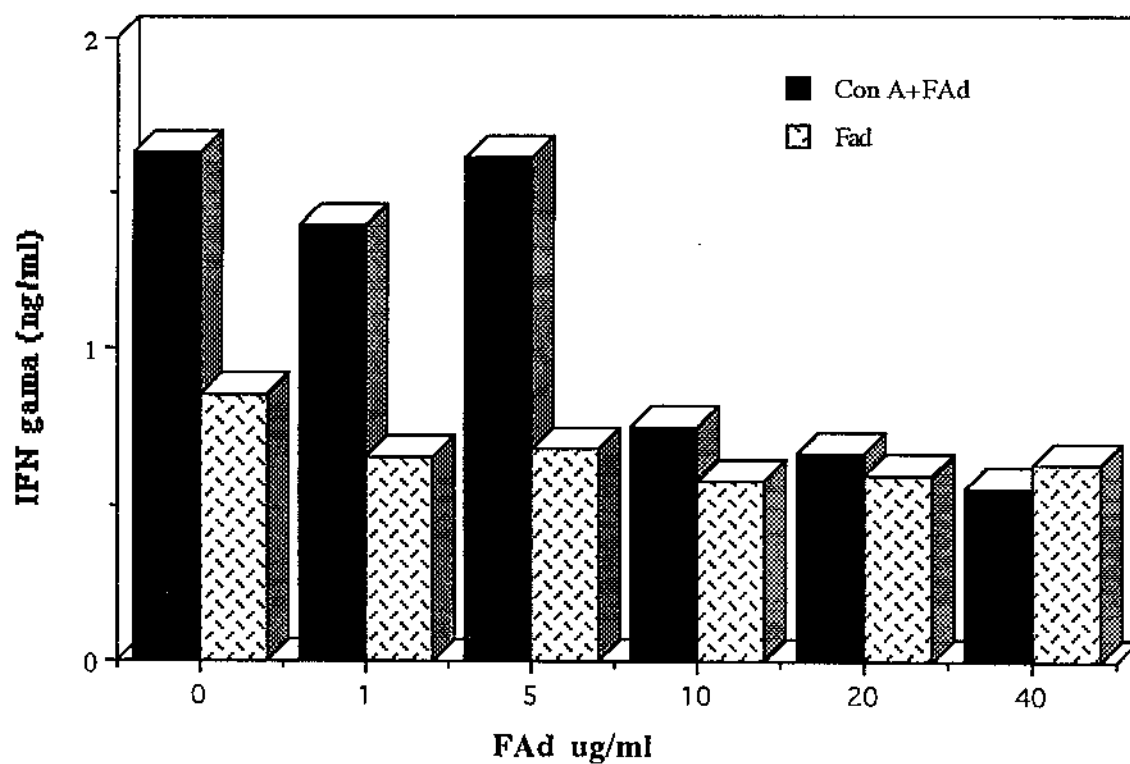


Figura 6. Níveis de IFN- γ (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais estimuladas por Con A, ou não, na presença da fração FAd. Células do baço de animais normais foram estimuladas "in vitro" por Con A na presença de diferentes concentrações de FAd. Os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de IFN- γ quantificados em ensaio de ELISA de captura.

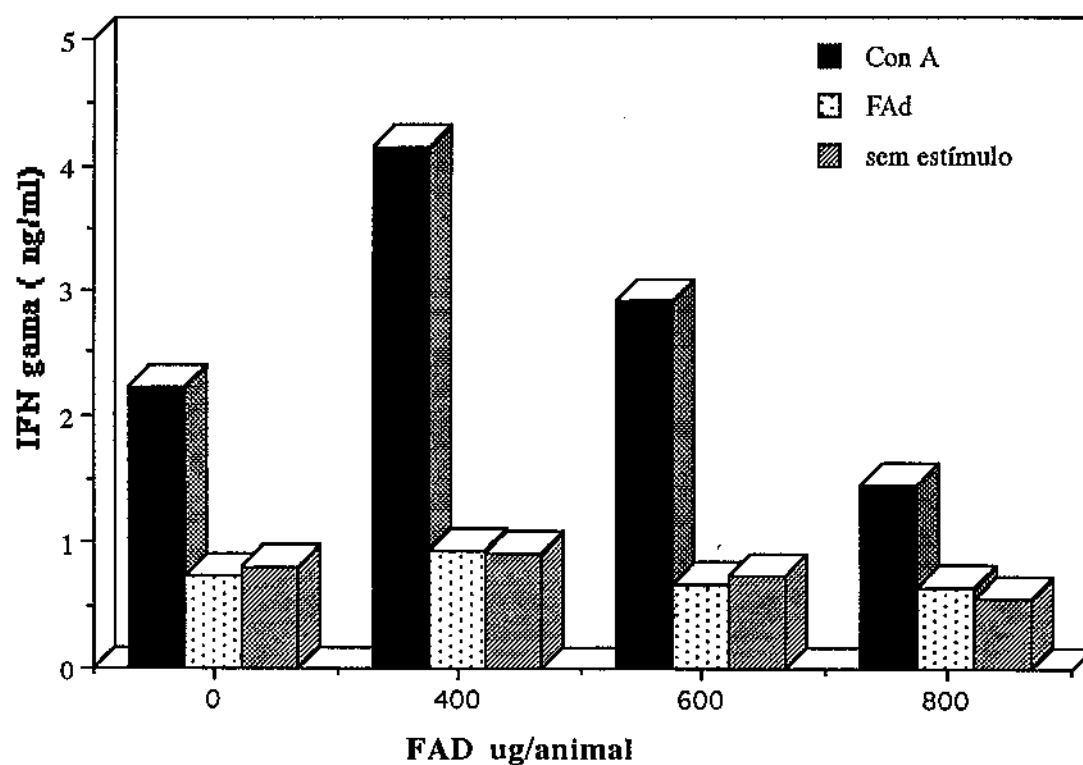


Figura 7. Produção de IFN- γ por células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam a fração FAd "in vivo" seguido de estimulação "in vitro" com Con-A, FAd e na ausência de estímulo. A fração FAd foi administrada em diferentes concentrações a grupos de animais normais. As células esplênicas foram estimuladas "in vitro" por Con-A ou fração FAd (5 μ g/ml) ou ainda cultivadas na ausência de estímulo. Os sobrenadantes foram recolhidos e os níveis de IFN- γ quantificados em ensaio de ELISA de captura.

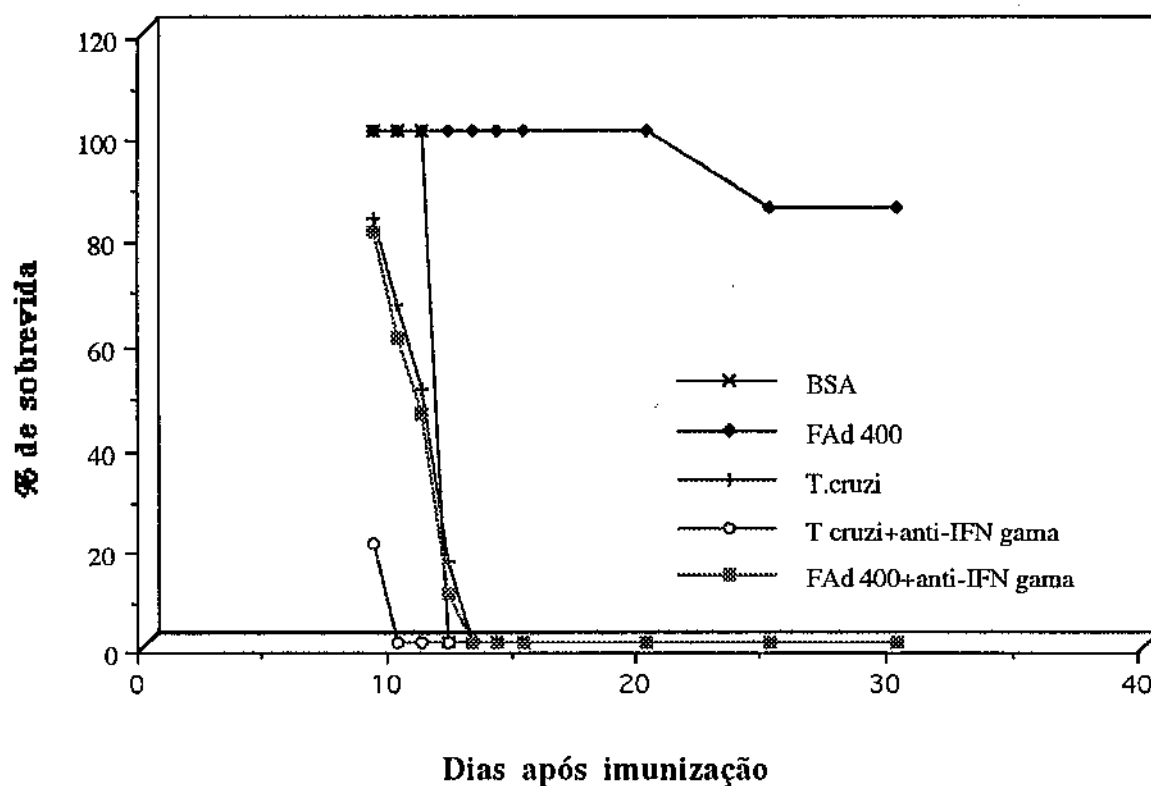


Figura 8. Reversão da proteção obtida com a fração FAd pela administração de anticorpo anti-IFN- γ . Camundongos CBA/J receberam via i.v. a fração FAd e anticorpo anti-IFN- γ . Como controles, grupos receberam FAd e BSA nas concentrações indicadas. Todos os grupos foram infectados com *T.cruzi*.

5-DISCUSSÃO

A fração antigênica de *T.cruzi* (FAd) foi previamente caracterizada e estudada em nosso laboratório (CORSINI et al. 1.980, TAMASHIRO et al. 1.983). Trata-se de preparação complexa, sendo basicamente um extrato das formas epimastigotas do *T.cruzi*. TAMASHIRO e colaboradores (1.983) demonstraram que a preparação antigênica contém glicoproteínas da superfície que são comuns a outras formas evolutivas do parasita. Esta informação é de extrema importância biológica, pois partindo de forma em cultura pode-se estudar a interação do hospedeiro com as formas infectantes. É através das estruturas de superfície, que o parasita entra em contato com o sistema imune do hospedeiro. A indução de imunidade protetora por estrutura de membrana do parasita foi descrita por outros autores (SCOTT e SNARY, 1.979; SNARY, 1.983). Assim, numa fase inicial do estudo, trabalhamos no sentido de induzir proteção em camundongos CBA/J, contra dose letal de *T.cruzi*.

O efeito da fração FAd foi testado na sobrevida de animais infectados com *T.cruzi* . Após vários protocolos no sentido de induzir proteção, verificamos redução da mortalidade dos animais, que variou de 85 a 100% nos diferentes grupos estudados quando a fração FAd foi administrada nas concentrações de 100 µg por um período de 7 dias, no total de 400 µg/animal. Este índice de sobrevida foi significativamente diferente dos grupos controles que receberam apenas o parasita, proteína BSA e a fração antigênica em altas concentrações; nestes casos não se observou indução de proteção.

Uma vez observado que a fração FAd quando administrada em baixas concentrações, induziu significativa proteção contra doses letais de *T.cruzi* , o próximo passo foi verificar o efeito da fração antigênica na resposta imune celular de animais que receberam as diferentes doses da fração.

O estudo foi realizado utilizando-se células de animais normais, e não dos animais protegidos, para não fugir ao nosso objetivo principal que era estudar o efeito induzido pela fração antigênica de *T.cruzi* no sistema imune do hospedeiro antes da inoculação do parasita. Este tipo de abordagem afasta também o inconveniente da presença de formas circulantes do parasita que

introduziriam mais uma variável, dificultando o estudo do efeito da fração antigênica de *T.cruzi*.

CORSINI e colaboradores (1.980) demonstraram que a administração da fração FAd inibia a produção de anticorpos e o desenvolvimento de unidades formadoras de colônias no baço de camundongos CBA/J. Os autores propuseram que esta fração antigênica inibia a divisão celular. Desta forma, no sentido de entender os mecanismos supressores e indutores da imunidade protetora, avaliamos a proliferação de linfócitos estimulados com Con-A na presença da fração FAd "in vitro" ou quando a fração antigênica foi administrada "in vivo" nas doses indutoras ou não de proteção.

A adição da fração FAd à cultura de linfócitos normais "in vitro" ou a administração do antígeno aos camundongos, levaram tanto à estimulação como à supressão da resposta linfoproliferativa, na dependência da dose de antígeno empregada. Estes resultados estão em concordância com vários outros relatos da literatura, onde se demonstrou que a infecção por *T.cruzi* pode tanto levar a estimulação como supressão da resposta imune. Com relação à estimulação da resposta proliferativa de linfócitos, a ativação policlonal, ou seja, a intensa blastogênese observada nos animais infectados, que resulta na depressão da resposta imunológica, tem sido atribuída a componentes antigênicos do parasita (CORSINI e COSTA, 1.981, MINOPRIO et al. 1.986, VAN VOORHIS, 1.992). Estes mitógenos inespecíficos, principalmente para células B, foram identificados como substâncias LPS-Like (GOLDBERG et al. 1.983). Nas nossas preparações, em particular, não observamos atividade mitogênica para a fração FAd (tabela II) . A adição do antígeno, em baixas concentrações, potencializa o efeito mitogênico da Con-A. Esta potencialização da resposta proliferativa à Con-A pode ser devido à uma série de mecanismos. É possível que polissacarídes presentes nas preparações da fração FAd estimulem a produção de IL-1. Embora não tenha sido observado efeito mitogênico para os linfócitos, quando células normais foram estimuladas com a fração antigênica, não podemos afastar a possibilidade de os contaminantes polissacarídicos da fração estimularem os macrófagos, uma vez que concentrações muito baixas do agente estimulante são suficientes para estimular a produção desta citocina (SANTOS et al. 1.985).

Não foi estudado também o efeito da fração FAd na produção de IL-2 ou sobre a expressão dos receptores para IL-2. É possível que nas concentrações onde observamos potencialização da resposta proliferativa, a fração antigênica tenha estimulado a produção de IL-2 ou aumentado a expressão dos receptores de IL-2. Provavelmente, tanto a estimulação dos macrófagos produzindo citocinas como IL-1, assim como linfócitos sintetizando IL-2 ou expressando receptores de IL-2, estejam ocorrendo simultaneamente.

Nossos resultados são indicativos de que a administração da fração FAd, nas doses ideais, estimula a resposta imune celular. Afastamos a possibilidade de complexos formados entre Con-A e glicoproteínas presentes nas preparações de FAd (TAMASHIRO et al. 1983), estarem alterando os resultados, na medida em que a fração administrada em baixas doses, "in vivo", portanto, sem a presença de FAd nas culturas, também induziu aumento na resposta proliferativa dos linfócitos.

Com relação à depressão da resposta proliferativa de linfócitos, vários são os relatos na literatura mostrando a supressão da resposta proliferativa tanto em animais infectados, como em ensaios de proliferação "in vitro" (BELTZ e KIERSZENBAUM, 1987, BELTZ et al., 1989, KIERSZENBAUM, 1981, MALECKAR e KIERSZENBAUM, 1983, LOPEZ et al, 1993). Vários são os mecanismos propostos para explicar a deficiente resposta blastogênica dos animais infectados, sendo a redução na produção de IL-2 e a diminuição da expressão dos receptores de IL-2, as alterações mais citadas (KIERSZENBAUM et al. 1991, KIERSZENBAUM et al. 1981, KIERSZENBAUM et al. 1989, KIERSZENBAUM et al. 1990).

Recentemente, o avanço no entendimento das interações entre citocinas e subpopulações de linfócitos T veio esclarecer uma série de observações feitas para as parasitoses. Como já foi citado, os linfócitos CD4 foram divididos em duas subpopulações Th1 e Th2 baseados na capacidade de produzir determinados padrões de citocinas (MOSMANN et al. 1986). Conhecendo-se que as citocinas produzidas por cada uma das subpopulações têm a propriedade de regular a proliferação, síntese e atividade biológica das citocinas secretadas pela subpopulação oposta (MOSMANN e MOORE,

1.991), a supressão ou estimulação da resposta imune, induzida pela infecção parasitária pode ser entendida como a prevalência de determinadas citocinas com efeito supressor ou estimulador da resposta imunológica, dependendo do estímulo recebido.

De interesse particular para a imunologia dos parasitas é a observação de que nas parasitoses, as citocinas produzidas pelas subpopulações Th2 podem inibir as citocinas produzidas pelos clones Th1 e, conseqüentemente, os mecanismos que normalmente são os mais eficientes no controle de infecções parasitárias intracelulares.

Diante destas informações, escolhemos quantificar os níveis de TGF- β e IFN- γ de animais normais que receberam previamente a fração FAd "in vivo" ou o efeito deste antígeno "in vitro".

Com relação ao TGF- β , esta citocina não se enquadra obrigatoriamente como produto de linfócitos Th1 ou Th2, sendo produzida por linfócitos (KEHRL et al. 1.986) e macrófagos (ASSOIAN et al. 1.987). Escolhemos estudá-la por seu importante efeito imunoregulador. No presente trabalho verificamos que células normais estimuladas "in vitro" com diferentes concentrações de FAd, produzem níveis significativos de TGF- β quando concentrações mais elevadas do antígeno são empregadas. No grupo onde a fração FAd foi adicionada a células normais, a produção de TGF- β foi maior quando os linfócitos foram estimulados por Con-A e discreto aumento também se observou quando a fração FAd foi adicionada às células normais. Foge aos objetivos deste estudo, a identificação das células produtoras das citocinas. Os resultados, no entanto, sugerem que tanto macrófagos como linfócitos T possam ser responsáveis, pelo menos em parte, pela produção de TGF- β . O discreto aumento observado quando células de camundongos normais foram estimuladas apenas com a fração FAd (tabela V) nas concentrações mais elevadas, pode ser explicado pela ativação de macrófagos. Devido à complexidade do antígeno, é possível que resíduos de polissacarídeos estejam estimulando os macrófagos a produzirem TGF- β ativo nestas condições. A produção de TGF- β , na forma inativa, por macrófagos estimulados por LPS foi previamente descrita na literatura (ASSOIAN et al. 1.987). Foi demonstrado

também que macrófagos infectados "in vitro" por *L. major* produziram níveis elevados de TGF- β na forma ativa (BARRAL-NETO et al. 1.992).

Quanto às dosagens de TGF- β em animais que receberam a fração FAd "in vivo", observamos aumento da produção de TGF- β quando as células foram estimuladas por Con-A em relação às células que não foram estimuladas. A produção autócrina de TGF- β por células estimuladas por mitógenos inespecíficos foi previamente descrita na literatura (LUCAS et al.1.992). No entanto, a administração da fração FAd induziu níveis de TGF- β superiores aos observados quando as células foram estimuladas apenas pela Con-A. Células dos animais que receberam "in vivo" a fração FAd, quando estimuladas "in vitro" pelo mesmo antígeno, não produziram níveis significativos de TGF- β . Atribuímos estes resultados à sensibilização de poucos clones pela prévia administração da fração FAd. Nosso objetivo não foi conseguir protocolo para máxima produção de TGF- β e sim, estudar os níveis desta citocina nas condições onde se observou proteção. Nos protocolos de proteção, não utilizamos métodos de imunização clássicos onde adjuvante e maior período de tempo são necessários para resposta. No protocolo empregado (400 μ g/semana) as células foram sensibilizadas, mas provavelmente o número de clones específicos para o antígeno, gerados nestas condições, deve ser muito pequeno. É possível que empregando método de quantificação de TGF- β mais sensível que ELISA, o SPOT-ELISA, por exemplo, que quantifica a produção de citocina ao nível de uma única célula, teríamos encontrado células produtoras de TGF- β em resposta ao antígeno. Com a expansão dos clones pela estimulação com Con-A, tivemos condições de quantificar níveis aumentados de TGF- β , produzidos por células de animais que receberam grandes concentrações da fração FAd. Estes resultados encontram suporte em recente trabalho realizado no modelo de indução de tolerância oral na encefalomielite experimental autoimune. Neste modelo, os autores mostraram que linfócitos das placas de Peyer de animais tolerizados com proteína básica de mielina, não proliferam quando estimulados pelo tolerógeno. No entanto, quando estes linfócitos são expandidos na presença de IL-2, níveis consideráveis de TGF- β podem ser detectados (SANTOS et al., 1.994). Estes dados indicam que o aumento na produção de TGF- β pode inibir a transformação blástica das células produtoras da citocina. A ativação com mitógenos inespecíficos ou a adição de IL-2, induzem a expansão de clones

celulares produtores de TGF- β , sendo desta forma possível a quantificação no sobrenadante. Estes resultados sugerem que, nestas condições, linfócitos sejam responsáveis pela produção de TGF β .

Estas observações correlacionam muito bem com a supressão da resposta blastogênica de linfócitos à Con-A, demonstrada quando concentrações elevadas da fração antigênica foi empregada. (tabelas I,III). A supressão da resposta proliferativa à Con-A, se deve, pelo menos em parte, ao aumento da produção de TGF- β . O efeito supressor do TGF- β sobre a atividade proliferativa de linfócitos foi previamente descrito na literatura (KEHRL et al. 1.991) e atribui-se este efeito supressor, entre outras funções, à diminuição da expressão de receptores para IL-2 (KEHRL et al. 1.986, RUEGGER et al. 1.990) .

O aumento da produção de TGF- β , induzido pela administração de altas doses de FAd, e a ausência dos efeitos protetores observados quando as concentrações mais baixas foram administradas, é outra observação extremamente importante de nosso trabalho. A produção elevada de TGF- β está associada à maior disseminação de parasitas intracelulares nos modelos de *Leishmania* (BARRAL-NETO et al. 1.992). Nas infecções com *T.cruzi*, foi demonstrado que o controle da infecção por macrófagos ativados foi suprimido pelo TGF- β (SILVA et al. 1.991). TGF- β , assim como IL-4 e IL-10, inibe a capacidade de IFN- γ ativar os macrófagos e, desta forma, controlar a replicação dos parasitas . Demonstrou-se também, que TGF- β , assim como IL-10, tem efeito negativo, ou inibe a resistência à infecção com *T.cruzi* "in vivo" (Silva et al. 1992). Estes dados vêm reforçar nossos achados que correlacionam o aumento da produção de TGF- β , induzido pelas altas concentrações da fração FAd, e a ausência do efeito protetor .

Os mecanismos pelos quais a fração FAd administrada em altas doses levaram à maior produção de TGF β , no entanto, não estão esclarecidos. Podemos, contudo, levantar algumas hipóteses. A natureza da molécula de TGF- β é um importante fator a ser considerado. TGF- β é uma proteína de 25 kD, normalmente liberada das células na forma biologicamente inativa ou latente (LUCAS et al. 1.990). O estado de latência é explicado pela associação não covalente com proteína associada à latência (LAP). Tratamento

enzimático ou acidificação leva à ativação da molécula latente e liberação da citocina ativa (LYONS et al. 1.988, MIYAZONO et al. 1.993). A fração FAd, devido à sua complexidade, contém resíduos de enzima proteolítica do próprio parasita (TAMASHIRO et al. 1.983). É possível que quando a concentração do antígeno é aumentada, os níveis da enzima proteolítica também se elevem ativando a forma latente de TGF- β e, desta forma, promovendo o efeito imunodepressor.

A natureza do antígeno também pode ser responsável pela subpopulação de linfócitos CD4 ativada. Como já foi citado, no modelo de infecção com *L. major*, antígenos solúveis do parasita podem gerar clones com características de Th1 com ação protetora e clones com características de Th2 sem ação protetora (SCOTT et al. 1.988; MULLER & LOUIS, 1.989). É possível que em nosso caso, quando a oferta de antígeno é menor, o mesmo seja apresentado à linfócitos Th1, enquanto que, com o aumento da oferta, estamos aumentando também antígenos que serão apresentados a Th2. Outro mecanismo importante a ser considerado é o efeito da TGF- β sobre as populações Th1. O TGF- β sabidamente regula negativamente os efeitos de IFN- γ . Alguns autores mostraram, nos diferentes modelos de infecção por parasitas intracelulares, que a produção aumentada de TGF β por macrófagos, devido à própria infecção, inibia tanto a produção como a função estimuladora de IFN- γ (Silva et al. 1.991, 1.992, Bermudez, 1.993).

Ainda com relação à estrutura molecular da fração antigênica de *T. cruzi* e seu efeito na produção de TGF β , sabe-se que determinados epítomos estimulam melhor a produção de TGF- β que outros. Recentemente, estudando mecanismos de indução de tolerância oral a neuro-antígenos, na encefalomielite experimental autoimune, foi demonstrado que peptídios pertencentes à porção não encefalitogênica da molécula de proteína básica de mielina (MBP), induziam tolerância e conseqüentemente, protegiam os animais contra a EAE através de maior produção de TGF- β , enquanto os peptídios encefalitogênicos da molécula de MBP não induziam a produção de TGF- β (MILLER et al. 1.993). É possível que, com o aumento da concentração da fração antigênica FAd, estejamos aumentando também determinados epítomos que ativariam a produção desta citocina. São vários os mecanismos, portanto, que poderiam

explicar porque em concentrações mais elevadas a fração FAd exerce efeito imunodepressor.

Entre as citocinas envolvidas na ativação da resposta imune nas parasitoses, o IFN- γ ocupa posição de destaque principalmente no que diz respeito à ativação de células do sistema monocítico fagocitário. Não se observou aumento significativo na produção de IFN- γ quando a fração FAd foi adicionada à cultura de células normais ou quando foi administrada aos animais "in vivo" e as células foram posteriormente estimuladas "in vitro" com a mesma fração (tabelas X e XII). Com relação aos resultados da tabela XII, acreditamos que sejam devidos às mesmas razões descritas para as determinações de TGF- β , ou seja, no protocolo empregado, o tempo de sensibilização, e de estimulação "in vitro" foi normalmente insuficiente para a estimulação dos clones antígeno-específicos. Quando as células derivadas dos animais que receberam FAd "in vivo", em concentrações baixas, foram expandidas pela Con-A, detectamos níveis significativamente elevados de IFN- γ . IFN- γ é uma citocina multifuncional normalmente secretada por linfócitos T ou células NK ativadas. Linfócitos T em repouso expressam baixos níveis de receptores de IFN- γ . Acreditamos que o aumento da produção de IFN- γ , observado na tabela XI não seja resultante apenas da estimulação por Con-A. A diferença entre os níveis de IFN- γ produzidos pelas células dos animais que receberam a fração FAd "in vivo" comparada ao grupo que não recebeu, sugere que a estimulação com Con-A favoreceu a expansão de células sensibilizadas à fração FAd, produtoras de IFN- γ . Esta demonstração seria mais elegante em ensaios de clonagem com diluição limite, ou SPOT-ELISA, onde pudéssemos caracterizar os clones de células especificamente sensibilizados à fração FAd. Reforçando nossas observações sobre o efeito inibidor de TGF- β na produção de IFN- γ , verificamos que a adição de doses crescentes da fração FAd "in vitro", inibe a produção de IFN- γ pelas células normais estimuladas pela Con-A (Tabela IX).

Nosso trabalho encontra suporte na literatura, onde está bem descrito o envolvimento do IFN- γ na resposta imune anti-*T.cruzi* (JAMES et al. 1.982, PLATA et al. 1.984, REED 1.988, WIRTH et al. 1.985, SILVA et al. 1.991). Atribui-se o efeito anti-parasitário do IFN- γ principalmente à ativação das células do sistema monocítico-fagocitário. Macrófagos de camundongos

tratados com IFN- γ recombinante de murinos inibiram o desenvolvimento intracelular de *T.cruzi* "in vitro" e os camundongos tratados com IFN- γ apresentaram baixa parasitemia e aumento de sobrevida em relação ao grupo não tratado (REED 1.988 e SILVA 1.991). O envolvimento do IFN- γ nos mecanismos de proteção foi também verificado por outros autores, estudando infecções com *Toxoplasma gondii* (DENKERS et al. 1.993) e Leishmanioses (SHER & COFFMAN 1.992).

Reforçando a importância da maior produção de IFN- γ na proteção observada, administramos aos animais que receberam a fração FAd, nas condições em que a mesma induz proteção, anticorpo anti-IFN- γ . Verificamos que a proteção observada é totalmente revertida com este tratamento.

A identificação das populações de células que secretam IFN- γ , está sendo presentemente estudada em nosso laboratório, sendo ainda inconclusivos os resultados de que dispomos no momento. Na medida em que não identificamos as populações celulares produtoras das citocinas, podemos discutir apenas que é possível que os níveis aumentados de IFN- γ podem ser resultado tanto da ativação das populações de linfócitos CD4 ou CD8, assim como por células NK.

A produção de IFN- γ pelas células CD4 do tipo TH1 está muito bem descrita na literatura (MOSMANN et al. 1.986); ficou bem estabelecida a participação desta população celular no controle das infecções por parasitas intracelulares. Recentemente, evidências vêm se acumulando a respeito da importante participação dos linfócitos CD8⁺ na resistência a microorganismos como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Listeria monocytogenes* e *Mycobacterium tuberculosis*, in vivo. A demonstração da função protetora das células CD8⁺ deriva de pelo menos três observações: a transferência adotiva de linfócitos enriquecidos em células TCD8⁺, depleção dos linfócitos CD8⁺ "in vivo" e a utilização de camundongos deficientes de genes para β 2-microglobulina. As células destes camundongos não expressam moléculas de classe I do complexo principal de histocompatibilidade e, conseqüentemente, estes camundongos têm a função de células T CD8⁺ deficiente. Utilizando

estes animais, TARLETON et al. (1.992) demonstraram claramente que a sobrevivência de camundongos infectados com *T.cruzi* depende da função das células T CD8⁺. Ao contrário dos animais normais, os animais deficientes na β 2-microglobulina e células T CD8⁺ não sobrevivem à fase aguda da infecção. O desenvolvimento da resposta de linfócitos T CD8⁺ em animais infectados com *T.cruzi* é modificado pela localização intracelular do parasita. Assim, é possível que peptídeos derivados do parasita associados aos antígenos de classe I ativem os linfócitos T CD8⁺. Nos modelos de infecção com *T.gondii* ficou demonstrado que as células T CD8⁺ são fonte de IFN- γ derivado das células T (KHAN et al. 1.994). Neste modelo, a transferência adotiva das células imunes CD8⁺ confere resistência a camundongos normais de forma muito mais eficiente que as células CD4⁺; o efeito protetor é revertido pela administração de anticorpo anti-IFN- γ (SUZUKI e REMINGTON, 1.990) ou pela depleção *in vivo* das células T CD8⁺ (DENKERS et al. 1.993).

A produção de IFN- γ independente das células T também está descrita como importante mecanismo que resulta na resistência à infecção aos patógenos intracelulares. Não podemos afastar a possibilidade de células NK estarem produzindo IFN- γ numa fase precoce, logo após a estimulação com a fração FAd. Normalmente, após 3 dias de estímulo, a produção de IFN- γ já pode ser detectada, principalmente em cortes histológicos (BOGEN et al. 1.993). É possível que a produção de IFN- γ pelas células NK na fase precoce de estimulação com a fração antigênica, esteja envolvida no controle da replicação do parasita pelos macrófagos ativados, e conseqüentemente, na proteção observada. Esta propriedade das células NK foi descrita para várias parasitoses, além da infecção por *T.cruzi*. Por outro lado, a liberação de IFN- γ pelas células NK não parece estar envolvida apenas na proteção a infecções. O IFN- γ produzido na fase precoce de infecções ou outro tipo de estimulação antigênica, é um poderoso estímulo para a diferenciação de células T "naive" em linfócitos da população Th1 (MAGGI et al. 1.992, COFFMAN et al. 1.991). A diferenciação dos clones Th1, portanto, seria favorecida pela produção precoce de IFN- γ pelas células NK. Diante do exposto, entendemos que fica cada vez mais difícil separar os eventos da fase precoce, ou imunidade inata, da fase subsequente da resposta imune, a imunidade adquirida.

A mesma observação é válida para o estudo das citocinas. No presente trabalho demonstramos que o maior controle da infecção, que resulta na sobrevivência do organismo, depende da interação das células imunológicas e de seus produtos. Sem diminuir a importância das demais citocinas, que não tivemos a oportunidade de estudar, demonstramos que em determinadas situações, como é o caso da maior oferta do antígeno, o equilíbrio imunológico se desloca no sentido de favorecer a maior síntese de determinadas citocinas, como é o caso do TGF- β , que induz supressão da resposta imune, particularmente da função de IFN- γ e conseqüentemente, leva os animais precocemente à morte. Por outro lado, em concentrações ideais, o antígeno pode estimular a diferenciação de clones Th1, linfócitos CD8⁺ e ainda células NK a produzirem maior quantidade de IFN- γ , que por sua vez, suplantaria o efeito de TGF β , estimulando o sistema monocítico-fagocitário, resultando no "clearance" de parasitas e atividade tripanomicida mais eficientes, que culminaria no aumento da sobrevivência do animal hospedeiro.

Nosso trabalho é extremamente relevante, no sentido em que mostra claramente que as interações entre células do sistema imune e seus produtos são extremamente complexas, sendo que o aumento de determinada citocina pode implicar na inibição de outra e, desta forma, alterar dramaticamente a resposta observada. Assim, ao estudarmos as interações do sistema imune, devemos levar sempre em consideração que estamos analisando um mecanismo complexo e dinâmico.

6-CONCLUSÕES

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem-nos tirar as seguintes conclusões:

- 1- A fração antigênica de *T.cruzi* , na dependência da dose administrada, pode induzir imunidade protetora em animais infectados com doses letais de *T.cruzi*.
- 2- Na dependência da dose empregada, a fração antigênica de *T.cruzi* pode estimular ou suprimir a resposta proliferativa de linfócitos estimulados pela Con-A.
- 3- Concentrações elevadas da fração FAd levam à produção aumentada de TGF- β e não induzem efeito protetor.
- 4- As concentrações da fração FAd que induzem imunidade protetora na doença de Chagas experimental são também estimuladoras da produção de IFN- γ .
- 5- A administração de anticorpos neutralizantes anti-IFN- γ reverte totalmente a proteção induzida pela fração FAd .

7-APENDICE

Tabela I-Resposta linfoproliferativa à Con A por células esplênicas de camundongos CBA/J normais, estimuladas "in vitro" na presença de diferentes concentrações da fração FAd ($\mu\text{g/ml}$). Resultados expressos em contagem por minuto (cpm).

Exp.n°	FAd $\mu\text{g/ml}$						
	0	1	2	5	10	20	40
1	100074 $\pm$ 3435	133594 $\pm$ 14599	134049 $\pm$ 17599	150425 $\pm$ 10121	80040 $\pm$ 5125	67228 $\pm$ 6810	12753 $\pm$ 1025
2	20000 $\pm$ 689	133594 $\pm$ 14599	26809 $\pm$ 3471	30085 $\pm$ 2024	16080 $\pm$ 1034	13445 $\pm$ 1362	15501 $\pm$ 1305
3	48640 $\pm$ 2340	50428 $\pm$ 1620	54370 $\pm$ 870	68020 $\pm$ 3720	42020 $\pm$ 2040	20640 $\pm$ 5720	5640 $\pm$ 2640
4	66784 $\pm$ 6722	68428 $\pm$ 4630	70428 $\pm$ 3270	86340 $\pm$ 2780	74820 $\pm$ 5840	38420 $\pm$ 5670	10110 $\pm$ 1840
5	88695 $\pm$ 7840	89640 $\pm$ 7648	92340 $\pm$ 4774	96340 $\pm$ 3400	76648 $\pm$ 6824	42364 $\pm$ 3500	21640 $\pm$ 2730
6	58746 $\pm$ 3728	59780 $\pm$ 4250	64348 $\pm$ 1728	72483 $\pm$ 2320	40860 $\pm$ 1380	23640 $\pm$ 1785	12340 $\pm$ 1720
média	63823	71447	73724	83999	55078	34289	12997
% supressão	-	0	0	0	14	46	79

Tabela II- Resposta linfoproliferativa de células esplênicas de camundongos CBA/J normais, estimuladas pela Fração FAd. Resultados expressos em contagem por minuto (cpm).

Exp n°	FAd μ g/ml						
	0	1	2	5	10	20	40
1	527 $\pm$	683 $\pm$	428 $\pm$	538 $\pm$	634 $\pm$	584 $\pm$	538 $\pm$
	123	241	72	125	236	103	82
2	1243 $\pm$	1143 $\pm$	1428 $\pm$	2317 $\pm$	1483 $\pm$	1642 $\pm$	1833 $\pm$
	245	128	324	456	398	328	635
3	938 $\pm$	1236 $\pm$	1815 $\pm$	922 $\pm$	1328 $\pm$	1423 $\pm$	1231 $\pm$
	234	127	349	345	548	631	721
4	1428 $\pm$	1621 $\pm$	1324 $\pm$	1478 $\pm$	2320 $\pm$	1578 $\pm$	1323 $\pm$
	387	347	643	344	642	396	422
média	1034	1170	1248	1313	1441	1306	1232

Tabela III- Resposta linfoproliferativa à Con A por células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam previamente a fração FAd "in vivo " (µg/animal). Resultados expressos em contagem por minuto (cpm).

Exp.nº	FAd µg /animal				BSA µg /animal		
	0	400	600	800	400	600	800
1	70713± 7820	134768± 8640	35478± 5400	28786± 3720	72820± 6200	84842± 9320	76883± 4681
2	68420± 5472	72478± 1720	28640± 3270	24640± 4320	74642± 11200	70424± 6720	74341± 5660
3	48720± 3240	58640± 1840	38780± 3720	16385± 1270	81724± 7200	81789± 5240	78831± 8370
4	88620± 12780	96320± 3740	76342± 3620	18620± 1740	71744± 6210	80682± 6740	69840± 4730
5	57341± 6720	68744± 1743	52340± 1537	12783± 1954	76784± 12740	81844± 9743	78940± 5720
6	96742± 1184	114840± 1364	90460± 6734	22420± 2040	78845± 6340	89864± 11020	74845± 6327
média	71759	90965	45821	20605	76093	81574	75613
% supressão	0	25	71	0	0	0	0

Tabela IV-Níveis de TGFβ (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais estimuladas com Con-A na presença de diferentes concentrações de FAd.

Exp.nº	FAd µg/ml					
	0	1	5	10	20	40
1	1.61±0.22	1.37±0.24	1.32±0.22	0.73±0.14	1.55±0.25	2.68±0.23
2	1.42±0.17	0.98±0.33	0.62±0.13	1.62±0.17	1.84±0.23	1.98±0.22
3	0.57±0.12	0.61±0.13	0.63±0.22	0.68±0.24	0.76±0.14	1.06±0.23
4	0.98±0.38	1.01±0.26	0.99±0.32	1.02±0.22	1.41±0.21	1.78±0.17
Média	1.14	0.99	0.89	1.01	1.39	1.87

Tabela V- Níveis de TGF-β (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais, cultivadas na presença de diferentes concentrações de FAd, na ausência de Con-A.

Exp.nº	FAd µg/ml					
	0	1	5	10	20	40
1	0.90±0.37	0.46±0.11	0.38±0.12	1.12±0.22	1.08±0.25	1.11±0.37
2	1.47±0.43	1.35±0.27	1.44±0.22	1.45±0.25	1.42±0.38	1.49±0.54
3	0.61±0.38	0.57±0.23	0.52±0.19	0.64±0.23	0.61±0.33	0.77±0.22
4	1.01±0.22	0.98±0.27	0.85±0.24	0.91±0.41	1.04±0.23	1.65±0.25
média	0.99	0.84	0.79	1.03	1.03	1.25

Tabela VI-Níveis de TGF-β (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos que receberam "in vivo" diferentes concentrações da fração FAd (µg/animal) e estimuladas "in vitro" com Con-A.

Exp.nº	FAd µg/animal			
	0	400	600	800
1	1.22±0.05	2.70±0.11	6.30±0.21	8.20±0.34
2	1.56±0.27	1.54±0.12	1.78±0.17	2.86±0.28
3	2.73±0.37	1.67±0.17	2.85±0.16	3.80±0.21
4	3.06±0.12	2.75±0.24	3.66±0.12	4.01±0.18
média	2.14	2.16	3.64	4.71

Tabela VII-Níveis de TGF-β (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" diferentes concentrações da fração Fad (μg/animal) e estimuladas "in vitro" com FAd (5 μg/ml).

Exp.nº	FAd μg/animal			
	0	400	600	800
1	0.17±0.09	0.22±0.11	0.27±0.09	0.37±0.11
2	1.67±0.31	1.73±0.17	1.87±0.14	1.96±0.14
3	1.58±0.17	1.33±0.16	1.68±0.21	1.73±0.14
4	1.54±0.22	1.47±0.21	1.44±0.24	1.62± 0.21
média	1.24	1.18	1.31	1.42

Tabela VIII-Níveis de TGF-β (ng/ml), 'liberados sem estímulo, no sobrenadante de cultura de células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam " in vivo" diferentes concentrações de FAd.

Exp. nº	FAd μg/animal			
	0	400	600	800
1	0.27± 0.07	0.35±0.05	0.37±0.08	0.47±0.06
2	1.68±0.31	1.73±0.12	1.87±0.22	1.93±0.24
3	1.57±0.14	1.53±0.24	1.88±0.24	1.98±0.36
4	1.68±0.13	1.54±0.22	1.72±0.14	1.98±0.21
Média	1.30	1.28	1.46	1.59

Tabela IX -Níveis de IFN γ (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais estimuladas por con-A na presença de diferentes concentrações da fração FAd.

Exp.n ^o	FAd μ g/ml					
	0	1	5	10	20	40
1	1.24 $\pm$ 0.17	1.84 $\pm$ 0.22	1.20 $\pm$ 0.11	0.74 $\pm$ 0.22	0.51 $\pm$ 0.19	0.43 $\pm$ 0.16
2	1.80 $\pm$ 0.23	0.97 $\pm$ 0.41	1.61 $\pm$ 0.37	1.01 $\pm$ 0.45	1.08 $\pm$ 0.36	0.71 $\pm$ 0.17
3	0.91 $\pm$ 0.22	1.78 $\pm$ 0.15	1.98 $\pm$ 0.23	0.64 $\pm$ 0.12	0.58 $\pm$ 0.14	0.59 $\pm$ 0.13
4	1.58 $\pm$ 0.12	0.89 $\pm$ 0.19	1.68 $\pm$ 0.09	0.64 $\pm$ 0.10	0.54 $\pm$ 0.08	0.49 $\pm$ 0.15
média	1.63	1.39	1.61	0.75	0.67	0.55

Tabela X- Níveis de IFN γ (ng/ml) no sobrenadante de células esplênicas de camundongos CBA/J normais, cultivadas na presença de diferentes concentrações da fração FAd.

Exp.n ^o	FAd μ g/ml					
	0	1	5	10	20	40
1	0.94 $\pm$ 0.12	0.49 $\pm$ 0.14	0.55 $\pm$ 0.22	0.47 $\pm$ 0.23	0.36 $\pm$ 0.14	0.48 $\pm$ 0.24
2	0.88 $\pm$ 0.09	0.72 $\pm$ 0.22	0.64 $\pm$ 0.14	0.58 $\pm$ 0.13	0.62 $\pm$ 0.37	0.54 $\pm$ 0.36
3	0.70 $\pm$ 0.24	0.68 $\pm$ 0.17	0.72 $\pm$ 0.38	0.54 $\pm$ 0.15	0.61 $\pm$ 0.22	0.71 $\pm$ 0.36
4	0.92 $\pm$ 0.17	0.78 $\pm$ 0.22	0.83 $\pm$ 0.27	0.74 $\pm$ 0.09	0.84 $\pm$ 0.10	0.82 $\pm$ 0.01
média	0.86	0.66	0.68	0.58	0.60	0.63

Tabela X I- Produção de IFN γ (ng/ml) por células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" diferentes concentrações de FAd, estimuladas com Con-A.

Exp.nº	FAd µg /animal			
	0	400	600	800
1	2.80±0.33	4.80±0.24	3.73±0.31	1.60±0.24
2	1.96±0.27	3.68±0.35	3.68±0.37	1.67±0.12
3	2.42±0.37	4.31±0.21	2.70±0.14	1.67±0.12
4	1.72±0.38	3.84±0.41	1.58±0.35	0.92±0.21
média	2.23	4.15	2.92	1.46

Tabela XII- Produção de IFN- γ (ng/ml) por células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" diferentes concentrações da fração FAd, estimuladas "in vitro" com FAd (5 μ g/ml).

Exp.n°	FAd μ g/animal			
	0	400	600	800
1	0.70 $\pm$ 0.09	0.88 $\pm$ 0.14	0.67 $\pm$ 0.11	0.64 $\pm$ 0.12
2	0.66 $\pm$ 0.12	1.22 $\pm$ 0.14	0.64 $\pm$ 0.21	0.58 $\pm$ 0.10
3	0.68 $\pm$ 0.12	0.85 $\pm$ 0.09	0.66 $\pm$ 0.10	0.58 $\pm$ 0.19
4	0.88 $\pm$ 0.09	0.82 $\pm$ 0.10	0.74 $\pm$ 0.21	0.76 $\pm$ 0.22
média	0.73	0.94	0.67	0.64

Tabela XIII- Produção espontânea de IFN- γ (ng/ml) por células esplênicas de camundongos CBA/J que receberam "in vivo" diferentes concentrações da fração FAd.

Exp.n°	FAd μ g/animal			
	0	400	600	800
1	0.70 $\pm$ 0.12	0.97 $\pm$ 0.16	0.88 $\pm$ 0.12	0.66 $\pm$ 0.14
2	0.82 $\pm$ 0.21	0.88 $\pm$ 0.12	0.60 $\pm$ 0.12	0.54 $\pm$ 0.24
3	0.84 $\pm$ 0.22	0.86 $\pm$ 0.14	0.70 $\pm$ 0.16	0.38 $\pm$ 0.07
4	0.88 $\pm$ 0.09	0.96 $\pm$ 0.22	0.78 $\pm$ 0.26	0.68 $\pm$ 0.32
média	0.81	0.91	0.74	0.56

8-REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- ANDREWS, N.W.; ALVES, M.J.M.; SCHUMACHER, R.I. & COLLI, W. 1985. *Trypanosoma cruzi* : protection in mice immunized with 8-Methoxypsoralen-inactivated trypomastigotes. **Exp.Parasitol.**60: 255-262.
- ASSOIAN, R.K.; FLEURDELYS, B.E.; STEVENSON, H.C.; MILLER, P.J.; MADTES, D.K.; RAINES, E.W.; ROSS, R. & SPORN, M.B. 1987. Expression and secretion of type β transforming growth factor by activated human macrophages. **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 84:6020-6024.
- BARRAL-NETO, M.; BARRAL, A.; BROWNELL, C.E.; SKEIKY, Y.A.W.; ELLINGSWORTH, L.R.; TWARDZIK, D.R. & REED, S.G. 1992. Transforming growth factor- β in leishmanial infection: a parasite escape mechanism. **Science** 257: 545-548.
- BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M.; YONG, E.C.; BROWNELL, C.E.; TWARDZIK, D.R. & REED, S.G. 1993. Transforming growth factor β as virulence mechanism for *Leishmania braziliensis* . **Proc.Natl.Acad.Sci.USA** 90:3442-3446.
- BARRAL-NETO, M. & BARRAL, A. 1994. Transforming growth factor in tegumentary leishmaniasis. **Braz.J.Med.Biol.Res.**27:1-9.
- BELOSEVIC, M.; FINBLOOM, D.S.; VAN DER MEIDE, P.H.; SLAYTER, M.V. & NACY, C.A. 1989. Administration of monoclonal anti-IFN- γ antibodies *in vivo* abrogates natural resistance of C3H/HeN mice to infection with *Leishmania major* . **J.Immunol.**143:266-274.
- BELTZ, L.A. & KIERSZENBAUM, F. 1987. Supression of human lymphocyte responses by *Trypanosoma cruzi* . **Immunol.**60:309-315.

- BELTZ, L.A.; KIERSZENBAUM, F. & SZTEIN, M.B. 1989. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* on activated human lymphocytes. **Infect.Immunity** 57:2301-2305.
- BERMUDEZ, L.E. 1993. Production of transforming growth factor- β by *Mycobacterium avium*-infected human macrophages is associated with unresponsiveness to IFN- γ . **J.Immunol.**150:1838-1845.
- BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y. & NATHAN, C. 1991. Macrophage deactivation by interleukin-10. **J.Exp.Med.**174: 1549-1555.
- BOGEN, S.A.; FOGELMAN, I. & ABBAS, A.K. 1993. Analysis of IL-2, IL-4, and IFN-gamma producing cells in situ during immune responses to protein antigens. **J.Immunol.**150:4197-4205.
- BRENER, Z. 1968. Terapêutica experimental. In: Cançado, JR., ed. Doença de Chagas. Belo Horizonte. **Imprensa Oficial do Estado de Minas Gerais**, p. 501-516.
- CHER, D.J. & MOSMANN, T.R. 1987. Two types of murine helper T cell clone. II- Delayed type hypersensitivity is mediated by Th1 clones. **J.Immunol.**138: 3688-3694.
- CHUA, K.Y.; STEWART, G.A.; THOMAS, W.R.; SIMPSON, R.J.; DILWORTH, R.J.; PLOZZA, T.M. & TURNER, K.J. 1988. Sequence analysis of cDNA coding for a major house dust mite allergen, Der p 1. Homology with cysteine proteases. **J.Exp.Med.**167:175-182.
- COFFMAN, R.L.; SEYMOUR, B.W.P.; LEBMAN, D.A.; HIRAKI, D.D.; CHRISTIANSEN, J.A.; SHRADER, B.; CHERWINSKI, H.M.; SAVELKOUL, H.F.J.; FINKELMAN, F.D.; BOND, M.W. & MOSMANN, T.R. 1988. The role of helper T cell products in mouse B cell differentiation and isotype regulation. **Immunol.Rev.** 102:5-28.

- COFFMAN, R.L.; VARKILA, K.; SCOTT, P. & CHATELAIN, R. 1991. Role of cytokines in the differentiation of CD4⁺ T cell subsets *in vivo*. **Immunol.Rev.**123: 189-207.
- CORSINI, A.C.; COSTA, M.G.; OLIVEIRA, O.L.P.; CAMARGO, I.J.B. & RANGEL, H.A. 1980. A fraction (FAd) from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes depresses the immune response in mice. **Immunol.**40:505-511.
- CORSINI, A.C. & COSTA, M.G. 1981. 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** 23:122-123.
- COX, F.E.G. & LIEW, E.Y. 1992. T-cell subsets and cytokines in parasitic infections. **Parasitol.Today** 8:371-374.
- CZARNIECKI, C.W.; CHIU, H.H.; WONG, G.H.W.; McCABE, S.M. and PALLADINO, M.A. 1988. Transforming growth factor β modulates the expression of class II histocompatibility antigens on human cells. **J.Immunol.**140: 4217-4223.
- DANIELPOUR, D.; DART, L.L.; FLANDERS, K.C.; ROBERTS, A.B. & SPORN, M.B. 1989. Immunodetection and quantitation of two forms of transforming growth factor beta (TGF- β 1 e TGF- β 2) secreted by cells in culture. **J.Cell.Physiol.**138:79-86.
- DENKERS, E.Y.; GAZZINELLI, R.T.; MARTIN, D. & SHER, A. 1993. Emergence of NK1.1⁺ cells as effectors of IFN-gamma dependent immunity to *Toxoplasma gondii* in MHC class I-deficient mice. **J.Exp.Med.**178:1465-1472.

- DING, A.; NATHAN, C.F.; GRAYCAR, J.; DERYNCK, R.; STUEHR, D.J. & SRIMAL, S. 1990. Macrophage deactivating factor and transforming growth factor beta 1,2,3 inhibit induction of macrophage nitrogen oxide synthesis by interferon-gamma. **J.Immunol.**145:940-944.
- DUNN, P.L. & NORTH, R.J. 1991. Early gamma-interferon production by natural killer cells is important in defense against murine listeriosis. **Infect.Immunity** 59:2892-2900.
- FARGEAS, C.; WU, C.Y.; NAKAJIMA, T.; COX, D.; NUTMAN, T. & DELESPESE, G. 1992. Differential effect of transforming growth factor β on the synthesis of Th1 and Th2-like lymphokines by human T lymphocytes. **Eur.J.Immunol.**22:2173-2176.
- FINKELMAN, F.D. & URBAN, J.F. JR. 1992. Cytokines: making the right choice. **Parasitol.Today** 8:311-314.
- FIORENTINO, D.F.; ZLOTNIK, A.; VIEIRA, P.; MOSMANN, T.R.; HOWARD, M.; MOORE, K.W. & ANNE O'GARRA. 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. **J.Immunol.**146:3444-3451.
- FLANDERS, K.C.; ROBERTS, A.B.; LING, N.; FLEURDELYS, B.E. & SPORN, M.B. 1988. Antibodies to peptides determinants in transforming growth factor β and their applications. **Biochemistry** 27:739-746.
- GAJEWSKI, T.F. & FITCH, F.W. 1988. Anti-proliferative effects of IFN-gamma in immune regulation. I- IFN-gamma inhibits the proliferation of Th2 not Th1 murine helper T lymphocyte clones. **J.Immunol.**140:4245-4252.
- GAJEWSKI, T.F.; PINNAS, M.; WONG, T. & FITCH, F.W. 1991. Murine Th1 and Th2 clones proliferate optimally in response to distinct antigen-presenting cell populations. **J.Immunol.**146:1750-1758.

- GAZZINELLI, R.T.; HAKIM, F.T.; HIENY, S.; SHEARER, G.M. & SHER, A. 1.991. Synergistic role of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes in IFN-gamma production and protective immunity induced by an attenuated *Toxoplasma gondii* vaccine. **J.Immunol.**146:286-292.
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; HIENY, S.; JAMES, S.L. & SHER, A. 1.992. The microbicidal activity of interferon-gamma treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent, nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin 10 and transforming growth factor beta. **Eur.J.Immunol.**22:2501-2506.
- GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; JAMES, S.L. & SHER, A. 1.992. IL-10 inhibits parasite killing and nitrogen oxide production by IFN-gamma activated macrophages. **J.Immunol.**148:1792-1796.
- GAZZINELLI, R.T.; XU, Y.; HIENY, S.; CHEEVER, A. & SHER, A. 1.992. Simultaneous depletion of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes is required to reactivate chronic infection with *Toxoplasma gondii* . **J.Immunol.**149:175-180.
- GOLDBERG, S.S.; CORDEIRO, M.N.; SILVA PEREIRA, A.A. & MARES-GUIA, M.L. 1.983. Release of lipopolysaccharide (LPS) from cell surface of *Trypanosoma cruzi* by EDTA. **Int.J.Parasitol.**13:11-18.
- GOLDEN, J.M. & TARLETON, R.L. 1.991. *Trypanosoma cruzi* : Cytokines effects on macrophages trypanocidal activity. **Exp.Parasitol.**72:391-402.
- HATCHER, F.M. & KUHN, R.E. 1.982. Destruction of *Trypanosoma cruzi* by natural killer cells. **Science** 218:295-296.

- JAMES, S.; KIPNIS, T.L.; SHER, A. & HOFF, R. 1982. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. **Infect.Immunity** 35:588-593.
- KARUPIAH, G.; WOODHAMS, C.E.; BLANDEN, R.V. & RAMSHAW, I.A. 1991. Immunobiology of infection with recombinant vaccinia encoding murine IL-2. Mechanisms of rapid viral clearance in immunocompetent mice. **J.Immunol.**147:4327-4332.
- KEHRL, J.H.; WAKEFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B.; JAKOWLEW, S.; ALVAREZ-MON, M.; DERYNCK, R.; SPORN, M.B. & FAUCI, A.S. 1986. Production of transforming growth factor β by human T lymphocytes and its potential role in the regulation of T cell growth. **J.Exp.Med.**163:1037-1050.
- KEHRL, J.H.; TAYLOR, A.; KIM, S.J. & FAUCI, A.S. 1991. Transforming growth factor-beta is a potent negative regulator of human lymphocytes. **Ann.N.Y.Acad.Sci.**628:345-353.
- KHAN, I.A.; ELY, K.H. & KASPER, L.H. 1994. Antigen-specific CD8⁺ T cell clone protects against acute *Toxoplasma gondii* infection in mice. **J.Immunol.**152:1856-1860.
- KIERSZENBAUM, F. 1981. On evasion of *Trypanosoma cruzi* from the host immune response. Lymphoproliferative responses to trypanosomal antigens during acute and chronic experimental Chagas'disease. **Immunol**44:641-648.
- KIERSZENBAUM, F.; CUNA, W.R.; BELTZ, L.A. & SZTEIN, M.B. 1989. *Trypanosoma cruzi* reduces the number of high-affinity IL-2 receptors on activated human lymphocytes by suppressing the expression of the p55 and p70 receptor components. **J.Immunol.**143:275-279.

- KIERSZENBAUM, F.; SZTEIN, M.B. & BELTZ, L.A. 1989. Decreased human IL-2 receptor expression due to a protozoan pathogen. **Immunol.Today** 10:129-131.
- KIERSZENBAUM, F.; CUNA, W.R.; BELTZ, L.A. & SZTEIN, M.B. 1990. Trypanosomal immunosuppressive factor: a secretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood mononuclear cells. **J.Immunol.**144:4000-4004.
- KIERSZENBAUM, F.; MORETTI, E. & SZTEIN, M.B. 1991. *Trypanosoma cruzi* induces suppression of DNA synthesis and inhibits expression of interleukin-2 receptors by stimulated human B lymphocytes. **Immunol.**74:317-322.
- KLIMPEL, G.R.; NIESEL, D.W.; ASSUNCION, M. & KLIMPEL, K.D. 1988. Natural killer cell activation and interferon production by peripheral blood lymphocytes after exposure to bacteria. **Infect.Immunity** 56:1436-1441.
- KOLLER, B.H.; MARRACK, P.; KAPPLER, J.W. & SMITHIES. 1990. Normal development of mice deficient in β 2M, MHC class I proteins, and CD8⁺ T cells. **Science** 248:1227-1230.
- KORENAGA, M.; HITOSHI, Y.; YAMAGUSHI, N.; SATO, Y.; TAKATSU, K. & TADA, I. 1991. The role of interleukin-5 in protective immunity to *Strongyloides venezuelensis* infection in mice. **Immunology** 72:502-507.
- LAWRENCE, D.A.; PIRCHER, R. & JULLIEN, P. 1985. Conversion of a high molecular weight latent β -TGF from chicken embryo fibroblasts into a low molecular weight active β -TGF under acidic conditions. **Biochem.Biophys.Res.Comm.**133:1026-1034.
- LE GROS, G.; BEN-SASSON, S.Z.; SEDER, R.; FINKELMAN, F.D. & PAUL, W.E. 1990. Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells *in vivo* and *in*

vitro : IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells. **J.Exp.Med.**172:921-929.

LEIST, T.P.; KOHLER, M.; EPPLER, M. & ZINKERNAGEL, R.M. 1989. Effects of treatment with IL-2 receptor specific monoclonal antibody in mice. Inhibition of cytotoxic T cell responses but not of T help. **J.Immunol.**143:628-632.

LEVIN, J. 1987. Estatística aplicada a Ciências Humanas. 2ª edição. **Editora Harbra Ltda.** SP. 193-265.

LIEW, F.Y., LI.Y. & MILLOTT, S. 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **J.Immunol.**145:4306-4310.

LOCKSLEY, R.M. & SCOTT, P. 1991. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Parasitol.Today** A58-61.

LOPEZ, H.M.; TANNER, M.K.; KIERSZENBAUM, F. & SZTEIN, M.B. 1993. Alterations induced by *Trypanosoma cruzi* in activated mouse lymphocytes. **Parasite Immunol.**15:273-280.

LOWRY, O.H.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L. & RANDER, R.J. 1951. Protein measurement with folin phenol reagent. **J.Biol.Chem.**193:265-275.

LUCAS, C.; BALD, L.N.; FEUDLY, B.M.; WORMS, M.M.; FIGARI, I.S.; PATZER, E.J. & PALLADINO, M.A. 1990. The autocrine production of transforming growth factor β , during lymphocyte activation - A study with a monoclonal antibody - based ELISA. **J.Immunol.**145:1415-1422.

- LYONS, R.M.; KESKI-OJA, J. & MOSES, H.L. 1988. Proteolytic activation of latent transforming growth factor- β from fibroblast-conditioned medium. **J.Cell Biol.**106:1659-1665.
- MAGILAVY, D.B.; FITCH, F.W. & GAJEWSKI, T.F. 1989. Murine hepatic accessory cells support the proliferation of Th1 but not Th2 helper T lymphocyte clones. **J.Exp.Med.** 170:985-990.
- MAGGI, E.; PARRONCHI, P.; MANETTI, R.; SIMONELLI, C.; PICCINNI, M.P.; RUGIU, F.S.; DE CARLI, M. & ROMAGNANI, S. 1992. Reciprocal regulatory effects of IFN-gamma and IL-4 on the *in vitro* development of human Th1 and Th2 clones. **J.Immunol.**148:2142-2147.
- MALECKAR, J.R. & KIERSZENBAUM, F. 1983. Inhibition of mitogen-induced proliferation of mouse T and B lymphocytes by bloodstream forms of *Trypanosoma cruzi* . **J.Immunol.**130:908-911.
- MILLER, A.; AL-SABBAGH, A.; SANTOS, L.M.B.; PRABHUDAS, M. & WEINER, H.L. 1993. Epitopes of myelin basic protein that trigger TGF β release after oral tolerization are distinct from encephalitogenic epitopes and mediate epitope-driven bystander suppression. **J.Immunol.**151:7307-7315.
- MINOPRIO, P.M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPERIO LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection. I. Quantitation of both T-and B-cell responses. **Scand.J.Immunol.**24:661-668.
- MIYAZONO, K.; ICHIJO, H. & HELDIN, C.H. 1993. Transforming growth factor beta: latent forms binding proteins and receptors. **Growth Fact.**8:11-22.
- MOSMANN, T.R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M.W.; GIEDLIN, M.A. & COFFMAN, R.L. 1986. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition

according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J.Immunol.**136:2348-2357.

MOSMANN, T.R. & MOORE, K.W. 1.991. The role of IL-10 in crossregulation of Th1 and Th2 responses. **Parasitol.Today** A49-A53.

MOSMANN, T.R.; SCHUMAKER, J.H.; STREET, N.F.; BUDD, R.; O'GARRA, A.; T.A.T.; BOND, M.W.; MOORE, K.W.; SHER, A. & FIORENTINO, D.F. 1.991. Diversity of cytokine synthesis and function of mouse CD4⁺ T cells. **Immunol.Rev.**123:209-229.

MULE, J.J.; SCHWARTZ, S.J.; ROBERTS, A.B. & ROSENBERG, S.A. 1.988. Transforming growth factor beta inhibits the *in vitro* generation of lymphokine-activated killer cells and cytotoxic T cells. **Cancer Immunol.Immunotherapy** 26:95-100.

MULLER, I. & LOUIS, J.A. 1.989. Immunity to experimental infection with *Leishmania major* : generation of protective L3T4⁺ cell clones recognizing antigen(s) associated with live parasites. **Eur.J.Immunol.**19:865-871.

NACY, C.A. 1.984. Macrophage activation to kill *Leishmania tropica* : characterization of a T cell-derived factor that suppresses lymphokine-induced intracellular destruction of amastigotes. **J.Immunol.**133:448-453.

NACY, C.A.; MEIEROVICS, A.I.; GREEN, S.J. & NELSON, B.J. 1.991. Cytokine networks and regulation of macrophage antimicrobial activities. **Prog.Leuk.Biol.** 11:271-276.

NELSON, B.J.; RALPH, P.; GREEN, S.J. & NACY, C.A. 1.991. Differential susceptibility of activated macrophage cytotoxic effector reactions to the suppressive effects of transforming growth factor-β1. **J.Immunol.**146:1849-1857.

- PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; PONS, F.G.; FALCOFF, E. & EISEN, H. 1984. Synergistic protection by specific antibodies and interferon against infection by *Trypanosoma cruzi* *in vitro*. **Eur.J.Immunol.**14:930-935.
- RAMARATHINAM, L.; NIESEL, D.W. & KLIMPEL, G.R. 1993. *Salmonella typhimurium* induces IFN- γ production in murine splenocytes- Role of natural killer cells and macrophages. **J.Immunol.**150:3973-3981.
- REED, S.G. 1988. *In vivo* administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **J.Immunol.**140:4342-4347.
- RUEGEMER, J.J.; HO.S.N.; AUGUSTINE, J.A.; SCHLAGER, J.W.; BELL, M.P.; McKEAN, D.J. & ABRAHAM, R.T. 1990. Regulatory effects of transforming growth factor- β on IL-2 and IL-4 dependent T cell cycle progression. **J.Immunol.**144:1767-1776.
- SADICK, M.D.; HEINZEL, F.P.; HOLADAY, B.J.; PU, R.T.; DAWKINS, R.S. & LOCKSLEY, R.M. 1990. Cure of murine leishmaniasis with anti-interleukin 4 monoclonal antibody. **J.Exp.Med.**171:115-127.
- SANTOS, L.M.B.; YAMADA, F.T. & SCHEINBERG, M.A. 1985. Monocyte and lymphocyte interaction in patients with advanced cancer. Evidence for deficient IL-1 production. **Cancer** 56:1553-1558.
- SANTOS, L.M.B.; AL-SABBAGH, A.; LONDONO, A. & WEINER, H.L. 1994. Oral tolerance to myelin basic protein induces regulatory TGF- β secreting T cells in Peyer patches of SJL mice. **Cell Immunol.** in press.

- SCOTT, M.T. & SNARY, D. 1979. Protective immunization of mice using cell surface glycoprotein from *Trypanosoma cruzi*. **Nature** **282**:73-74.
- SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E. & SHER, A. 1988. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J.Exp.Med.** **168**:1675-1684.
- SCOTT, P.; PEARCE, E.; CHEEVER, A.W.; COFFMAN, R.L. & SHER, A. 1989. Role of cytokines and CD4⁺ T cell subsets in the regulation of parasite immunity and disease. **Immunol.Rev.** **112**:161-182.
- SCOTT, P. 1991. IFN- γ modulates the early development of Th1 and Th2 responses in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **J.Immunol.** **147**:3149-3155.
- SEGURA, E.L.; PAULONE, I.; CERISOLA, J. & GONZALEZ CAPPA, S.M. 1976. Experimental Chagas'disease: protective activity in relation with sub cellular fractions of the parasite. **J.Parasitol.** **62**(1): 131-133.
- SHER, A.; GAZZINELLI, R.T.; OSWALD, I.P.; CLERICI, M.; KULLBERG, M.; PEARCE, E.J.; BERZOFISKY, J.A.; MOSMANN, R.T.; JAMES, S.L.; MORSE III, H.C. & SHEARER, G.M. 1992. Role of T-cell derived cytokines in the downregulation of immune responses in parasitic and retroviral infection. **Immunol.Rev.** **127**:183-204.
- SHER, A. & COFFMAN, R.L. 1992. Regulation of immunity to parasites by T cells and T cell-derived cytokines. **Ann.Rev.Immunol.** **10**:385-409.
- SHER, A.; OSWALD, I.P.; HIENY, S. & GAZZINELLI, R.T. 1993. Toxoplasma gondii induces a T-independent IFN- γ response in natural killer cells that requires both adherent accessory cells and tumor necrosis factor- α . **J.Immunol.** **150**:3982-3989.

- SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R. & REED, S.G. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGFB). **J.Exp.Med.**174:539-545.
- SILVA, J.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D. & REED, S.G. 1992. Interleukin 10 and Interferon- γ regulation of experimental *T.cruzi* infection. **J.Exp.Med.**175:169-174.
- SNARY, D. 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* : protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hygi.**77:126-129.
- SRIMAL, S. & NATHAN, C. 1990. Purification of macrophage deactivating factor. **J.Exp.Med.**171:1347-1361.
- SWAIN, S.L.; BRADLEY, L.M.; CROFT, M.; TONKONOGY, S.; ATKINS, G.; WEINBERG, A.D.; DUNCAN, D.D.; HEDRICK, S.M.; DUTTON, R.W. & HUSTON, G. 1991. Helper T subsets: phenotype, function, and the role of lymphokines in regulating their development. **Immunol.Rev.**123:115-144.
- SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SHREIBER, R. & REMINGTON, J.S. 1988. Interferon-g: the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii* . **Science** 240:516-518.
- SUZUKI, Y. & REMINGTON, J.S. 1990. The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. **J.Immunol.** 144:1954-1956.
- TAIBI, A.; PLUMAS-MARTY, B.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; SCHONECK, R.; PESSOA, H.; LOYENS, M.; PIRAS, R.; AGUIRRE, T.; GRAS-MASSE, H.; BOSSUS, M.; TARTAR, A.; CAPRON, A. & OUAISSI, A. 1993.

- SILVA, J.S.; TWARDZIK, D.R. & REED, S.G. 1991. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infections *in vitro* and *in vivo* by transforming growth factor beta (TGFB). **J.Exp.Med.**174:539-545.
- SILVA, J.S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D. & REED, S.G. 1992. Interleukin 10 and Interferon- γ regulation of experimental *T.cruzi* infection. **J.Exp.Med.**175:169-174.
- SNARY, D. 1983. Cell surface glycoproteins of *Trypanosoma cruzi* : protective immunity in mice and antibody levels in human chagasic sera. **Trans.R.Soc.Trop.Med.Hygi.**77:126-129.
- SRIMAL, S. & NATHAN, C. 1990. Purification of macrophage deactivating factor. **J.Exp.Med.**171:1347-1361.
- SWAIN, S.L.; BRADLEY, L.M.; CROFT, M.; TONKONOGY, S.; ATKINS, G.; WEINBERG, A.D.; DUNCAN, D.D.; HEDRICK, S.M.; DUTTON, R.W. & HUSTON, G. 1991. Helper T subsets: phenotype, function, and the role of lymphokines in regulating their development. **Immunol.Rev.**123:115-144.
- SUZUKI, Y.; ORELLANA, M.A.; SHREIBER, R. & REMINGTON, J.S. 1988. Interferon- γ : the major mediator of resistance against *Toxoplasma gondii* . **Science** 240:516-518.
- SUZUKI, Y. & REMINGTON, J.S. 1990. The effect of anti-IFN- γ antibody on the protective effect of lyt-2+ immune T cells against toxoplasmosis in mice. **J.Immunol.** 144:1954-1956.
- TAIBI, A.; PLUMAS-MARTY, B.; GUEVARA-ESPINOZA, A.; SCHONECK, R.; PESSOA, H.; LOYENS, M.; PIRAS, R.; AGUIRRE, T.; GRAS-MASSE, H.; BOSSUS, M.; TARTAR, A.; CAPRON, A. & OUAISSI, A. 1993.

- Trypanosoma cruzi* : immunity-induced in mice and rats by trypomastigote excretory-secretory antigens and identification of a peptide sequence containing a T cell epitope with protective activity. **J.Immunol.**151:2676-2689.
- TAMASHIRO, W.M.S.C.; REPKA, D.; SAKURADA, J.K.; CAMARGO, I.J.B.; ARAUJO, P.M.F.; ATTA, A.M. & RANGEL, H.A. 1983. *Trypanosoma cruzi* : surface antigenic determinants. **Z.Parasitenk.**69: 425-434.
- TARLETON, R.L.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A. & POSTAN, M. 1992. Susceptibility of B2-microglobulin-deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature** 356:338-340.
- TEIXEIRA, H.C. & KAUFMANN, S.H. 1994. Role of NK1.1⁺ cells in experimental listeriosis. NK1.1⁺ cells are early IFN- γ producers but impair resistance to *Listeria monocytogenes* infections. **J.Immunol.**152:1873-1882.
- TORRICO, F.; HEREMANS, H.; RIVERA, M.T.; VAN MARCK, E.; BILLIAU, A. & CARLIER, Y. 1991. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J.Immunol.**146:3626-3632.
- URBAN, J.F.JR.; MADDEN, K.B.; CHEEVER, A.W.; TROTTA, P.P.; KATONA, I.M. & FINKELMAN, F.D. 1993. IFN inhibits inflammatory responses and protective immunity in mice infected with the nematode parasite, *Nippostrongylus brasiliensis*. **J.Immunol.**151:7086-7094.
- VAN VOORHIS, W.C. 1992. Coculture of human peripheral blood mononuclear cells with *Trypanosoma cruzi* leads to proliferation of lymphocytes and cytokine production. **J.Immunol.**148:239-248.
- WAHL, S.M.; HUNT, D.A.; WONG, H.L.; DOUGHERTY, S.; MCCARTNEY-FRANCIS, N.; WAHL, L.M.; ELLINGSWORTH, L.; SCHMIDT, J.A.; HALL, G.; ROBERTS, A.B. & SPORN, M.B. 1988. Transforming growth factor- β is

a potent immunosuppressive agent that inhibits IL-1-dependent lymphocyte proliferation. **J.Immunol.** 140:3026-3032.

WAHL, S.M. 1.992. Transforming growth factor beta (TGFB) in inflammation: a cause and a cure. **J.Clin.Immunol.**12:61-74.

WIRTH, J.J.; KIERSZENBAUM, F.; SONNENFELD, G. & ZLOTNIK, A. 1.985. Enhancing effects of gamma interferon on phagocytic cell association with and killing of *Trypanosoma cruzi* . **Infect.Immunity** 49:61-66.