



DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E IMUNOLOGIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA

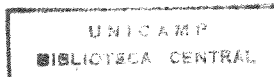
“Alterações da resposta imune à infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*, induzidas pela infecção concomitante com um Coronavírus murino”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) *Liana Maria Cardoso Verinaud* e aprovada pela Comissão Julgadora. *20/4/96*

Dissertação apresentada ao Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas, para obtenção do título de Doutor em Ciências Biológicas, área de Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL
Aluna: LIANA MARIA CARDOSO VERINAUD

Campinas - São Paulo
1996



71609896

CM-00085460-3

ADP	BC
RAMADA:	
+ UNICAMP	
V 588 a	
Ed	
PC 07/27988	
S. 667/96	
: <input type="checkbox"/> D <input checked="" type="checkbox"/>	
CO 88 11,00	
TA 05/07/96	
CPD	

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

V588a Verinaud, Liana Maria Cardoso
Alterações da resposta imune à infecção experimental
pelo Trypanosoma cruzi, induzidos pela infecção
concomitante com um Coronavirus murino / Liana Maria
Cardoso Verinaud. -- Campinas, SP : [s.n.], 1996.

Orientador: Humberto de Araújo Rangel.
Tese (doutorado) - Universidade Estadual de Campinas
Instituto de Biologia.

1. Trypanosoma cruzi. 2. *Coronavirus murino.
3. Doença de Chagas. I. Rangel, Humberto de Araújo.
II. Universidade Estadual de Campinas. Instituto de Biologia.
I. Título.

Este trabalho foi realizado no Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Universidade Estadual de Campinas e contou com o apoio financeiro das seguintes instituições:

- *FUNDAÇÃO de AMPARO à PESQUISA do ESTADO DE SÃO PAULO* (processo nº 91/5055-7)

- *FUNDAÇÃO de APOIO ao ENSINO e à PESQUISA/UNICAMP* (processo nº 1054/91)

LOCAL E DATA: Campinas, 30 de Abril de 1996

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

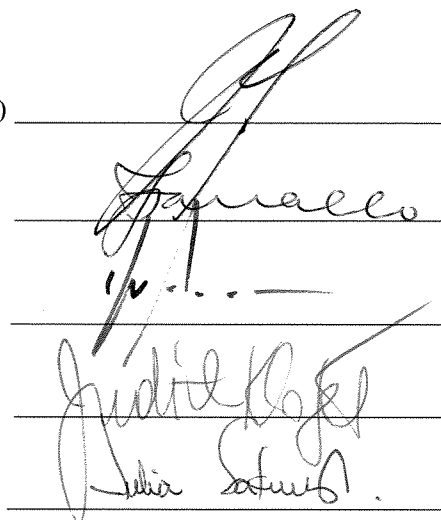
Prof. Dr. HUMBERTO DE ARAÚJO RANGEL (ORIENTADOR)

Prof. Dr. JOSÉ VASSALLO

Prof. Dr. OSVALDO A. SANT'ANNA

Profa. Dra. JUDITH K. KLOTZEL

Profa. Dra. JÚLIA K. SAKURADA

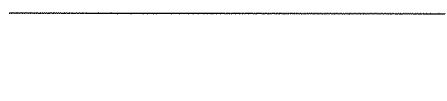


The image shows four handwritten signatures in black ink, each written over a horizontal line. The signatures are: 1. Humberto de Araújo Rangel (top), 2. José Vassallo, 3. Judith K. Klotzel, and 4. Júlia K. Sakurada (bottom). The signatures are written in a cursive style.

SUPLENTES:

Prof. Dr. IRINEU J. B. CAMARGO

Profa. Dra. DAGMAR R. STACH-MACHADO



Two horizontal lines are provided for the signatures of the substitute examiners, Prof. Dr. Irineu J. B. Camargo and Profa. Dra. Dagmar R. Stach-Machado. No signatures are present on these lines.

APROVADA

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel, pela orientação e amizade.

Ao Prof. Dr. José Vassallo, pela análise histopatológica.

Aos membros da pré-banca, Profa. Dra. Júlia K. Sakurada, Prof. Dr. Irineu J. B. Camargo, Profa. Dra. Judith K. Kloetzel, Prof. Dr. José Vassallo e Prof. Dr. Osvaldo Sant'Anna, pelas valiosas sugestões.

Ao pessoal do laboratório, em especial Cristina Colombari, Dirce Lima Gabriel e Ismália Menegon Doné, pela paciência e preciosa colaboração.

Ao pessoal da secretaria, em especial, Lúcia Helena Vicentim e Maria de Lourdes Fagundes, pela presteza.

Aos amigos do Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da Unicamp, pelo incentivo.

“Uma nova verdade científica não se estabelece convencendo seus oponentes, mas pelo fato de que estes adversários finalmente morrem e nasce uma outra geração familiarizada com a nova verdade”.

Max Planck (1858-1947)

ÍNDICE

I. INTRODUÇÃO.....	01
II. MATERIAIS E MÉTODOS.....	10
1. Animais de laboratório.....	10
2. Parasitas.....	10
3. Teste de Produção de Anticorpos.....	12
4. Testes de Imunofluorescência Indireta.....	12
5. Testes de Patogenicidade.....	13
6. Parasitemia e mortalidade.....	13
7. Isolamento do vírus.....	13
8. Determinação da DL ₅₀	14
9. Anticorpos Policlonais.....	14
10. Testes de Neutralização.....	15
11. Leucograma.....	15
12. Determinação da Variação do Peso e do Número de células em órgãos linfóides.....	15
13. Anticorpos Monoclonais.....	16
14. Imuno-Histoquímica.....	16
15. Histopatologia.....	17
16. Método estatístico.....	17
III. RESULTADOS.....	18
1. Obtenção de estoques do parasita livres de contaminação.....	18
2. Testes de patogenicidade com os diferentes estoques do parasita.....	19
3. Isolamento e caracterização do fator presente no plasma de animais infectados com o estoque Y _{2orig}	21
4. Determinação da DL ₅₀ do vírus.....	22
5. Testes de patogenicidade com o vírus isolado.....	23
6. Testes de neutralização.....	25
7. Alterações na resposta imune indizadas pela presença de um contaminante.....	26
7.1. Leucograma.....	27
7.2. Alterações no peso, celularidade e histopatológicas em diferentes órgãos linfóides....	29
IV. DISCUSSÃO.....	43
V. RESUMO.....	55
VI. NOTA FINAL.....	56
VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	57

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, é endêmica em quase toda América Latina e a principal causa de morbidade entre a população carente da América do Sul, afetando aproximadamente 18 milhões de pessoas (WHO, 1991).

Experimentalmente, a Doença de Chagas tem sido estudada em diferentes espécies de animais: coelhos (Teixeira *et al.* 1975), cães (Tanowitz *et al.*, 1942; Pifano *et al.*, 1962), macacos (Marsden *et al.*, 1970; Seah *et al.*, 1974), ratos (Culbertson & Kolodny, 1938) e camundongos (Chagas, 1909). Camundongos e ratos são, frequentemente, os modelos mais utilizados para o estudo da fase aguda da Doença de Chagas, enquanto que coelhos, cães, cobaias e macacos têm sido utilizados como modelos para a fase crônica da doença (WHO, 1977).

Quando camundongos são infectados pelo parasita, há uma fase aguda inicial, na qual altos níveis de parasitas são detectáveis no sangue circulante (Brener, 1980). Esta é seguida por uma fase crônica que perdura por toda vida do animal e é caracterizada por um extenso parasitismo tecidual, além da impossibilidade de se detectar parasitas na corrente circulatória através de métodos diretos (Andrade, 1991).

Várias abordagens têm sido feitas na tentativa de se entender que tipo de interação ocorre entre o parasita e o hospedeiro, e como esta interação pode direcionar o curso da infecção. Para tal, os mecanismos específicos e inespecíficos da resposta imune têm sido intensivamente investigados.

O papel de macrófagos, como primeira linha de defesa do organismo contra microorganismos intracelulares, já é conhecido desde há muito (Taliaferro & Pizzi, 1955; Mackaness, 1969). Kierzenbaum *et al.* (1974) demonstraram que o tratamento de macrófagos com sílica, substância capaz de bloquear a fagocitose, torna camundongos mais susceptíveis à infecção com *Trypanosoma cruzi*, mesmo quando cepas avirulentas do parasita são utilizadas. O tratamento dos animais, durante a infecção pelo parasita, com substâncias imunomoduladoras, capazes de estimular e ativar macrófagos, têm demonstrado um papel protetor importante para estas células no desenvolvimento da infecção (Kierszenbaum & Ferraressi, 1979; James *et al.*, 1982). Borges *et al.* (1992), entretanto,

ressaltam que a ativação de macrófagos peritoneais, medida pela liberação de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), varia de acordo com a espécie do animal experimental e com a cepa do parasita. Entretanto, uma maior ativação dos macrófagos, medida pela produção de H_2O_2 e pela secreção de Fator de Necrose Tumoral (TNF), foi encontrada por Russo *et al.* (1989) em animais susceptíveis à infecção. Os autores sugerem que o alto nível de TNF nestes animais seja o responsável pelo aumento da susceptibilidade durante a infecção.

Sabe-se que na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, como por outros microorganismos intracelulares obrigatórios, as reações específicas, associadas às células imune competentes, têm um papel significativo (Russo *et al.*, 1988; Tarleton, 1990; Nickell *et al.*, 1993; Sato *et al.*, 1992). Neste sentido parece haver o envolvimento tanto do braço humoral quanto do braço celular da resposta imune.

Alguns autores sugerem que a susceptibilidade e/ou resistência ao parasita está associada à resposta imune humoral específica, em particular à capacidade de determinadas linhagens de camundongos produzirem anticorpos líticos capazes de destruir o parasita com o auxílio do sistema complemento, de facilitar a fagocitose e de favorecer a citotoxicidade mediada por células (Lima-Martins *et al.*, 1985; Lages-Silva *et al.*, 1987). Animais neonatos tratados com soro anti- μ , isto é, depletados de células B (responsáveis pela produção de anticorpos), apresentam uma diminuição da resistência ao parasita (Rodriguez *et al.*, 1981).

No entanto, a presença de anticorpos dirigidos contra antígenos do próprio hospedeiro são encontrados no soro de animais infectados pelo parasita, sugerindo que, ao lado de respostas específicas ao parasita, exista uma proliferação e uma ativação policlonal, levando ao aparecimento de clones de células B auto-reativas (Minóprio *et al.*, 1988).

Por outro lado, vários trabalhos têm sugerido que o controle da fase aguda da infecção esteja relacionado com o braço celular da resposta imune, onde células T exerceriam um efeito anti-parasita precoce e anterior à produção de anticorpos (Trischmann, 1983; 1984). A infecção experimental utilizando animais timectomizados, tratados com anticorpos anti-células T ou ainda, usando animais sem timo ("nude"), invariavelmente leva à morte (Roberson *et al.*, 1973; Kierszenbaum & Pienkowski, 1979; Trischmann & Bloom, 1980). Além disso, a transferência de células T isoladas de animais

infectados é capaz de proteger outro animal singeneico de uma infecção letal (Reed, 1980; Nickell *et al.*, 1987). Minóprio *et al.* (1986) demonstraram que várias linhagens de camundongos apresentam uma proliferação marcante de linfócitos T, sugerindo que estas células tenham uma participação essencial no desenvolvimento da resistência ao parasita. No entanto, o papel preciso de células T, apresentando diferentes marcadores fenotípicos ($CD4^+$ / $CD8^+$), não foi ainda esclarecido.

Vários trabalhos têm sugerido um papel efetivo para células $CD4^+$ durante a fase aguda e crônica da infecção. Araújo (1989) observou que camundongos tratados com anticorpos anti- $CD4$, imunizados com formas epimastigotas da cepa Tulahuen e depois desafiados com formas sanguícolas do parasita, tornam-se mais susceptíveis pois desenvolvem respostas celular e humoral bastante comprometidas. Entretanto, Minóprio (1991) observou que animais sem células $CD4^+$ apresentam uma resposta inflamatória de menor intensidade e uma maior resistência à infecção. Resultados aparentemente discrepantes podem refletir apenas diferenças no padrão de citocinas produzidas e liberadas por células T $CD4^+$ (De Maeyer & De Maeyer-Guinard, 1992).

Há hoje um conjunto considerável de evidências sugerindo que as respostas humoral e celular mediadas por células $CD4^+$ são, em realidade, funções de sub-populações distintas denominadas T helper 1 (Th1) e T helper 2 (Th2). Assim, células Th1 seriam responsáveis pela resposta imune celular gerando, entre outras citocinas, Interleucina 2 (IL-2), Interferon gama (Interferon γ), TNF α e β (fator de necrose tumoral alfa e beta). As células Th2 seriam responsáveis pela resposta imune humoral gerando, Interleucina 4 (IL-4), Interleucina 5 (IL-5), Interleucina 6 (IL-6) e Interleucina 10 (IL-10) (Mosman & Coffman, 1989). Um terceiro tipo de células $CD4^+$, denominadas de Th0, seriam capazes de produzir IL-2, IL-4, IL-5 e IFN γ simultaneamente (Firestein *et al.*, 1989). Está bem documentado que a resposta das diferentes sub-populações nem sempre é benéfica para o hospedeiro. Um exemplo disto é a geração de uma resposta letal com ativação de células Th2 no camundongo BALB/c, quando infectado com *Leishmania major* (Coffman *et al.*, 1991). Em contraste, camundongos C3H desenvolvem uma resposta protetora através da ativação de células Th1. É interessante notar que a inoculação em BALB/c de anticorpos anti-IL 4, que inibem a geração de células Th2, ou anti-IL 12, capazes de gerar células Th1, protege o

animal da morte induzida pela *L. major* (Heinzel *et al.*, 1993; Hsieh *et al.*, 1993).

Esta dicotomia da resposta não parece dominar na infecção com *Trypanosoma cruzi*, porque animais susceptíveis produzem os dois tipos de resposta, ou seja, são capazes de produzir o IFN γ , típico de uma resposta gerada por Th1, e também IL-10, interleucina típica de uma resposta Th2 (Silva *et al.*, 1992).

Recentemente, Reed *et al.* (1994) sugerem um mecanismo de interação entre citocinas, podendo uma antagonizar os efeitos de outra(s) para explicar resultados aparentemente conflitantes. Os autores demonstram que a produção de IL-10 ocorre numa fase bastante precoce da infecção e sugerem que o bloqueio de sua ação, ao invés do bloqueio de sua produção, possa ser o mecanismo de exacerbação da infecção.

A ativação policlonal de células T, em associação com a produção de imunoglobulinas que reconhecem antígenos próprios, sugere que durante a infecção vários clones de linfócitos T, mais especificamente células CD4⁺, são ativados, inclusive aqueles que geram resposta auto-reativa, e que estes clones teriam uma participação efetiva no desenvolvimento das lesões teciduais observadas durante a fase crônica da infecção.

A participação de células T CD8⁺ na eliminação de microorganismos intracelulares como *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium tuberculosis* e *Listeria monocytogenes* também tem sido relatada (Milon & Louis, 1993; Tarleton *et al.*, 1992)

Tarleton, em 1990, demonstrou que a depleção de células T expressando o marcador CD8⁺ (células citotóxicas/supressoras) na fase precoce da infecção torna o camundongo C57BL6/J, normalmente resistente, incapaz de controlar a parasitemia e aumenta a taxa de mortalidade. A depleção de células CD8⁺ na fase crônica da infecção não tem nenhum efeito sobre o mesmo animal, não sendo, inclusive, observada a reativação da infecção ou uma segunda fase aguda se o animal for reinfectado.

Recentemente, Rottenberg *et al.* (1993) demonstraram alta parasitemia e alta taxa de mortalidade em camundongos mutantes (gerados por tecnologia "knockout") depletados de células que expressam marcadores CD4⁺ e CD8⁺. A dramática susceptibilidade destes animais à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* reforça a idéia que células T têm um papel fundamental na resistência contra este parasita.

Muito embora clones de células B e T estejam sendo ativados durante a fase

aguda da infecção pelo parasita (Minoprio *et al.*, 1986), uma supressão transitória da resposta, dirigida contra antígenos não relacionados com o parasita e para mitógenos específicos destas células, tem sido reportada (Hayes & Kierszenbaum, 1981; O'Daly *et al.*, 1984; Lalonde *et al.*, 1985; Kierszenbaum *et al.*, 1994). Portanto, imunossupressão vem sendo considerada uma característica da fase aguda da infecção com *Trypanosoma cruzi*, não importando se a doença evolui para a letalidade ou para a cronicidade.

Entretanto, o fenômeno de imunossupressão é descrito na maioria das vezes, quando se observa o compartimento de células imunes do baço (O'Daly *et al.*, 1984; Lalonde *et al.*, 1985). Lafaille *et al.* (1990) estudando a resposta específica a antígenos do parasita, em diferentes compartimentos linfóides, observaram que respostas proliferativas específicas de células T podem ser detectadas nos linfonodos durante toda a fase aguda da infecção, embora as células do baço não respondam a antígenos ou à estimulação com lectinas. Este estudo sugere a importância de células de outros compartimentos linfóides, que não o baço, e demonstra que a imunossupressão pode não ser um fenômeno comum a todos os órgãos envolvidos na resposta ao parasita.

Os mecanismos responsáveis por essa supressão da resposta imune são complexos, multi-fatoriais e ainda não completamente compreendidos. A inibição da expressão de receptores para IL-2 (Beltz *et al.*, 1988; Kierszenbaum *et al.*, 1991) e a redução na produção desta interleucina (Soong & Tarleton, 1992) têm sido exaustivamente investigadas devido ao papel central desta citocina como fator primário de crescimento de célula T e como reguladora de muitas respostas imunes. Tem sido descrito que a administração, "in vitro" e "in vivo", de IL-2 restaura parcial ou completamente a capacidade funcional de células imunes de animais infectados com o parasita (Tarleton & Kuhn, 1984; Hulsebos *et al.*, 1989). Entretanto, também tem sido descrito que a IL-2 não é capaz de restaurar a resposta de linfócitos, obtidos de animais infectados com *Trypanosoma cruzi*, para diversos mitógenos ou de linfócitos humanos colocados em cultura com o parasita (Fucs & Barcinski, 1987; Beltz *et al.*, 1988). Estes resultados discrepantes têm sido atribuídos ao uso de diferentes cepas do parasita ou diferentes linhagens de animais. Recentemente, Kierszenbaum *et al.* (1993) sugeriram que a controversia sobre os efeitos corretivos de IL-2 poderia, na verdade, refletir apenas variações na extensão da supressão

da resposta apresentada em diferentes modelos experimentais de imunossupressão associada ao parasita.

Uma outra citocina tem merecido atenção especial, o Interferon gama (IFN γ). Esta citocina tem sido descrita como imunoregulatória (Vandekerckhove *et al.*, 1994) e como um potente ativador de macrófagos capacitando-os à eliminação de parasitas intracelulares (James *et al.*; 1982; Pfefferkorn & Guyre, 1983).

No caso da infecção com o *Trypanosoma cruzi* o IFN γ é capaz de inibir, "in vitro", o seu desenvolvimento (Plata *et al.*, 1984) e, "in vivo", é capaz de diminuir a parasitemia e prolongar a sobrevivência de camundongos infectados (Plata *et al.*, 1987). Entretanto, linhagens de animais geneticamente susceptíveis à infecção pelo parasita produzem níveis relativamente significantes de IFN γ e, apesar de altos níveis desta citocina serem encontrados em animais resistentes, o parasita é capaz de estabelecer uma infecção crônica (Hoft *et al.*, 1993).

Beltz *et al.* (1989) demonstraram um efeito supressor do parasita sobre a produção/secreção de IFN γ por células esplênicas de camundongos infectados. Entretanto, os autores ressaltam que a redução na produção desta citocina parece ser apenas uma consequência maior da supressão induzida pelo parasita, uma vez que IFN γ exógeno não é capaz de restaurar a resposta celular, em termos de linfoproliferação medida pela incorporação de timidina marcada com tritium.

Muito embora o hospedeiro seja capaz de responder e até de controlar a infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, não é capaz de eliminá-la por completo devido, provavelmente, à alterações nas células envolvidas na resposta imune. Além disso, a evolução da infecção também depende, evidentemente, de fatores relacionados com o parasita. De fato, as amostras isoladas apresentam diferenças acentuadas quanto à virulência (Phillips, 1960; Brener, 1977).

A existência de diversas manifestações patológicas pode ser parcialmente atribuída à características das sub-populações de *Trypanosoma cruzi*, indicando uma variação intra-específica muito grande. Essa variação tem sido observada quanto à morfologia de formas circulantes (Brener, 1965), tropismo tecidual (Melo & Brener, 1978), letalidade (Andrade

et al., 1985) e susceptibilidade aos mecanismos imunes (Krettli *et al.*, 1979). Vários autores têm isolado cepas do parasita que apresentam características biológicas diferentes. Um exemplo disto é a existência de formas polares do parasita, as cepas Y e CL. Enquanto parasitas da cepa CL são encontrados, principalmente, em células musculares, os da cepa Y infectam, preferencialmente, macrófagos (Melo & Brener, 1978). Pode-se citar ainda o exemplo da cepa RA isolada de uma criança com Doença de Chagas aguda, que é altamente virulenta para camundongos e induz a produção de anticorpos opsonizantes (Muller *et al.*, 1986) enquanto que, a cepa K98 obtida de um paciente com cardiomiopatia crônica não é letal para o camundongo e induz pobremente a produção de anticorpos opsonizantes (Celentano & Gonzáles Cappa, 1992).

O curso da infecção experimental, utilizando-se uma mesma cepa do parasita, varia muito de acordo com as características do hospedeiro, sexo e estímulos antigênicos anteriores (Krettli & Brener, 1982; Camargo *et al.*, 1989; Camargo *et al.*, 1991; Calabrese *et al.*, 1991). Diferentes linhagens de animais apresentam diferentes quadros de evolução da doença. Assim, camundongos BALB/c são altamente susceptíveis à infecção com *Trypanosoma cruzi*, desenvolvendo altos níveis de parasitemia e mortalidade , enquanto que animais C57BL6/J são resistentes a desafios semelhantes (Nogueira *et al.*, 1981; Wrightsman *et al.*, 1982; Trischmann, 1986). Os fenômenos de resistência e susceptibilidade parecem ser governados por fatores genéticos múltiplos incluindo pelo menos um gene em um locus próximo ou dentro do complexo maior de histocompatibilidade (Trischmann *et al.*, 1978; Wrightsman *et al.*, 1984).

Estoques do parasita obtidos de diferentes laboratórios devem comportar-se de maneira diferente uma vez que são submetidos à diferentes pressões genéticas resultantes das condições particulares utilizadas para sua manutenção.

Em adição à variabilidade do parasita deve-se considerar também a diversidade do modelo animal utilizado para experimentação. O uso de animais isogênicos reduz grandemente a variação dos resultados induzida pelas diferenças intra-específicas dos hospedeiros. Está bem estabelecido que além do arcabouço genético, o estado sanitário dos animais de laboratório e o meio ambiente influenciam grandemente os resultados na pesquisa biomédica (Melby & Balk, 1983). O estado de saúde do animal pode,

efetivamente, intervir na sua resposta, uma vez que algumas infecções podem alterar a resposta imunológica dos indivíduos (Mims, 1986).

A manutenção das formas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* nos laboratórios que desenvolvem pesquisas com o parasita é realizada através de repiques, por ocasião dos picos de parasitemia, de sangue de hospedeiros previamente infectados. A cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, por exemplo, foi isolada há cerca de 40 anos (Pereira Da Silva & Nussensweig, 1953) em camundongos Swiss e desde então mantida em animais de laboratório. Como esses animais têm sido criados em condições favoráveis à infecção natural com patógenos murinos, inclusive vírus de difícil detecção e controle, pode-se esperar que junto com o *Trypanosoma cruzi* sejam transferidas também amostras de um ou mais patógenos murinos. A presença destes, pode modular a resposta imune do hospedeiro, levando a variações nos resultados experimentais obtidos (Fujiwara, 1988; Smith *et al.*, 1992; Fujiwara & Wagner, 1994).

Uma grande variedade de eventos têm sido descritos em modelos animais durante a fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Além disso, resultados discrepantes e não repetitivos podem ser observados, por exemplo, nos níveis de parasitemia e na taxa de mortalidade de animais CBA inoculados com estoques diferentes da cepa Y do parasita (Corsini *et al.*, 1980; Camargo *et al.*, 1991).

As infecções murinas naturais são de difícil prevenção e controle em colônias mantidas de modo convencional, isto é, sem a presença de barreiras protetoras. Isoladores, gaiolas protegidas com filtro e a acomodação dos animais em sistemas de fluxo laminar são métodos eficientes para se evitar a introdução do vírus na colônia e sua subsequente disseminação (Dillehay *et al.*, 1990). A presença de pessoal técnico especializado, seguindo rígidos protocolos de manipulação com os animais, também é essencial para a manutenção de colônias livres de patógenos contaminantes.

Com a crescente divulgação de que patógenos, de ocorrência natural em murinos, poderiam alterar os resultados obtidos na pesquisa científica que utiliza animais de laboratório, começaram a surgir em países avançados os primeiros centros especializados em Ciência e Tecnologia de animais de laboratório. A técnica de obtenção de animais em condições assépticas, através da derivação cesariana, aliada ao uso de unidades isoladoras

(Trexler), possibilitou o estabelecimento de colônias com diferentes estados sanitários, quais sejam, as axênicas (livres de germes), as gnotobióticas (com flora bacteriana conhecida) e as SPF (specific pathogen free).

A implantação de um centro especializado na criação de animais SPF na Universidade Estadual de Campinas, o CEMIB-UNICAMP, possibilitou a utilização destes animais, absolutamente controlados do ponto de vista genético e sanitário, na pesquisa científica (vide nota final). Desta forma, há cerca de cinco anos temos recebido camundongos SPF do CEMIB-UNICAMP e temos mantido estes animais em isoladores, o que nos possibilita o estudo da resposta imune ao *Trypanosoma cruzi* sem a interferência de outros patógenos associados.

Considerando-se que as cepas de *Trypanosoma cruzi* vinham sendo mantidas em camundongos convencionais alguns dos resultados discrepantes, encontrados com a infecção experimental pelo parasita, poderiam ser devido à interferência de patógenos murinos, e já dispondo de tecnologia necessária para abordar esta hipótese, nos propusemos a investigar se as cepas do parasita estariam realmente contaminadas e se esta contaminação estaria interferindo na resposta do hospedeiro.

MATERIAIS E MÉTODOS

1. Animais de laboratório

Camundongos de quatro e oito semanas de idade e ambos os sexos, das linhagens CBA e BALB/c foram utilizados durante os experimentos. Para obtenção de anticorpos monoclonais e no isolamento de vírus, dispôs-se de animais imunodeficientes (CB17 scid/scid, BALB/c nnu/nu e CBA nu/nu) Todos os animais foram obtidos do CEMIB-UNICAMP à partir de colônias livres de patógenos específicos (SPF), mantidas sob barreiras. Testes sorológicos realizados pelo Serviço de Controle Viroológico do CEMIB-UNICAMP, para detecção de infecções virais nestas colônias, executados a cada 3 meses desde janeiro de 1989, não apresentaram nenhum resultado positivo para os seguintes vírus: mouse hepatitis virus (MHV-3), Theiler's mouse encephalomyelitis virus cepa GDV II (TMEV-GDV II), pneumonia virus of mice (PVM), Sendai virus, minute virus of mice (MVM), vaccinia, lymphocytic choriomeningitis virus (LCMV), mouse adenovirus, polyoma virus, K virus, reovirus (REO-3), mouse cytomegalovirus (MCMV), rotavirus e lactate dehydrogenase elevating virus (LDHV). A detecção de infecção viral foi feita através de testes de inibição de hemaglutinação para K virus e MVM (Parker & Richter, 1982), "LDH-elevation end point" para LDHV (Dillberger et al., 1987) e testes de imunofluorescência indireta para os outros vírus acima mencionados (Kraft & Meyer, 1986). Todos os experimentos foram realizados em triplicat a e os animais sempre mantidos em isoladores tipo Trexler.

2. Parasitas

As cepas Y (Silva & Nussenzweig, 1953) e CL (Brenner & Chiari, 1963) de *Trypanosoma cruzi* foram utilizadas.

O cepa Y foi recebida do Prof. Brenner em 1972 e até 1989 mantida em nosso laboratório através da infecção semanal de camundongos Swiss, mantidos de modo convencional, com 10^5 formas sanguícolas injetadas intraperitonealmente. De 1989 até 1991 esta cepa de parasitas foi mantida em camundongos CBA, obtidos de colônias SPF porém ainda alojados em biotério convencional, e foi denominada Y_{2orig} . À partir de então, até a

presente data, todos os animais experimentais são obtidos de colônias SPF e mantidos em isoladores do tipo Trexler.

O estoque denominado Y_{2TC} foi obtido cultivando-se os parasitas do estoque Y_{2orig} em células LCC-MK2 em meio RPMI suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado, 2mM de L-glutamina, penicilina (100U/ μ l) e estreptomicina (100 g/ μ l). Após dez passagens em cultura de células, os parasitas foram colhidos e 10^5 formas tripomastigotas foram injetadas em CBA que foram mantidos em condições assépticas dentro de isolador. Os parasitas foram, então, mantidos através da transferência semanal de 10^5 formas sanguícolas para camundongos CBA mantidos sempre em isolador do tipo Trexler.

O estoque denominado Y_{2NNN} foi obtido através da cultura de parasitas do estoque Y_{2orig} à 28^oC por quinze dias em meio Nicolle-Novy-McNeal (NNN), com algumas gotas de meio LIT (Liver Infusion Tryptose). Depois de dez passagens em meio NNN, os parasitas foram colhidos e 10^5 formas tripomastigotas foram inoculadas em camundongos CBA mantidos em isolador. O estoque foi mantido, sob condições assépticas, infectando-se semanalmente camundongos CBA com 10^5 formas sanguícolas.

O estoque denominado $_{TC}Y_2$ foi obtido através do cultivo de parasitas do estoque Y_{2orig} exclusivamente em cultura de células Vero. Este estoque do parasita apresenta a característica marcante de induzir, em camundongos CBA, uma baixa parasitemia e nenhuma mortalidade, sendo por esta razão denominado de baixa virulência ou avirulento. Formas tripomastigotas foram colhidas do sobrenadante das culturas celulares, centrifugadas à 1.000 x g por 20 minutos à 4^oC, contadas em câmara de Neubauer e adequadamente diluídas em meio RPMI 1640 (GIBCO) para inoculação nos animais experimentais mantidos em isolador.

O estoque CL_{orig} foi gentilmente cedido pela Profa. Dra. T. Kipnis (ICB-USP) e foi mantido infectando-se intraperitonealmente animais CBA, alojados em biotério convencional, a cada quinze dias com 10^4 formas sanguícolas. Os estoques CL_{TC} e CL_{NNN} foram obtidos da mesma forma que os estoques Y_{2TC} e Y_{2NNN} da cepa Y do parasita.

3. Teste de produção de anticorpos (Map test)

A presença de vírus contaminante(s) em animais infectados com *Trypanosoma cruzi* foi investigada à partir do sangue dos animais previamente infectados com o parasita. Para tanto o sangue destes animais foi centrifugado, o plasma filtrado em membrana Millipore (0,2 μ) e, uma vez que a observação microscópica não indicou a presença de parasitas, foi inoculado (0,2ml, intraperitonealmente) em camundongos CBA mantidos em isoladores tipo Trexler. Após vinte e oito dias estes animais foram sangrados, sob anestesia com éter, seus soros separados e testados individualmente quanto a presença de anticorpos contra os quatorze vírus acima relacionados, através de testes de imunofluorescência indireta (Kraft & Meyer, 1986).

4. Testes de Imunofluorescência Indireta (IFI)

A presença de anticorpos contra os diferentes vírus no plasma de animais infectados com diferentes estoques do parasitas e de animais utilizados no Map test foi detectada através de IFI. Para tanto foram preparadas lâminas teflonadas com culturas de células L-929 ou LLC-MK2 e com macrófagos peritoneais, obtidos de animais BALB/c normais estimulados três dias antes com peptona 10%. Após incubação das células, a 37⁰C em estufa de CO₂, as lâminas foram cobertas com suspensões dos vírus relacionados no item 1 e com suspensão do vírus X após seu isolamento. Após período de incubação por 24/48 horas a 37⁰C, quando 50% das células apresentavam efeito citopático, as lâminas foram fixadas em acetona gelada por dez minutos e estocadas em freezer a -20⁰C até o momento do uso. Para a reação as lâminas foram cobertas e incubadas, por uma hora a temperatura ambiente, com o plasma filtrado dos animais infectados com diferentes estoques do parasitas ou com o plasma dos animais utilizados no Map test, em diferentes diluições. A presença de anticorpos ligados foi detectada utilizando-se soro de coelho anti-imunoglobulinas de camundongo conjugado com fluoresceína, adquirido da W. L. Imunoquímica (Rio de Janeiro, Brasil). A incubação com o conjugado deu-se a 25⁰C por 30 minutos. As lâminas foram então lavadas 3 vezes com PBS durante 10 minutos e em seguida montadas com PBS glicerol 90% (pH 8.2). Todas as incubações foram realizadas em câmara úmida e as lâminas examinadas em microscópio Zeiss de fluorescência. Os

controles negativos foram feitos utilizando-se soro normal de camundongo e os positivos com anti soros específicos para cada um dos vírus anteriormente descritos, produzidos e gentilmente cedidos pelo Serviço de Controle Viroológico do CEMIB-UNICAMP.

5. Testes de Patogenicidade

Estes testes foram realizados para verificar a possível presença de um fator no plasma de alguns camundongos, que pudesse influenciar o nível de parasitemia e o tempo de sobrevida dos animais desafiados com *Trypanosoma cruzi*. Os plasmas a serem testados foram filtrados em membrana Millipore (0,2 μ), checados microscopicamente quanto à ausência de parasitas e então grupos de dez animais foram injetados intraperitonealmente com 0,1 ml. Estes animais receberam, uma hora depois, 10⁵ formas sanguícolas do parasita. Dois grupos controle foram estabelecidos, um deles recebeu o plasma a ser testado porém não foi infectado e o outro recebeu plasma normal e foi infectado. O nível de parasitemia e a taxa de mortalidade foram determinados diariamente em todos os grupos, ressaltando-se que no grupo inoculado apenas com o plasma filtrado não foram observados parasitas em momento algum.

6. Parasitemia e Mortalidade

O nível parasitêmico foi acompanhado diariamente, à partir de sangue coletado da cauda dos animais, conforme descrito por Brener (1980). Os resultados apresentam os valores obtidos no sétimo dia após a inoculação, quando níveis parasitêmicos máximos foram observados. A mortalidade foi registrada, diariamente, durante um período de trinta dias.

7. Isolamento do Vírus

Animais inoculados com o estoque Y_{2orig} do parasita foram sangrados, seus plasmas separados, filtrados em membrana Millipore (0,2 μ) e checados quanto à ausência completa de parasitas através de observação ao microscópio. Estes plasmas foram então inoculados em animais imunodeficientes, mantidos em isoladores, que a cada quatro dias eram sacrificados para obtenção de seus plasmas que serviriam para a infecção de novo lote de

animais. Após quatro passagens consecutivas de plasma filtrado os animais imunodeficientes começaram a apresentar, entre três e quatro dias após a inoculação, um quadro clínico de morbidade com algumas mortes. Estes animais doentes tiveram então seus fígados e baços retirados, macerados e inoculados em animais BALB/c de quatro semanas de idade, mantidos em isoladores. Após quatro dias de infecção estes animais apresentavam-se doentes sendo então sangrados, seus plasmas separados e filtrados em membrana Millipore (0,2 μ). Aliquotas de 0,2ml foram injetadas em animais normais e desta forma o fator presente no plasma dos animais foi seriadamente transferido por dez vezes. Após dez passagens consecutivas o plasma dos animais foi utilizado como fonte de vírus. Fígados e baços dos animais doentes foram retirados e conservados a -70⁰C para serem utilizados como fonte primária de vírus sempre que necessário.

8. Determinação da DL₅₀ do Vírus

A determinação da DL₅₀ das preparações de vírus foi feita de acordo com as instruções de Reed & Muench (1938), utilizando-se grupos de dez animais, de quatro e oito semanas de idade e das linhagens CBA e BALB/c, injetados com 0,2ml de várias concentrações do vírus. Um período de observação de quinze dias foi estabelecido, desde que nenhuma morte foi verificada após este período.

9. Anticorpos Policlonais

Anticorpos para o vírus X, utilizados nos testes de Imunofluorescência Indireta e nos testes de neutralização, foram obtidos imunizando-se camundongos BALB/c de 8 semanas de idade com um macerado de fígado conservado a -70⁰C e obtido de animais doentes conforme citado no item para isolamento do vírus. O macerado preparado em meio RPMI 1640 foi inativado a 56⁰C e cada animal recebeu uma dose de 0,2 ml. Os animais receberam 4 injeções intraperitoneais, com um intervalo de sete dias para as duas primeiras doses e quinze dias para as duas últimas doses, sendo estas últimas realizadas com o macerado sem aquecimento prévio. Os animais foram sangrados 7 dias depois da última dose. Os soros imune obtidos foram aquecidos a 56⁰C por 45 minutos e mantidos a -20⁰C até o momento do uso.

10. Testes de Neutralização

Estes testes foram realizados misturando-se volumes iguais de diferentes soros imune e uma solução de vírus isolado contendo 10DL_{50} . Misturas controles foram feitas simultaneamente utilizando-se soro normal de camundongo. Após incubação das misturas a temperatura ambiente por 45 minutos, alíquotas de 0,2 ml foram injetadas em grupos de 10 animais e a taxa de sobrevivência determinada após 10 dias.

Também foram realizados testes de neutralização com os estoques $Y_{2\text{orig}}$ e Cl_{orig} do parasita. Para tal, foram misturados volumes iguais de diferentes soros imunes e o sangue de animais infectados, contendo 2×10^6 parasitas/ml. Após 45 minutos a temperatura ambiente, grupos de dez animais foram inoculados, por via intraperitoneal (0,1ml), e os diferentes parâmetros de monitoramento da infecção foram acompanhados.

11. Leucograma

O sangue da cauda de animais inoculados, com *Trypanosoma cruzi* ou com o plasma filtrado obtidos destes animais, foi coletado em 3% de EDTA, 24, 48 e 72hs após a infecção. À fim de se evitar resultados distorcidos nas contagens celulares, devido à lesão da cauda para obtenção de sangue, foram utilizados animais diferentes a cada dia. A contagem de células totais foi feita utilizando-se um hemocitometro. A contagem diferencial de leucócitos foi realizada com preparações de esfregaço corados com Leishman.

12. Determinação de Alteração de Peso e do Número de Células em diferentes Órgãos Linfóides

Grupos de cinco animais foram inoculados com os diferentes estoques do parasita e com $0,1\text{DL}_{50}$ do vírus isolado e observados quanto à variação de peso e conteúdo celular de seus órgãos durante os sete primeiros dias após a infecção.

Os diferentes órgãos foram retirados dos animais, pesados em balança analítica, macerados para obtenção de suspensão celular e o número total de células determinado pela contagem em câmara de Neubauer. Os resultados foram expressos através da relação entre o número obtido com os animais em experimentação e o número obtido com os animais normais.

13. Anticorpos Monoclonais

Foram obtidos através da inoculação de 1×10^7 células dos seguintes hibridomas de rato no peritoneo de animais imunodeficientes, injetados 10 dias antes com nujol estéril e mantidos em isoladores: anti CD4 (GK 1.5), anti células B (G μ 1.5/4), anti CD8 (YTS 169) e anti célula T (Thy 1.2). O líquido ascítico produzido foi colhido por punção intraperitoneal, centrifugado e armazenado a -20°C . Para uso, os anticorpos foram purificados através de precipitação com ácido caprílico (Mckinney & Parkinson, 1987) ou através de coluna de Sepharose proteína G (Akerstrom *et al.*, 1985). Todos os anticorpos monoclonais obtidos foram precisamente titulados através de técnica imunohistoquímica.

14. Imuno-Histoquímica

A técnica de imunoperoxidase citada por Hus *et al.*, 1981, foi seguida com pequenas modificações. Os órgãos (timo, baço e linfonodos ingüinais) de animais infectados com os diferentes estoques do parasita e/ou vírus foram retirados após o sacrifício dos animais e as células obtidas através de maceração em meio RPMI 1640. Células do baço foram tratadas com cloreto de amônia por 4 minutos para lise das hemácias e as suspensões celulares lavadas em meio RPMI 1640. A viabilidade foi determinada com azul de trypan.

Após ajuste do número de células para $2 \times 10^5/\text{ml}$ estas foram assentadas em lâminas utilizando-se citocentrífuga, fixadas com acetona gelada, secas ao ar e estocadas a -20°C até o momento do uso. Os anticorpos monoclonais descritos no item 13 foram utilizados como anticorpos primários, sendo realizada a incubação durante a noite. Imunoglobulina de coelho anti-imunoglobulina de rato marcada com biotina (Vector) foi utilizada como anticorpo secundário, numa diluição de 1:1000 por um período de duas horas, e a reação revelada com o complexo avidina-biotina-peroxidase (Dako), sendo usado 3-3 Diamino-benzidina (0,5mg/ml, Sigma) e peróxido de hidrogênio (0,3%), para desenvolvimento da coloração. Controles negativos foram incluídos com a omissão ou a substituição do anticorpo primário por outro irrelevante. As lâminas foram coradas com hematoxilina por 60 segundos, lavadas com PBS, montadas em Aquamont e examinadas ao microscópio óptico. A porcentagem das diferentes populações de linfócitos foi obtida contando-se 200 células em 5 campos microscópicos. Os valores apresentados representam

a média de três experimentos \pm SEM.

15. Histopatologia

Os órgãos a serem examinados foram retirados nos dias 3, 5 e 7 após a infecção dos animais com os diferentes estoques de *Trypanosoma cruzi*, com vírus isolado e com vírus em associação com os parasitas. Os tecidos foram imediatamente fixados em formol tamponado 10%, incluídos em parafina, seccionados e corados com hematoxilina-eosina, conforme descrito por Burke *et al.*, 1972.

16. Método Estatístico

Teste "t" de Student foi aplicado como indicado em Zar (1984).

RESULTADOS

1. Obtenção e caracterização dos estoques do parasita

Dados anteriores obtidos em nosso laboratório (Rangel *et al.*, não publicados) mostraram que animais SPF inoculados com o estoque Y_{2orig} de parasitas não apresentavam-se contaminados por bactérias ou hematozoários. No entanto, testes de imunofluorescência indireta e Map test, realizados com o soro destes animais, indicaram a presença de coronavírus.

Com o objetivo de obtermos amostras ou estoques do parasita que não estivessem contaminados com nenhum tipo de vírus, os estoques Y_{2orig} e CL_{orig} que vinham sendo mantidas em animais SPF, porém alojados em biotério convencional, foram passadas seriadamente em meio de cultura de células LLC-MK2 ou em meio axênico (Nicolle - Novy - McNeal), conforme descrito em materiais e métodos, e depois inoculados em animais SPF mantidos em isoladores de modo a obter os estoques Y_{2TC} , Y_{2NNN} , CL_{TC} e CL_{NNN} .

Os resultados obtidos mostram que os animais infectados com o estoque Y_{2orig} apresentavam um nível de parasitemia maior e um tempo de sobrevida menor do que aqueles infectados com os estoques Y_{2TC} ou Y_{2NNN} (Figura 1).

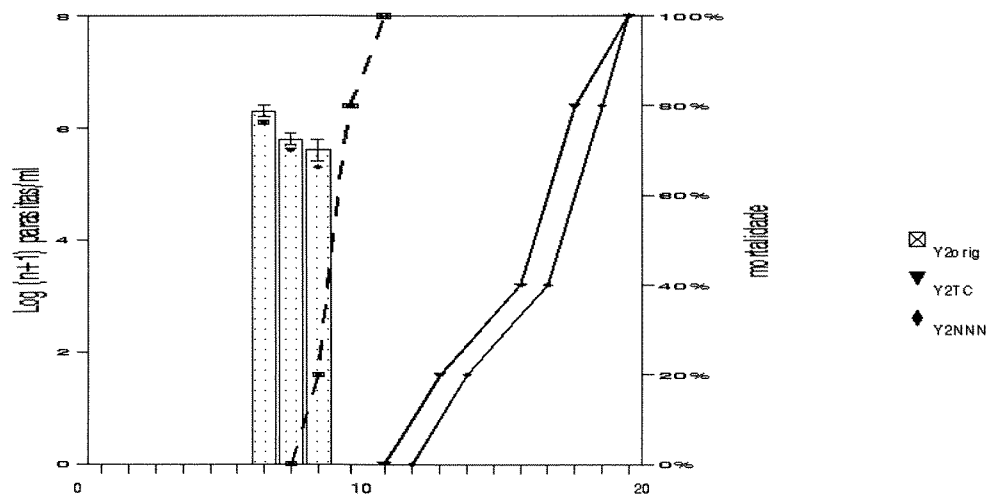


Figura 1. Níveis de parasitemia (determinado no sétimo dia após a infecção) e taxa de mortalidade de animais infectados, i.p., com 10^5 parasitas dos diferentes estoques da cepa Y.

Testes de imunofluorescência indireta e Map testes realizados com os plasmas filtrados dos animais infectados com os estoques Y_{2TC} e Y_{2NNN} , deram resultado negativo para qualquer um dos quatorze vírus investigados. Enquanto que, os mesmos testes realizados com o plasma filtrado de animais infectados com o estoque Y_{2orig} , indicaram sempre a presença de coronavírus (MHV3). (Dados não mostrados).

2. Testes de patogenicidade com plasma de animais infectados com os diferentes estoques do parasita

A possibilidade de um ou mais vírus estarem alterando a evolução da infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* foi investigada inoculando-se grupos de dez animais SPF, mantidos em isolador, com plasma normal ou com o plasma filtrado de animais infectados sete dias antes com o estoque Y_{2orig} de parasitas (PI- Y_{2orig}) e inoculando-se estes animais com os estoques Y provenientes de cultura de tecido ou de meio NNN (estoques Y_{2TC} e Y_{2NNN}). Observou-se a parasitemia (determinada no sétimo dia após a infecção) e a sobrevivência média dos grupos.

Os testes de patogenicidade (Figura 2) indicaram que PI- Y_{2orig} continha um fator que era capaz de aumentar o nível de parasitemia e de diminuir o tempo médio de sobrevivência de animais infectados com 10^5 parasitas do estoque Y_{2TC} . O plasma de animais normais (PI-normal) ou infectados com os estoques Y_{2TC} (PI- Y_{2TC}) ou Y_{2NNN} (PI- Y_{2NNN}), eram incapazes de induzir efeitos semelhantes. Camundongos inoculados apenas com plasma filtrado, obtido de animais infectados com o estoque Y_{2orig} , também foram acompanhados diariamente quanto a presença de parasitas no sangue circulante, para exclusão da possibilidade destes terem sido transmitidos e por esta razão estarem alterando os resultados obtidos com os estoques Y_{2TC} e Y_{2NNN} .

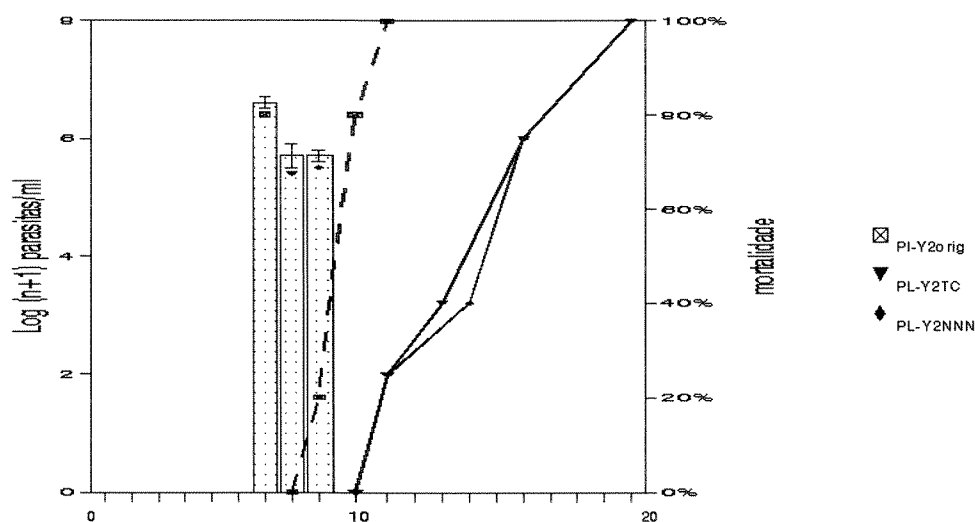


Figura 2. Níveis de parasitemia (determinado no sétimo dia após a infecção) e taxa de mortalidade de animais inoculados, i.p., com 0,2ml de plasma filtrado, obtido de animais previamente inoculados com os diferentes estoques do parasita, e infectados com 10^5 parasitas do estoque Y_{2TC} .

Testes de patogenicidade utilizando o estoque TCY_2 , considerado de baixa virulência para camundongos CBA uma vez que induz baixa parasitemia e nenhuma mortalidade, são mostrados na Figura 3. Pôde-se observar que quando os animais receberam o plasma filtrado obtido de animais infectados previamente com o estoque Y_{2orig} , apresentaram alta parasitemia e 100% de mortalidade, alterando completamente a característica deste estoque mantido em cultura de células, qual seja, a de não induzir morte em animais CBA.

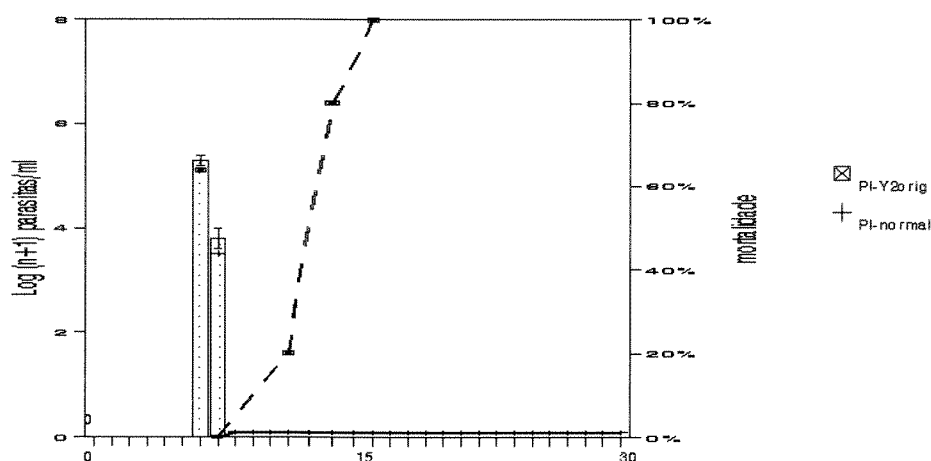


Figura 3. Níveis de parasitemia (determinado no sétimo dia após a infecção) e taxa de mortalidade de animais inoculados com 0,2ml de plasma normal ou plasma filtrado, e desafiados com 10^5 parasitas do estoque TCY_2 .

3. Isolamento e caracterização do fator presente no plasma de animais infectados com o estoque Y_{2orig}

Para verificar se o fator filtrável poderia ser replicado em um hospedeiro susceptível, experimentos de transferência seriada em camundongos BALB/c foram realizados. Testes de patogenicidade, feitos com o plasma obtido após diferentes estágios da transferência seriada, estão indicados na tabela I. Pode-se observar que o fator filtrável foi mantido através de transferência de animal para animal.

Experimentos paralelos (não apresentados) mostraram que o fator presente no plasma, provisoriamente chamado de vírus X, aumentou sua patogenicidade durante a transferência seriada, uma vez que animais de quatro semanas de idade injetados sómente com a terceira passagem do vírus X morreram antes do sétimo dia enquanto que aqueles injetados com a primeira passagem sobreviveram o período de observação de vinte e um dias. Além disso, o vírus X perdeu sua habilidade de matar camundongos CBA e de aumentar a parasitemia de animais infectados com os estoques Y_{2TC} e Y_{2NNN} quando aquecido a 56^o C durante 45 minutos.

TABELA I: Ação do plasma filtrado, obtido de animais infectados com *T. cruzi* e seriadamente transferidos de animal para animal, sobre o nível de parasitemia e taxa de mortalidade de CBA inoculados com 10⁵ parasitas do estoque Y_{2TC}.

Plasma Inoculado	Log Parasitas/ml*	Mortalidade/dia (%)			
		7	10	15	20
1 ^a passagem	6.0 ± 0.0**	50	100		
2 ^a passagem	6.6 ± 0.2	50	100		
3 ^a passagem	5.7 ± 0.1	80	100		
10 ^a passagem	6.7 ± 0,0	100			
plasma normal	5.6 ± 0.1	0	40	80	100

* Grupos de dez animais CBA foram inoculados i.p. com 0,2ml de plasma obtido de diferentes passagens e com 10⁵ formas sanguícolas do parasita do estoque Y_{2TC}. O nível de parasitas no sangue circulante foi determinado diariamente, sendo expresso apenas o nível máximo obtido sete dias após a inoculação. * Test t de Student p < 0.01, quando comparado com plasma normal.

4. Determinação da DL₅₀ do vírus

Para a determinação da dose de vírus capaz de matar 50% dos animais grupos de BALB/c e CBA, de quatro e oito semanas de idade, foram inoculados conforme descrito em materiais e métodos. A tabela II mostra os resultados obtidos para as diferentes idades e linhagens de animais. Pode-se observar que animais de quatro semanas de idade são mais susceptíveis que animais adultos e animais da linhagem CBA são mais resistentes que animais BALB/c.

Observou-se que os animais puderam sobreviver a um desafio de 10DL₅₀ contanto que recebessem, quinze dias antes, 0,2 ml de plasma aquecido de animais infectados com o vírus X (quinta passagem seriada do plasma filtrado). Camundongos que sobreviveram a este desafio também resistiram a um segundo desafio de 50DL₅₀ dado sete dias depois. O plasma obtido dos animais que sobreviveram aos dois desafios, quando testados por imunofluorescência indireta com 14 diferentes vírus murinos, apresentaram reação positiva sómente quando antígenos de MHV3 eram testados.

Tabela II. Determinação da DL₅₀ do vírus X em animais de BALB/c e CBA de diferentes idades.

LINHAGENS [#]	IDADE (semanas)	DL ₅₀
BALB/c	4	1: 1.000.000
	8	1: 100.000
CBA	4	1: 100.000
	8	1: 10.000

[#] Grupos de cinco animais das linhagens CBA e BALB/c, de diferentes idades, foram inoculados i.p. com 0,2ml do vírus isolado. A ocorrência de doença e de morte foram observadas por um período de trinta dias. Os experimentos foram realizados em triplicata.

5. Testes de patogenicidade utilizando o vírus isolado

À fim de se determinar a ação do vírus isolado sobre animais infectados com *Trypanosoma cruzi*, um grupo de dez animais CBA foi inoculado com 10^5 formas sanguícolas do estoque Y_{2TC} do parasita e em seguida com uma dose de 0,1DL₅₀ do vírus isolado. Como controle, um grupo de animais recebeu a mesma dose de parasitas e em seguida uma dose de 0,2ml de plasma normal. A Figura 4 mostra o curso da infecção e a taxa de mortalidade destes animais. Pode-se observar que o grupo de animais que recebeu os parasitas e a dose de vírus isolado apresentou um nível maior de parasitemia e um menor tempo de sobrevivência do que os animais que receberam parasitas e plasma normal.

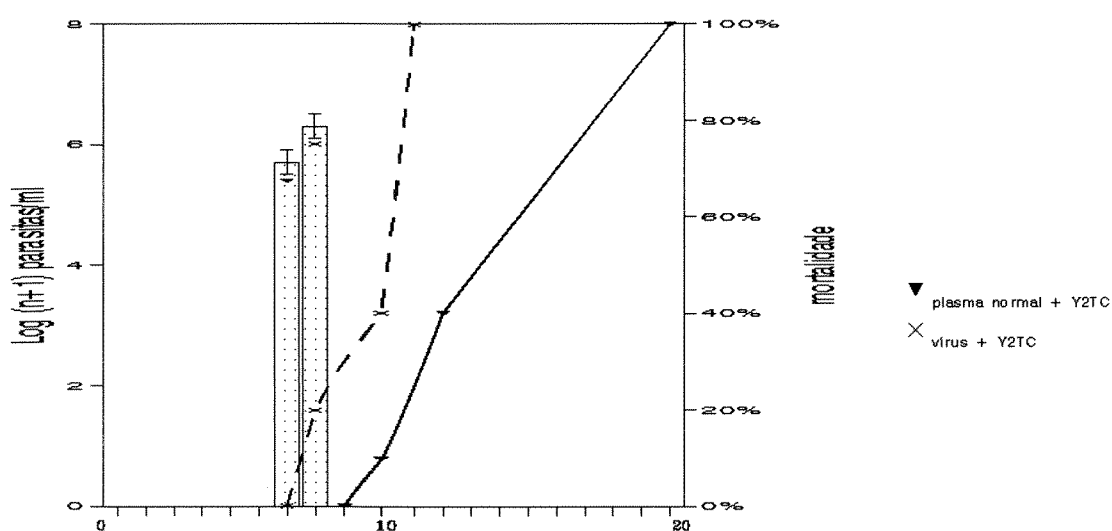


Figura 4. Níveis de parasitemia (determinado no sétimo dia após a infecção) e taxa de mortalidade de animais inoculados, i.p., com plasma normal e vírus isolado (0,1DL₅₀) e infectados com 10^5 parasitas do estoque Y_{2TC}.

A ação de uma dose sub letal (0,1DL₅₀) do vírus isolado em animais inoculados com o estoque TCY₂ de parasitas também foi investigada. Os dados apresentados na Figura 5 mostram que a associação deste estoque de parasitas com o vírus levou os animais à morte em 12 ± 2 dias, enquanto que animais inoculados apenas com o estoque de parasitas sobrevivem por um período superior à trinta dias.

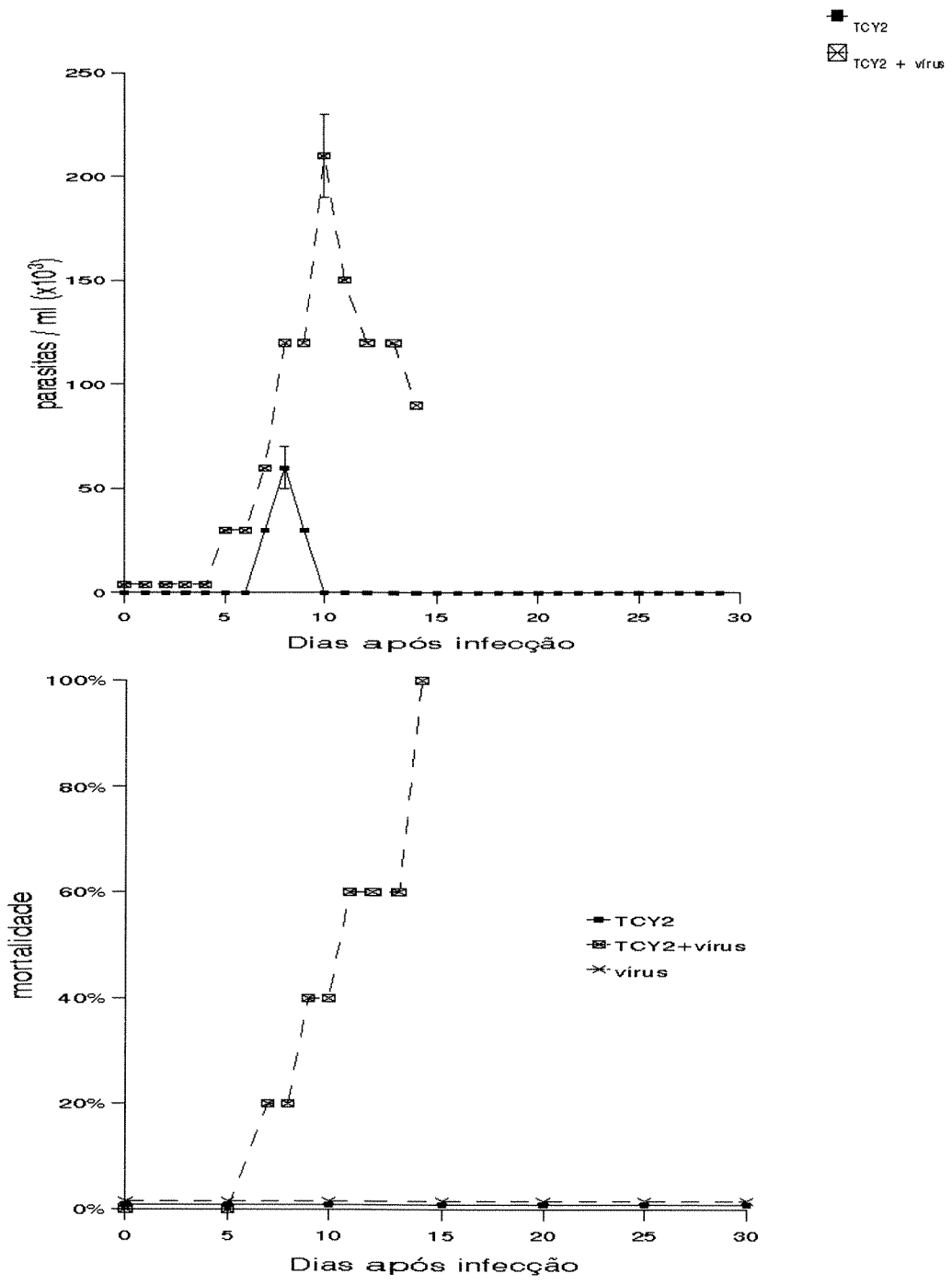


Figura 5. Níveis de parasitemia e taxa de mortalidade de animais inoculados com $0,1DL_{50}$ do vírus isolado e infectados, ou não, com 10^5 parasitas do estoque TCY_2 .

6. TESTES DE NEUTRALIZAÇÃO

Testes de neutralização “in vitro” mostraram que os animais podiam ser protegidos, de um desafio de 10DL₅₀ de vírus X, quando anticorpos anti-MHV3 ou anticorpos anti-X eram utilizados, enquanto que anticorpos específicos para outros vírus foram incapazes de induzir tal proteção (Tabela III).

TABELA III. Mortalidade dos animais quando inoculados com vírus X previamente neutralizado com diferentes anti soros.

SORO TESTADO*	MORTALIDADE
ANTI-MHV3	1/5
ANTI-X	0/5
ANTI-LCM	5/5
ANTI- ROTA	5/5
SORO NORMAL	5/5

* Grupos de dez animais CBA foram inoculados com o 0,2ml do vírus isolado (0,1DL₅₀) e com 0,2ml de diferentes anti-soros para testar sua capacidade neutralizante. Os animais foram observados quanto à mortalidade por um período de trinta dias.

A tabela IV mostra a ação dos imune soros sobre o nível de parasitemia e a taxa de mortalidade de animais infectados com os estoques Y_{2orig} e Cl_{orig} do parasita. Observou-se que, os grupos inoculados com os estoques contaminados do parasita e antisoro anti-X apresentaram menor nível de parasitemia e maior taxa de sobrevivência quando comparados com os grupos que receberam parasitas do estoque contaminado e soro normal. Entretanto, anticorpos anti-MHV3 não induziram efeitos semelhantes.

Tabela IV. Níveis de parasitemia e taxa de mortalidade em CBA inoculados com os estoques do parasita previamente misturados com anticorpos anti-X ou com anticorpos anti -MHV.

Estoque do parasita	Soro adicionado	Log n° parasitas por ml [#]	Dia médio de morte S.D.
Y _{2orig}	anti X	5.4 ± 0.2*	12 ± 2
	anti MHV 3	6.4 ± 0.7	10 ± 1
	soro normal	6.6 ± 0.4	8 ± 1
CL _{orig}	anti X	5.3 ± 0.1	20 ± 4
	anti MHV 3	5.6 ± 0.6	15 ± 2
	soro normal	5.8 ± 0.3	14 ± 2

Grupos de dez animais CBA foram inoculados, i.p., com 10⁵ parasitas do estoque Y_{2orig} e com 10⁴ parasitas do estoque CL_{2orig} misturados com diferentes anti-soros. A parasitemia foi determinada diariamente e o pico máximo de nível parasitêmico foi obtido após sete e quatorze dias de infecção com a cepa Y e CL, respectivamente. A mortalidade foi observada por um período de 30 dias. * p < 0.01 quando comparado com soro normal.

7. Alterações na resposta imune induzidas pela presença de um vírus contaminante

Os dados obtidos até então mostravam que o estoque original de parasitas (Y_{2orig}), apesar de estar sendo mantido em animais SPF, apresentava-se contaminado com um vírus do grupo Coronavírus. Observou-se também que se este estoque fosse passado previamente por cultura de células ou em meio NNN e depois mantido através de repiques semanais, em animais SPF alojados em isoladores, os estoques resultantes, denominados de Y_{2TC} e Y_{2NNN}, não se apresentavam contaminados com vírus.

Além disso, verificou-se que a associação do vírus a um destes estoques induzia alterações no nível de parasitemia e no tempo de sobrevivência, indicando uma possível ação deste vírus contaminante sobre a resposta imunológica do hospedeiro.

Para aumentar a clareza do texto daqui por diante o estoque Y_{2TC} será denominado apenas de TS, uma vez que se trata de formas tripomastigotas sanguíneas mantidas de

animal para animal através de repiques semanais, e o estoque TCY_2 será denominado apenas de TC, pois trata-se de formas tripomastigotas mantidas em cultura de células.

Com o objetivo de verificar se o vírus contaminante poderia estar provocando alterações na resposta imune do hospedeiro ao parasita, foram investigadas possíveis alterações quantitativas nas células responsáveis pelo controle da infecção no sangue periférico e em diferentes órgãos linfóides.

7.1. Leucograma

A enumeração diária dos leucócitos do sangue periférico, durante os três primeiros dias após a inoculação, mostrou que os animais que receberam os estoques TS (Y_{2TC} ou Y_{2NNN}) não apresentaram nenhuma alteração, enquanto que os animais que receberam o estoque TC + vírus apresentaram uma linfopenia marcante no segundo dia após a inoculação (figura 6A). Resultados semelhantes também foram obtidos quando os animais eram infectados com o estoque Y_{2orig} (Dados não mostrados).

Como pode ser observado na figura 6B, uma marcada linfopenia também ocorreu após a inoculação de plasma obtido de animais infectados com o estoque TC + vírus (PI-TC + vírus), e nenhuma alteração foi vista quando os animais receberam o plasma de camundongos infectados com o estoque TS (PI-TS). Os mesmos resultados foram observados nos animais inoculados com o plasma filtrado obtido de animais infectados com o estoque Y_{2orig} de parasitas (Dados não mostrados).

Quando os animais eram inoculados com parasitas do estoque TS em associação com plasma de animais infectados com o estoque TC + vírus, ou com o vírus após o seu isolamento, observou-se uma marcada linfopenia no segundo dia após infecção (Dados não mostrados).

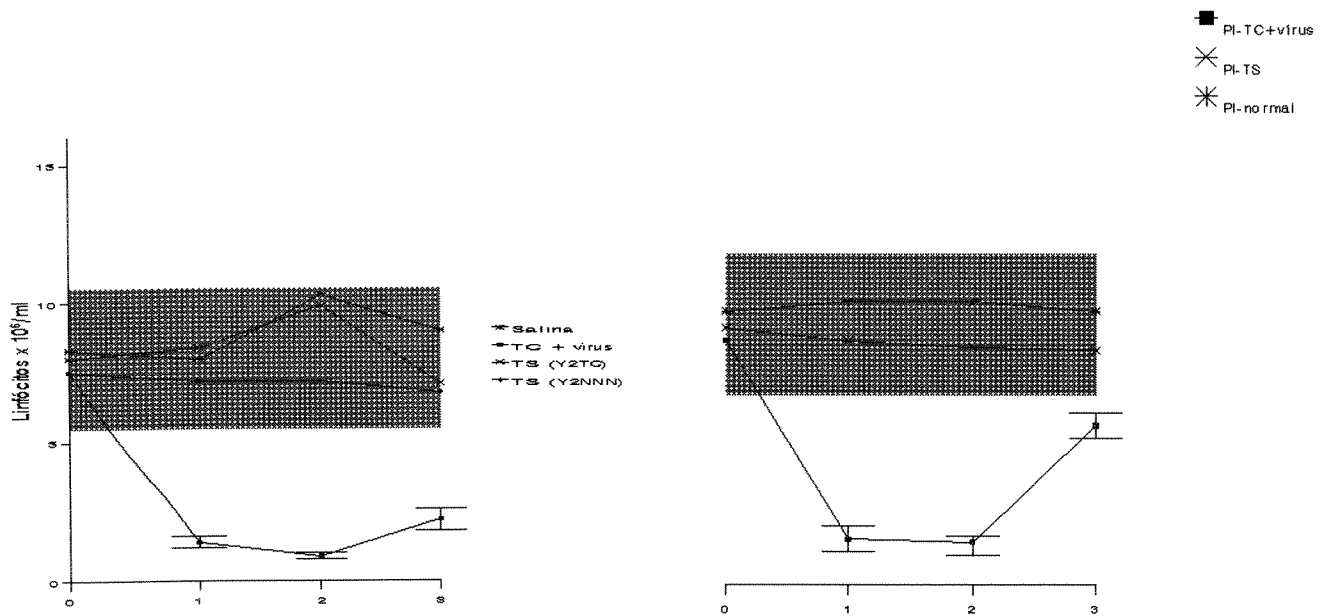


Figura 6. Número de linfócitos no sangue periférico de camundongos CBA inoculados com 10^5 parasitas dos diferentes estoques (A) ou apenas com plasma filtrado, obtido de animais infectados previamente com os diferentes estoques (B).

O efeito neutralizante de anticorpos específicos contra o vírus pode ser observado injetando-se os animais com volumes iguais de parasitas do estoque TC + vírus e anticorpos anti-vírus X (Figura 7).

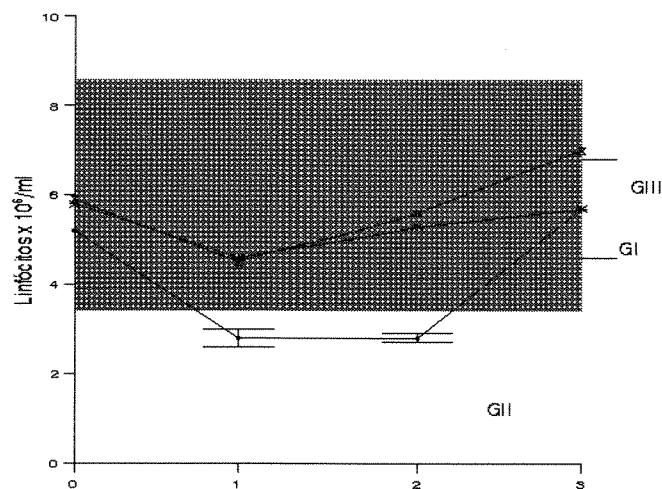


Figura 7. Número de linfócitos no sangue periférico de camundongos CBA inoculados conforme segue:
 GI = 0,2ml de salina
 GII = 10^5 parasitas do estoque Y_{2orig} + 0,2ml de soro normal
 GIII = 10^5 parasitas do estoque Y_{2orig} + 0,2ml de anti soro anti vírus X.

7.2. Variações no peso, na celularidade e alterações histopatológicas em diferentes órgãos linfóides

Os dados obtidos até então nos levaram a desenvolver experiências objetivando verificar as alterações, ainda que quantitativas, que estariam ocorrendo nos diferentes órgãos linfóides dos animais inoculados com:

(1) 10^5 parasitas do estoque TS (Y_{2TC}); (2) 10^5 parasitas do estoque TC ($_{TC}Y_2$); (3) o vírus isolado ($0,1 DL_{50}$) e (4) com 10^5 parasitas do estoque TC em associação com $0,1DL_{50}$ do vírus (TC + vírus).

Os animais foram inoculados, subcutaneamente, no membro posterior esquerdo e tiveram os linfonodos, o baço, e o timo retirados, nos dias 3, 5 e 7 após a infecção, para observação de possíveis alterações no peso, na celularidade e na porcentagem de células com marcadores de superfície para células B, T, $CD4^+$ e $CD8^+$. Alterações na estrutura histológica destes órgãos e da medula óssea dos animais também foram analisadas.

LINFONODOS:

Os resultados obtidos no linfonodo homolateral mostraram um pequeno aumento do peso e do número de células totais quando os animais foram inoculados apenas com vírus. Entretanto, houve um marcante aumento, tanto do peso quanto da celularidade, quando os animais receberam parasitas dos dois estoques e quando foram inoculados com parasitas e vírus. Podemos notar que o aumento, no número de células e no peso, ocorrido no grupo de animais inoculados com o estoque TC foi significativamente maior que no grupo inoculado com TS e que os resultados obtidos com o grupo de animais que receberam o estoque TC + vírus foi semelhante aos do grupo inoculado com TS (Figura 8A).

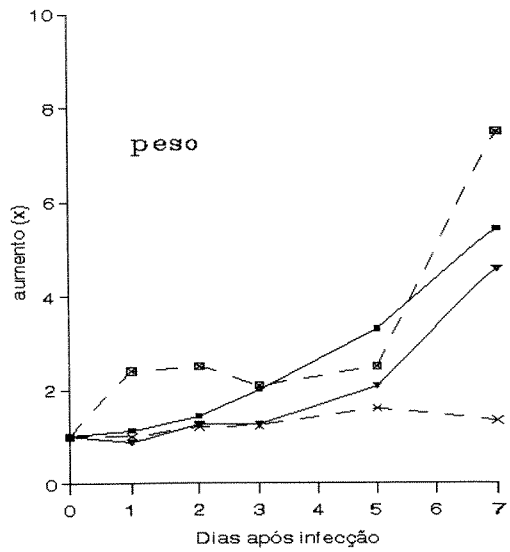
A determinação do percentual de células B e T mostrou ao longo da infecção pequenas alterações, em torno do normal, em relação à população B (Figura 8B). A porcentagem de células T aumentou, em relação ao tempo, em todos os grupos

experimentais, sendo que no grupo inoculado com o estoque TC de parasitas, no sétimo dia após a infecção, 70% dos linfócitos eram desta população. No grupo inoculado com o estoque TS houve um aumento até o quinto dia após a infecção, retornando a níveis próximo do normal no sétimo dia após a infecção. O comportamento do estoque TC + vírus foi semelhante ao do estoque TS (Figura 8B).

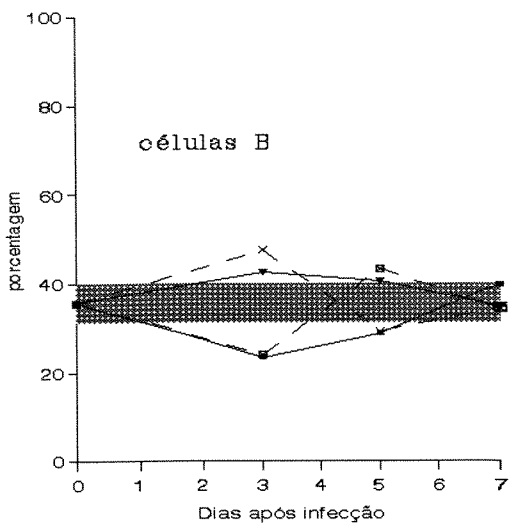
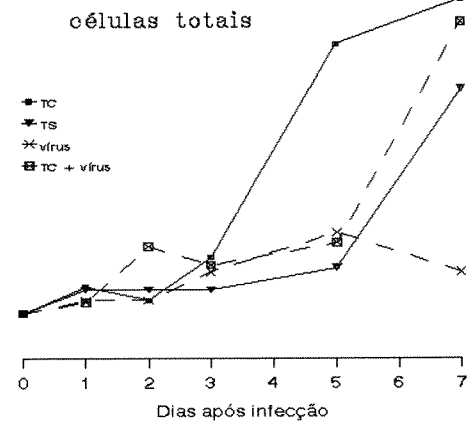
Em relação às sub-populações de células T pudemos observar neste órgão um pequeno aumento de células CD4⁺, em todos os grupos experimentais, a partir do terceiro dia após a infecção e uma tendência à normalização no sétimo dia após a infecção. A porcentagem de células CD8⁺ aumentou, à partir do terceiro dia após infecção, em todos os grupos com um predomínio no grupo inoculado com parasitas do estoque TC. Os resultados obtidos com os animais inoculados com TC e vírus aproximaram-se do resultado dos animais do grupo inoculado com TS (Figura 8C).

Dados relativos ao linfonodo contralateral (Figura 9 A, B e C) mostram que as alterações neste órgão foram semelhantes às encontradas no linfonodo homolateral, mas de menor intensidade. Enquanto no linfonodo homolateral os animais inoculados com o estoque TC apresentaram um aumento de 5 vezes em relação ao peso e de quase 8 vezes em relação à celularidade, no linfonodo contralateral este aumento foi de 4 e de 5 vezes, respectivamente.

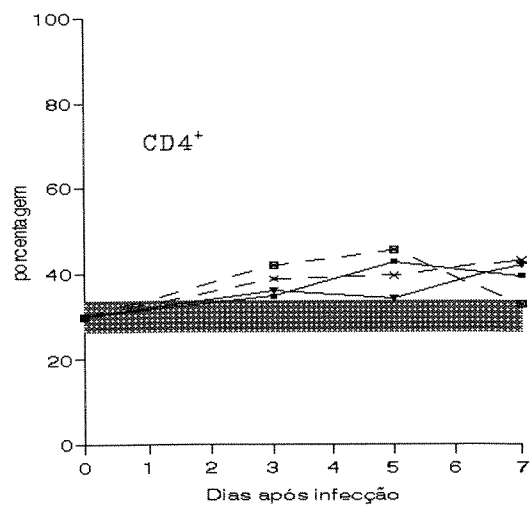
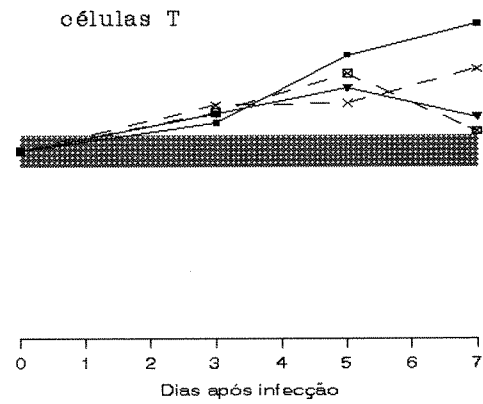
O exame histológico destes órgãos demonstrou uma hiperplasia difusa na região parafolicular e uma histiocitose sinusal intensa, semelhante em todos os grupos estudados (Dados não mostrados).



A



B



C

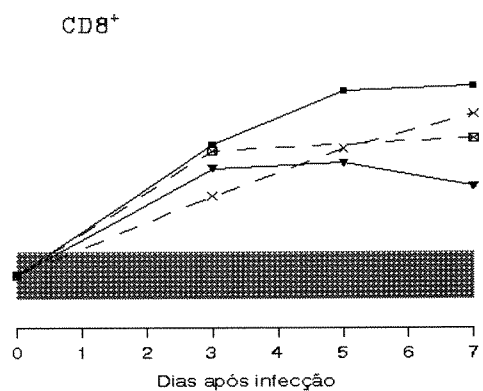


Figura 8. Alterações no linfonodo homolateral durante infecção com TC, TS, TC+vírus e vírus isolado: (A) peso e celularidade; (B) percentual de células B e T; (C) percentual de CD4⁺ e CD8⁺.

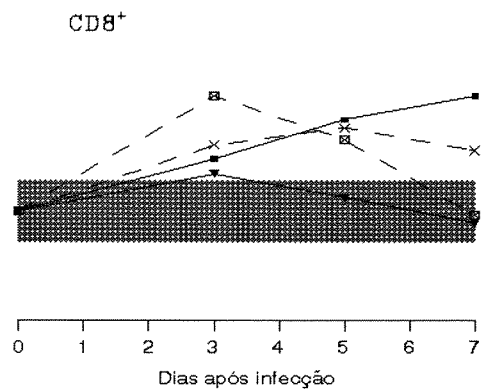
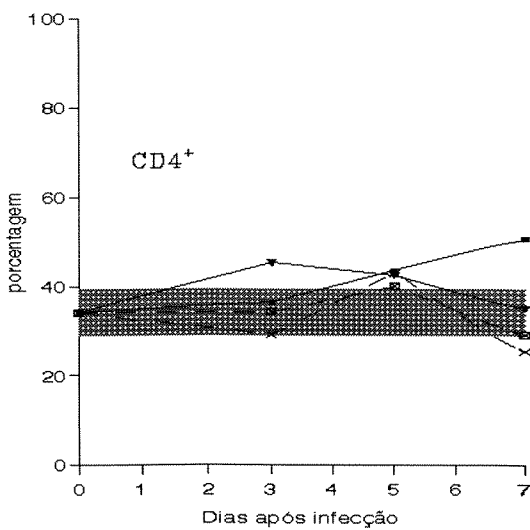
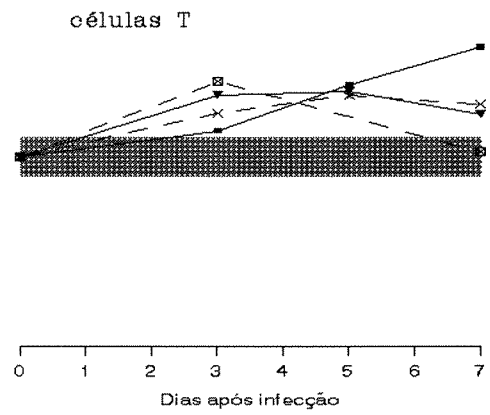
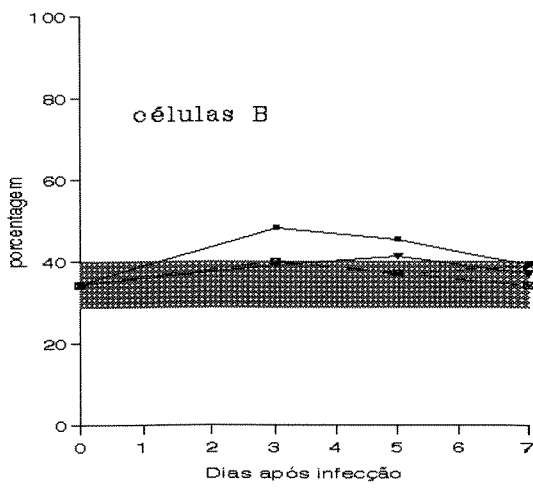
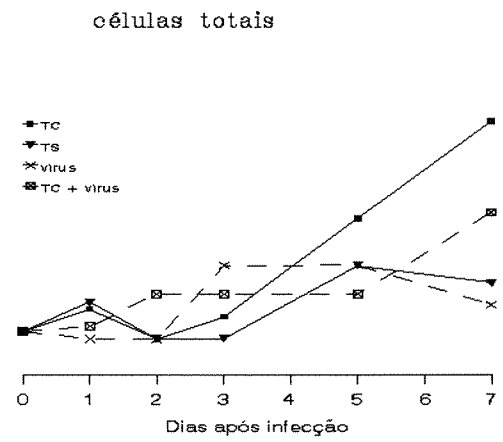
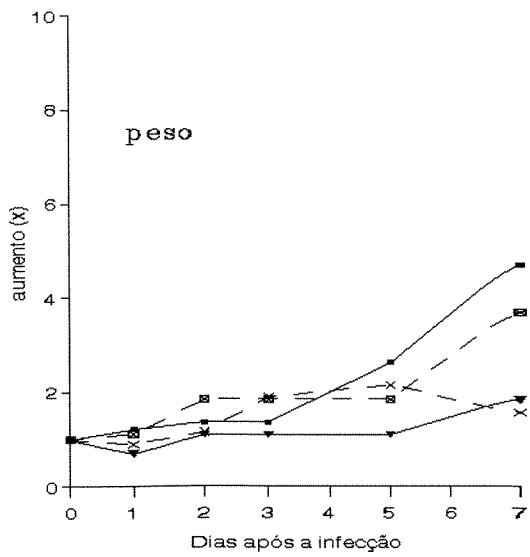


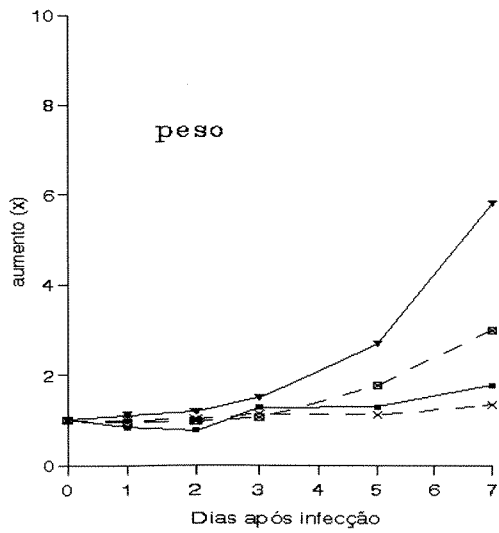
Figura 9 Alterações no linfonodo contralateral durante infecção com TC, TS, TC+vírus e vírus isolado: (A) peso e celularidade; (B) percentual de células B e T; (C) percentual de CD4⁺ e CD8⁺.

BAÇO:

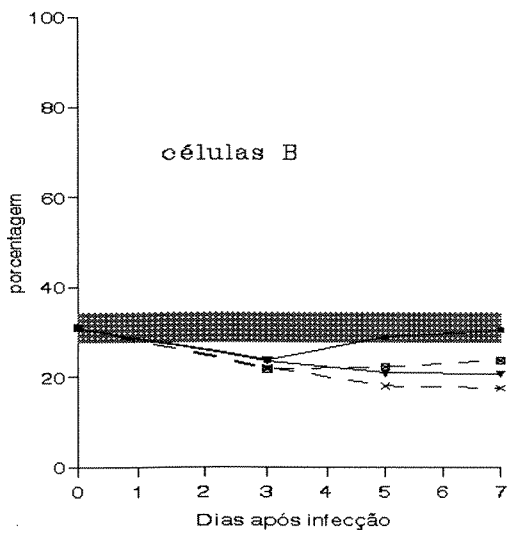
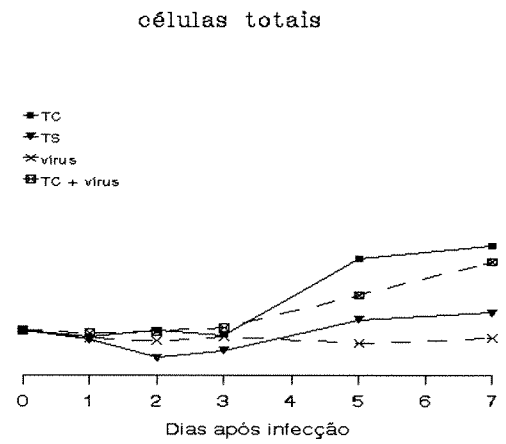
No baço observou-se, principalmente a partir do quinto dia após a infecção, um aumento do peso e da celularidade quando os animais receberam parasitas, dos diferentes estoques ou quando receberam os parasitas em associação com o vírus X. A inoculação apenas com o vírus X não induziu aumento significativo no peso ou na celularidade deste órgão (Figura 10A).

Uma queda nos percentuais de células B foi observada nos quatro grupos experimentais, por volta do terceiro dia após a infecção, mas os animais inoculados com o estoque de baixa virulência do parasita (TC) foram capazes de recuperar os níveis desta população no quinto dia após infecção. Pôde-se ainda observar um aumento nos níveis percentuais de células T no grupo de animais inoculados com o estoque TC do parasita, que foi diminuído quando os animais foram inoculados com TC+vírus. É interessante notar também a queda, observada a partir do quinto dia após a infecção, nos animais que receberam parasitas do estoque TS e naqueles que foram inoculados apenas com o vírus (Figura 10 B)

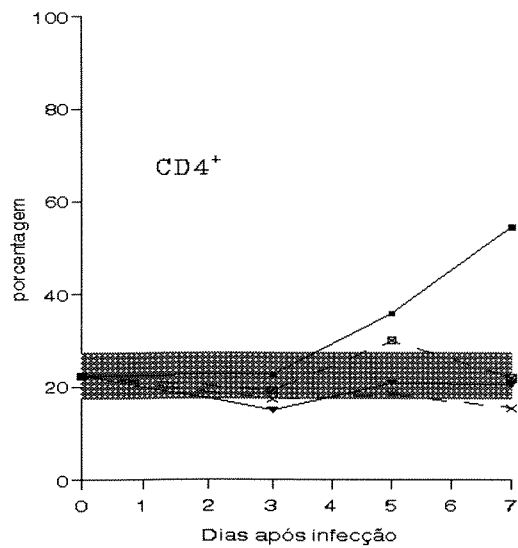
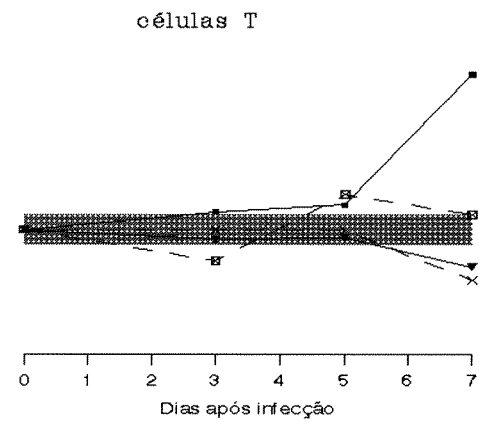
Observou-se um aumento significativo no percentual de células CD4⁺ apenas no grupo inoculado com o estoque TC e um pequeno aumento da população de células CD8⁺ nos grupos que receberam o estoque TC, naqueles inoculados apenas com o vírus e quando os animais receberam os parasitas e os vírus em associação. O estoque TS de parasitas não induziu aumento na porcentagem de células CD8⁺ neste órgão (Figura 10 C).



A



B



C

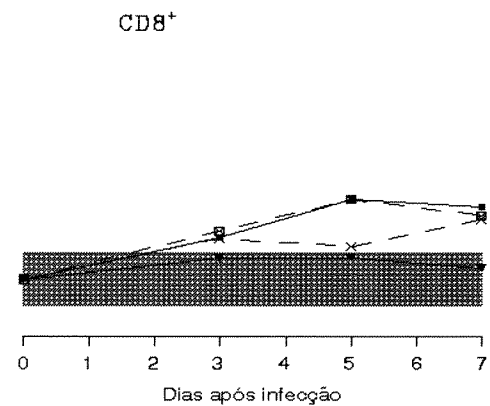


Figura 10. Alterações no baço durante infecção com TC, TS, TC+vírus e vírus isolado:(A)peso e celularidade; (B)percentual de células B e T; (C)percentual de CD4⁺ e CD8⁺.

O exame histológico do baço dos animais infectados com o estoque TC (Figura 11.b) mostrou uma hiperplasia de polpa branca, com folículos linfóides limitados por uma zona marginal bastante espessada. Animais infectados com parasitas do estoque TC + vírus e com o estoque TS (Figura 11.c e 11.d) apresentaram, além de uma hiperplasia mais evidente uma intensificação da hemopoiese.

A inoculação dos animais com vírus isolado provocou um pequeno aumento da polpa branca, sem a presença de congestão e de eritroblastos na polpa vermelha (Dados não mostrados).

Figura 11. Aspecto histológico do baço de animais infectados com os diferentes estoques do parasita (TC e TS) e com parasitas e vírus (TC + vírus).

a) *Normal*. Observa-se nítida distinção entre a polpa branca e vermelha do órgão (B e V). Na polpa vermelha há hematopoiese em pequena quantidade, restrita as áreas subcapsulares (à E, setas).

b) *TC*. Evidente hiperplasia da zona marginal da polpa branca (delimitada pelas setas).

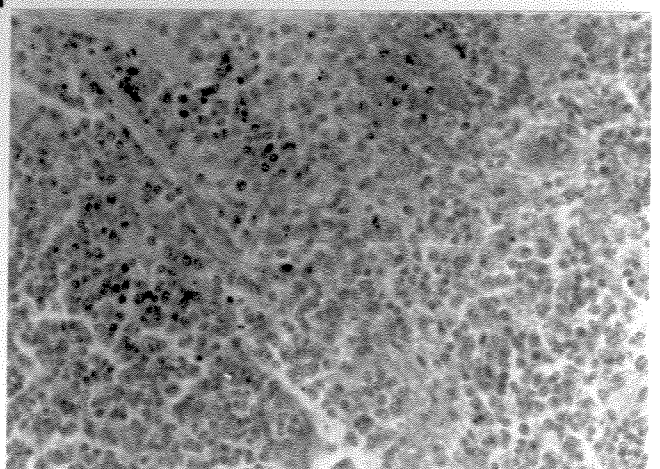
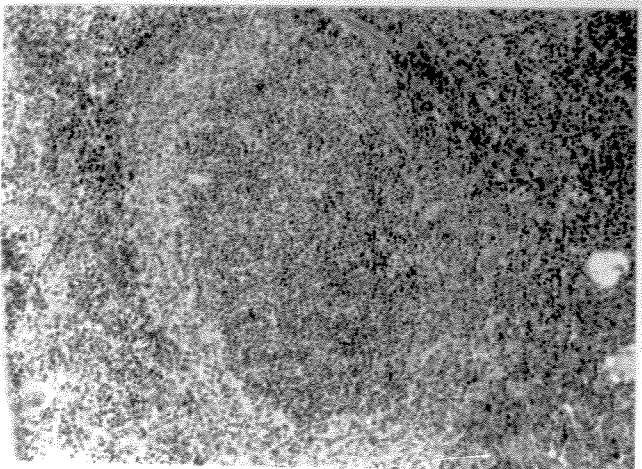
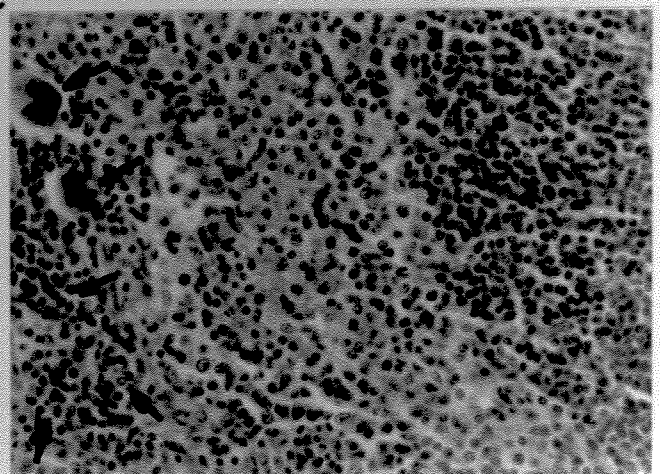
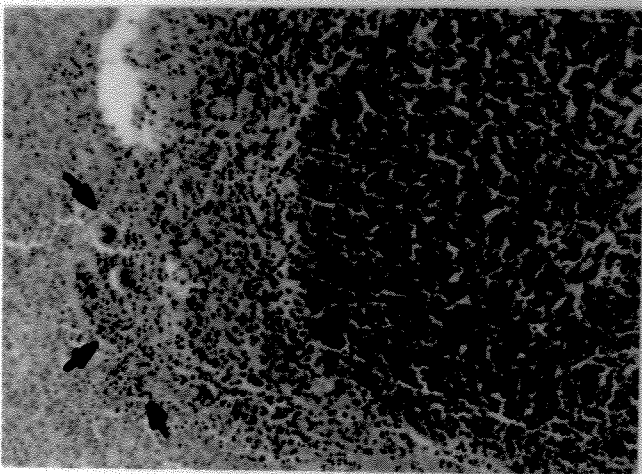
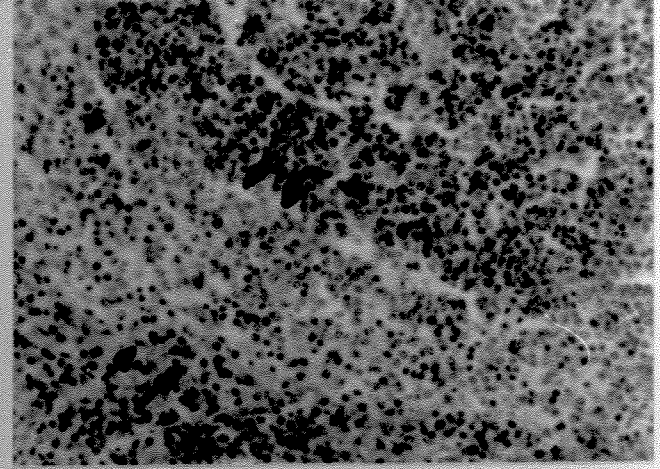
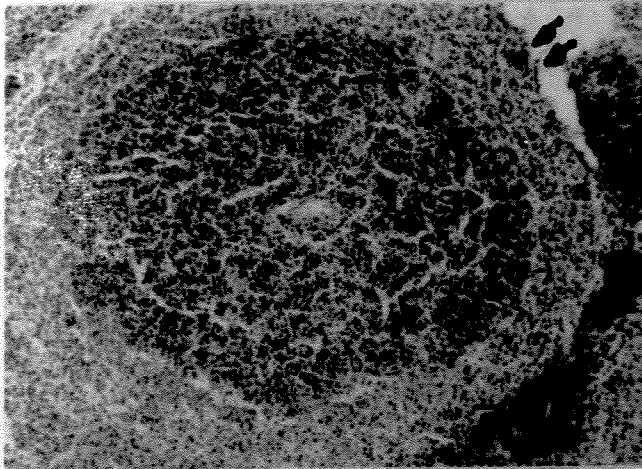
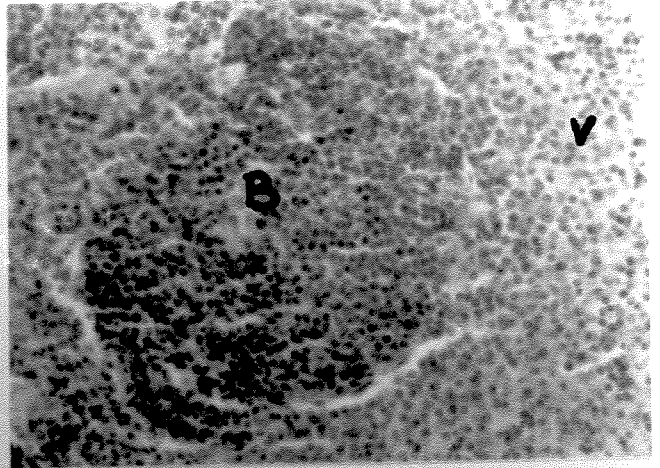
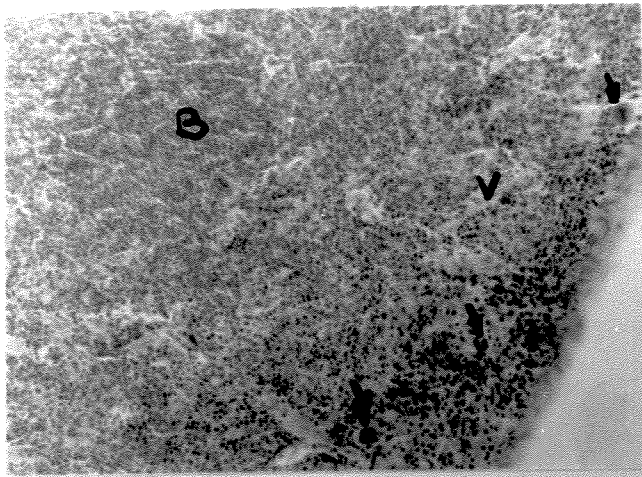
c) *TC + vírus*. Observa-se hiperplasia bem evidente da polpa branca e da zona marginal, com intensa hemopoiese na polpa vermelha (setas).

d) *TS*. À esquerda observa-se hiperplasia da polpa branca e à direita nítida hemopoiese intensa e difusa na popla vermelha.

Coloração: Hematoxilina & eosina.

Aumento: D - 528x.

E - 330x.



TIMO:

O resultados obtidos, em relação ao peso e celularidade, do timo são mostrados na figura 12A. A presença do vírus, isoladamente ou em associação com parasitas do estoque de baixa virulência, foi capaz de provocar uma pronunciada queda no peso e na celularidade do órgão, com início no terceiro dia após a infecção e que perdurou durante todo o período de observação de sete dias. Quando os animais receberam apenas os parasitas, de qualquer um dos estoques, tais alterações não puderam ser observadas.

Os resultados das porcentagens de células tímicas expressando o marcador Thy1.2 são demonstrados na tabela V e são paralelos à queda na celularidade observada anteriormente. Animais inoculados com vírus, isoladamente ou em associação com parasitas, mostraram queda na porcentagem de células expressando o marcador para linfócitos T.

Tabela V. Variação na porcentagem de células apresentando o marcador Thy 1.2 no timo dos diferentes grupos experimentais.

Dias após infecção	Grupos infectados ^a			
	TC	TS	vírus	TC + vírus
0	94.7 ± 3.6	94.7 ± 3.6	94.7 ± 3.6	94.7 ± 3.6
3	90.2 ± 7.9	96.3 ± 3.7	87.6 ± 7.5	85.0 ± 7.0
5	92.2 ± 3.3	94.0 ± 5.2	83.6 ± 8.3	78.5 ± 9.9
7	93.1 ± 2.2	88.5 ± 3.5	83.0 ± 3.4*	70.5 ± 3.5*

^a Os valores representam a média aritmética de três experimentos ± SEM.

n = 5 animais por grupo.

* p ≤ 0,01 quando comparado com animais normais.

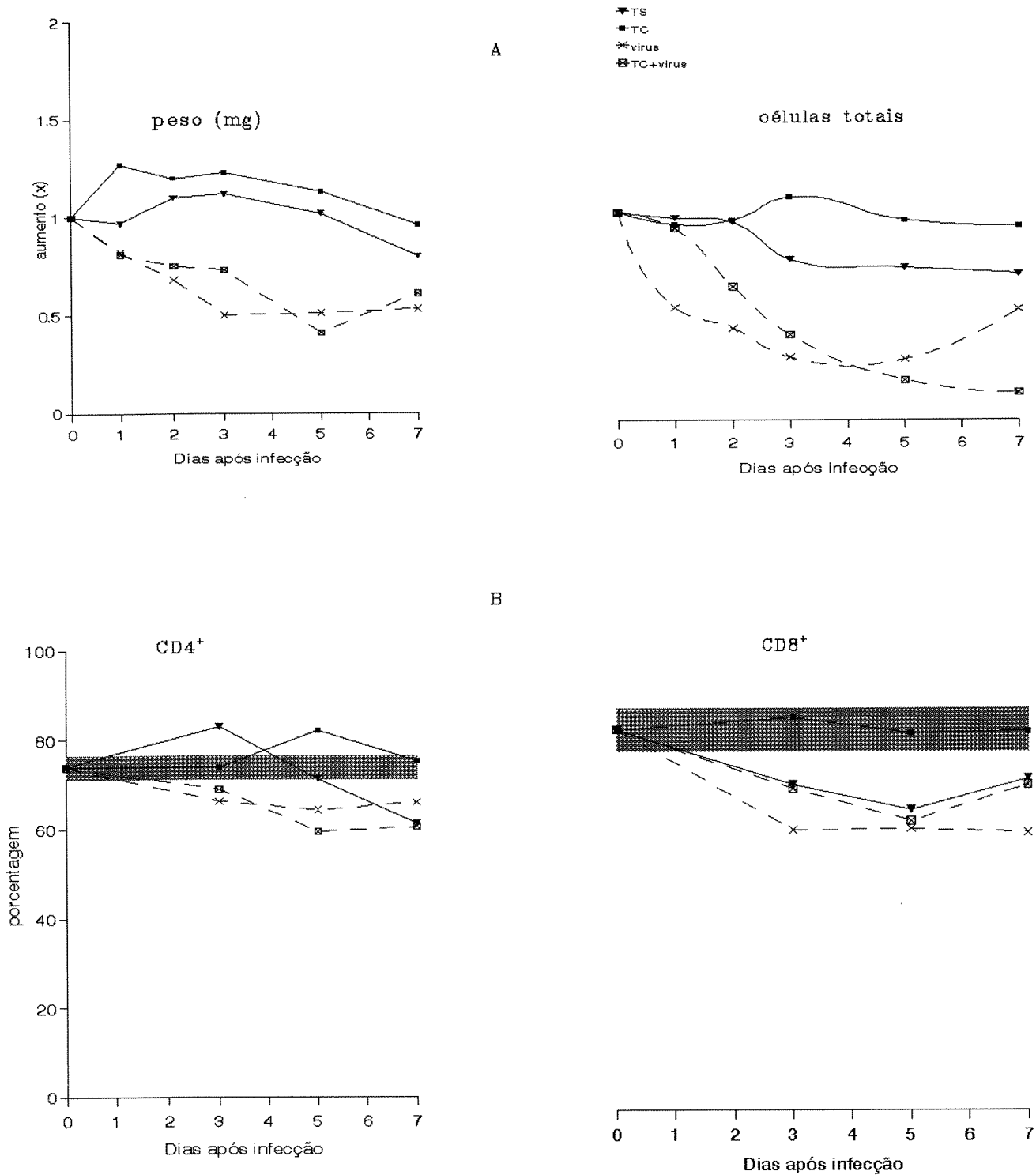


Figura 12. Alterações no timo durante infecção com TC, TS, TC+vírus e vírus isolado: (A) peso e celularidade; (B) percentual de CD4 e CD8.

A figura 12B mostra a contagem das subpopulações de células T no timo, onde observa-se uma queda de ambas as populações celulares expressando os marcadores CD4⁺ e CD8⁺ em todos os grupos experimentais, exceto no grupo que recebeu o estoque de baixa virulência. A inoculação do estoque TC + vírus induziu modificações semelhantes às encontradas no grupo inoculado com TS.

O exame histológico do timo dos animais infectados com parasitas do estoque TC apresentou, por ocasião do terceiro dia após infecção, uma camada cortical regular com grande quantidade de mitoses, num padrão semelhante ao encontrado no órgão normal (Figura 13.a e 13.b). Já os animais infectados com parasitas do estoque TC+vírus mostraram, no terceiro dia após infecção, alterações na camada cortical, que se apresentou reduzida, com escassas figuras de mitose e o aspecto em “céu estrelado” gerado pela presença de células com núcleos grandes, claros e citoplasma amplo e pouco evidente - os histiócitos (setas). Pôde ser observado também pequenos restos nucleares de células apoptóticas sendo fagocitadas. A região medular apresentou-se bem mais desenvolvida do que no animal normal e pôde-se notar a presença de Corpúsculos de Hassal, constituído de células epiteliais, com variados graus de queratinização central (Figura 13.c).

A inoculação dos animais com o estoque TS provocou pequenas alterações visualizadas à partir do terceiro dia após a infecção. A espessura da camada cortical não estava significativamente diminuída em relação ao normal, porém houve uma redução da quantidade de figuras de mitose, as quais não podem ser observadas na foto em detalhe (Figura 13.d). Entretanto, alterações bem visíveis foram observadas por volta do sétimo dia após a infecção, constituídas por progressiva depleção linfóide. O exame post-mortem destes animais também indicou a presença de ninhos de parasitas neste órgão, além de intensa depleção linfóide (Dados não mostrados).

Figura 13. Aspecto histológico do timo de animais infectados com os diferentes estoques do parasita (TC e TS) e com parasitas e vírus (TC + vírus).

a) *Normal*. Observa-se uma camada cortical espessa, ocupando toda a área da foto à esquerda. À direita, um detalhe da cortical tímica, onde podem ser notadas frequentes figuras de mitose (setas).

b) *TC*. Não se observa diferença significativa na espessura da camada cortical (E), nem na frequência de mitoses (D, setas) em relação ao timo do grupo normal.

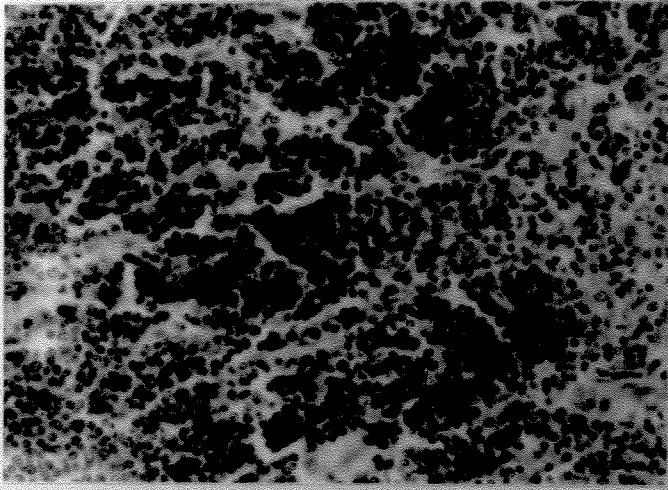
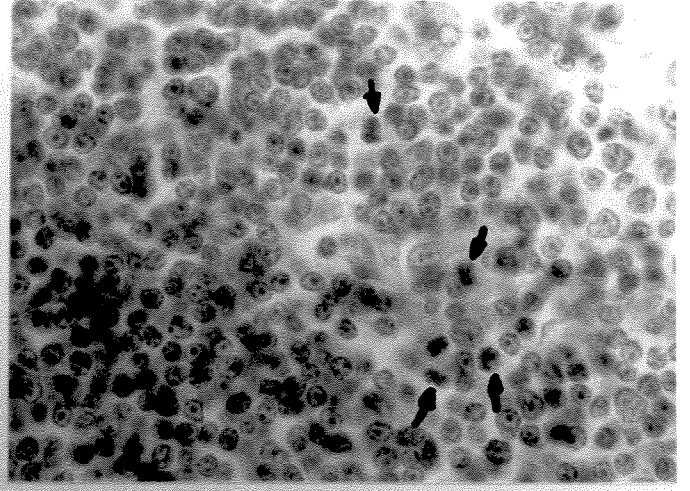
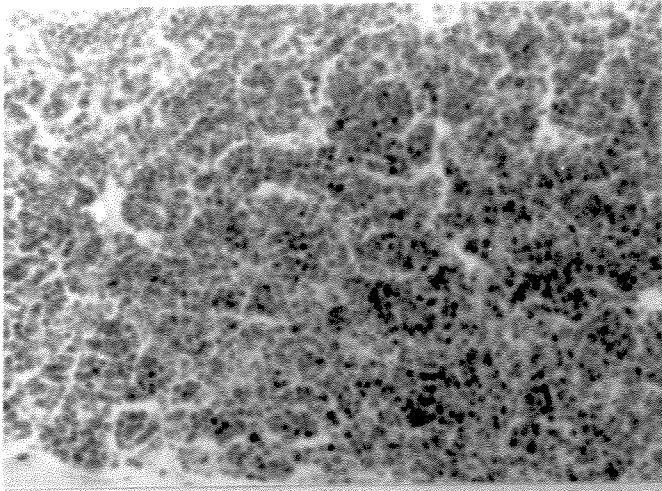
c) *TC + vírus*. Pode-se observar que a camada cortical está nitidamente diminuída (setas no limite cortical/medular - M). À direita, evidenciam-se os histiócitos (setas) e as figuras de mitose estão ausentes.

d) *TS*. A espessura da camada cortical não está significativamente diminuída em relação ao normal (E), porém há uma redução da quantidade de figuras de mitoses que não podem ser visualizadas neste detalhe (D).

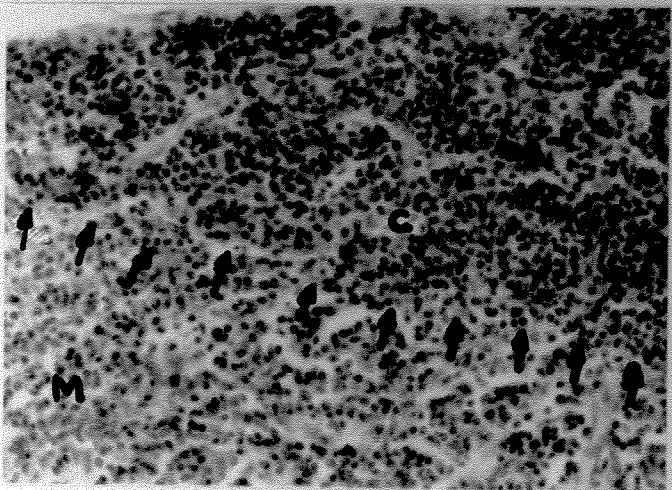
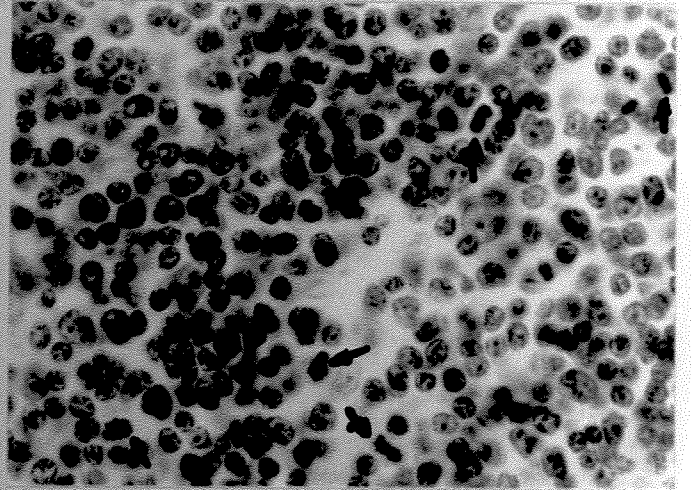
Coloração: Hematoxilina & eosina.

Aumento: D - 1.320x.

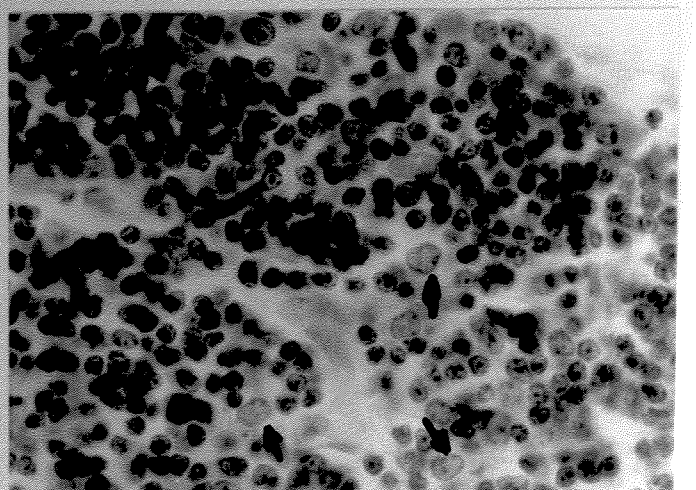
E - 528x.



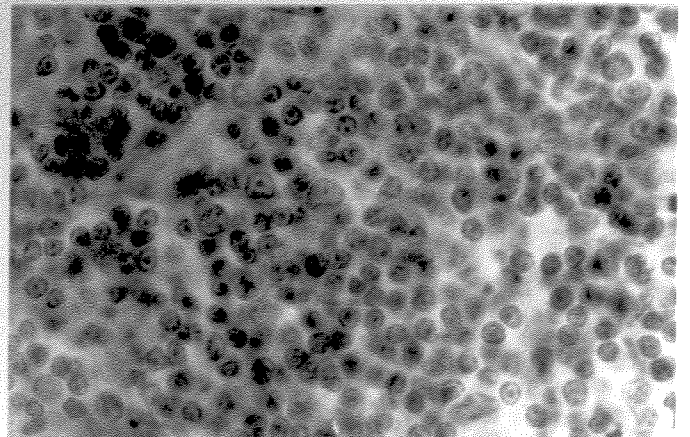
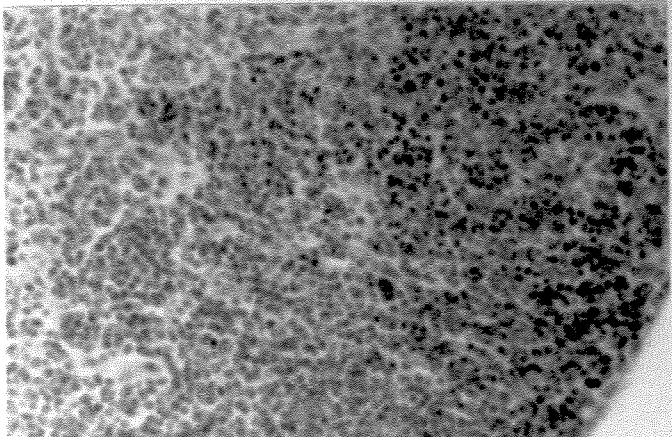
b



c



d



MEDULA ÓSSEA:

O aspecto da medula óssea dos animais infectados com parasitas do estoque TC é superponível ao grupo normal. As células hemopoiéticas alojam-se em cordões, delimitados pelos seios venosos que são bastante nítidos. Os elementos eritroblásticos são evidentes (Figura 14.a e 14.b).

A Figura 14.c mostra os resultados dos animais infectados com o estoque TC + vírus onde pôde-se observar um adensamento da celularidade, com colabamento dos seios venosos. Os elementos de todas as séries parecem participar da hiperplasia. No detalhe, nota-se alterações megaloblastóides, mais evidentes nos elementos granulocíticos.

Os animais inoculados com parasitas do estoque TS apresentaram uma medula compacta, hiper celular. Predomina a hiper celularidade da série granulocítica, que também exhibe elementos megaloblastóides (Figura 14.d).

Figura 14. Aspecto histológico da medula óssea de animais infectados com os diferentes estoques do parasita (TC e TS) e com parasitas e vírus (TC + vírus).

a) *Normal*. Observam-se células hemopoiéticas alojadas em cordões, delimitados pelos seios venosos (S), que são bastante nítidos. Os elementos eritroblásticos são bem evidentes (setas).

b) *TC*. Aspecto semelhante ao observado na medula de animais normais.

c) *TC + vírus*. Nota-se um colapso dos seios venosos devido a um adensamento celular. Esta hiperplasia parece ocorrer com todos os elementos de todas as séries (E). À direita, observa-se alterações megaloblastóides, principalmente nos granulócitos (setas).

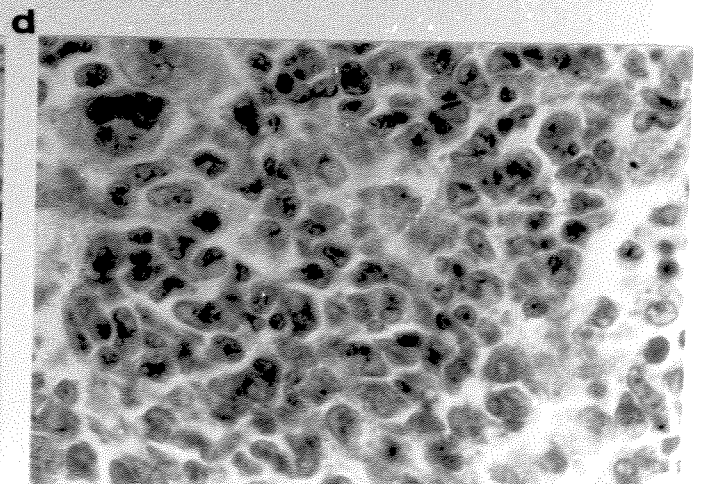
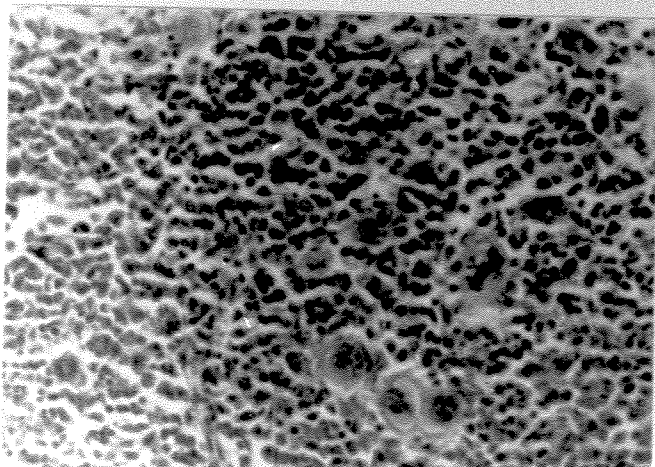
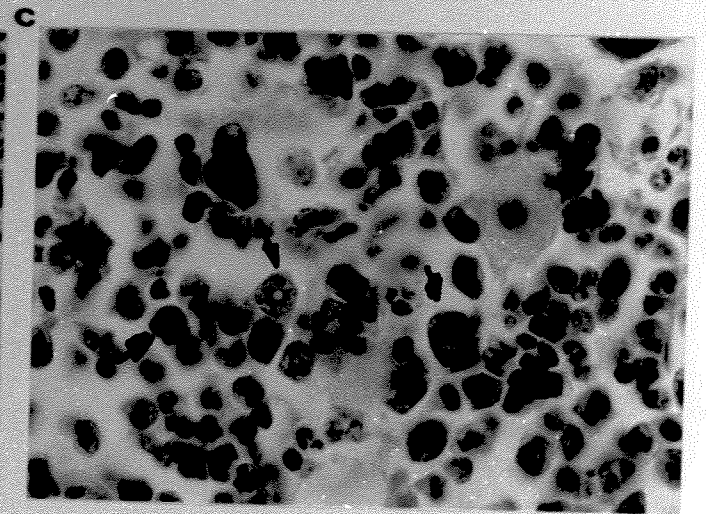
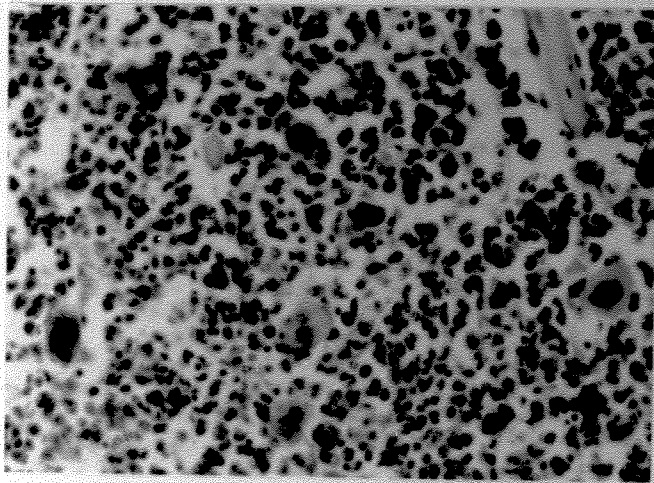
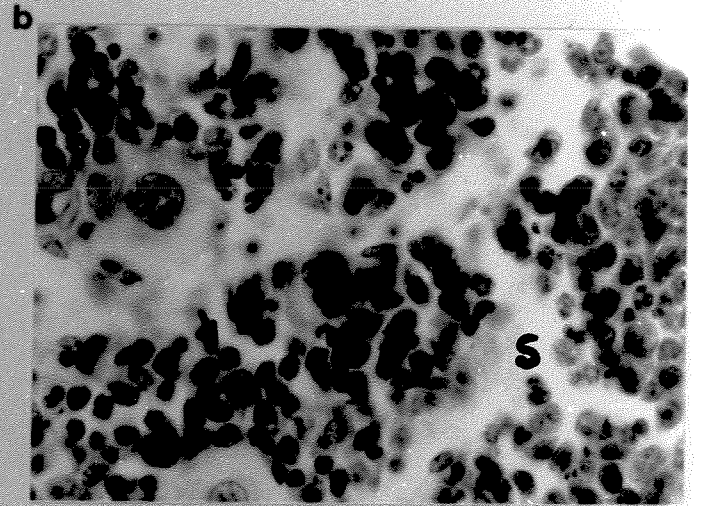
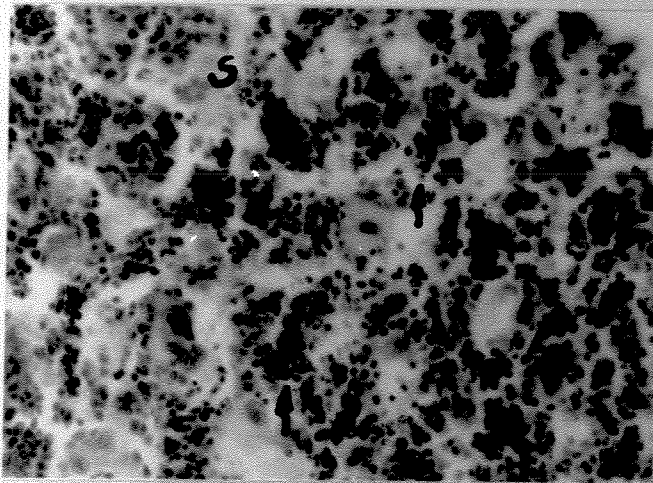
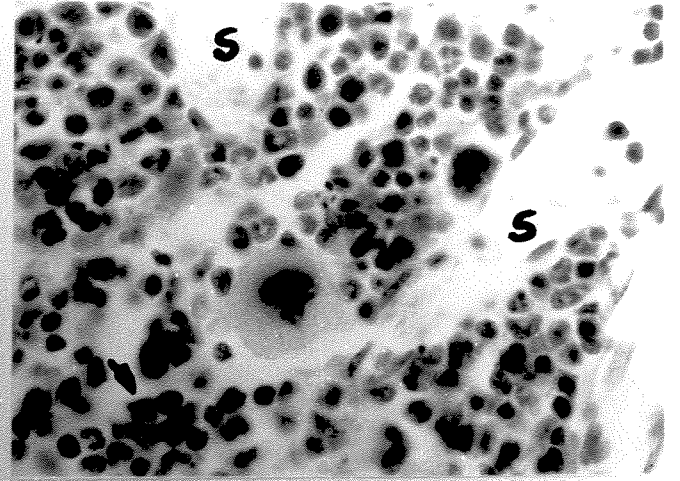
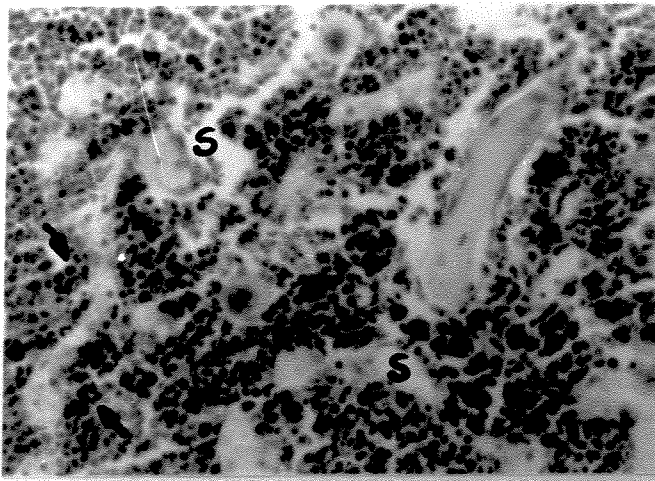
d) *TS*. Observa-se uma medula compacta, com hiperplasia da série granulocítica (D).

Elementos megaloblastóides também podem ser observados.

Coloração: Hematoxilina & eosina.

Aumento: D - 1.320x.

E - 528x.



DISCUSSÃO

Os resultados apresentados confirmam a hipótese de que o estoque Y_{2orig} , originalmente mantido em animais convencionais, está contaminado com um vírus, a despeito do fato deste estoque ter sido mantido em animais SPF nos últimos 5 anos. Testes de imunofluorescência indireta, realizados com o soro dos animais infectados com este estoque de parasitas, demonstraram a presença de anticorpos que reagem com o vírus da hepatite murina tipo 3 (MHV-3). Estes resultados foram confirmados pelo Map test, onde animais, mantidos em isoladores, foram inoculados com o plasma filtrado de animais infectados com o estoque Y_{2orig} e depois de vinte e oito dias tiveram seus soros testados para a presença de anticorpos contra quatorze diferentes vírus.

Os animais infectados com o estoque Y_{2orig} apresentaram maior nível de parasitemia e menor taxa de sobrevivência do que animais infectados com os estoques Y_{2TC} e Y_{2NNN} , que foram submetidos à passagem seriada em meios de cultura (TC) e meio axênico (NNN) antes de serem mantidos por transferência de animal para animal (Figura 1). Estes resultados podem sugerir a seleção de parasitas avirulentos, à partir do estoque original, gerada pela passagem nos diferentes meios acima descritos. Vários trabalhos têm demonstrado o isolamento de clones de baixa patogenicidade, causado pela pressão seletiva dos meios de cultura de células ou de meios axênicos (Bongertz & Dvorak, 1983; Postan *et al.*, 1983; Doyle *et al.*, 1984; Lima *et al.*, 1990). Contudo, nossos resultados não podem ser atribuídos a uma seleção clonal uma vez que os estoques obtidos permaneceram virulentos e foi demonstrado que o plasma filtrado de animais infectados com o estoque Y_{2orig} continha um fator capaz de restaurar, em animais infectados com os estoques Y_{2TC} e Y_{2NNN} , a alta parasitemia e o menor tempo de sobrevivência observados em animais infectados com o estoque (Figura 2). A utilização de um estoque de parasitas mantidos exclusivamente em cultura de células (TC) e que apresenta a característica de não matar o animal, provavelmente devido a uma pressão seletiva do meio, também demonstrou uma ação crucial do plasma filtrado obtido de animais infectados com o estoque Y_{2orig} , uma vez que aboliu a característica daquele estoque (Figura 3).

O fator presente no plasma foi então seriadamente transferido, de animal para animal,

o que representa uma purificação biológica, correspondendo ao seu isolamento. Se considerarmos que quando injetamos um volume de 0,2ml no animal estamos diluindo o antígeno por um fator de no mínimo 1:5, na décima passagem estaríamos diluindo o antígeno $(1:5)^{10}$, praticamente 1:10.000.000. Isto descarta a possibilidade da presença de produtos liberados pelos parasitas no soro dos animais infectados com a décima passagem deste fator e demonstra que este era, sem dúvida, um vírus, pois era capaz de se multiplicar. Além disso, este fator, provisoriamente chamado de vírus X, também era inativado através do aquecimento e foi neutralizado por anticorpos específicos para o grupo dos coronavírus (anti- MHV 3).

Um aumento marcante na virulência deste vírus pode ser observado durante o seu isolamento, através da transferência seriada em animais BALB/c de 4 semanas de idade, evidenciado pela mortalidade destes animais 3 ou 4 dias após a infecção (Tabela I). Mesmo animais adultos injetados com uma dose altamente diluída da décima passagem do vírus apresentaram sinais clínicos de doença e não sobreviveram à infecção. Este fato suscita a seguinte questão: por que a virulência do vírus não foi exacerbada durante a manutenção do parasita? Até o momento não existem dados que possam explicar esta aparente contradição. Observe-se, contudo, que o vírus X foi isolado em animais BALB/c jovens, de quatro semanas de idade, que se mostram 1.000 vezes mais susceptíveis do que animais CBA adultos que são normalmente utilizados para manutenção do parasita (Tabela II). Além do “status” imunológico do animal no momento da infecção, devemos considerar também a dose do vírus inoculada. É muito provável que, por ocasião do repique do parasita, ou seja, no sétimo dia após infecção, a maioria das partículas virais já tenha sido eliminada por células que controlam este tipo de infecção. Em trabalho recente, Selin & Welsh (1994) mostram que animais C57BL/6, inoculados com baixas ou moderadas doses do vírus murino da coriomeningite linfocítica (LCMV), apresentam uma marcante resposta de células T $CD8^+$ que atingem um pico por volta do oitavo ou nono dia após a infecção, com eliminação do antígeno viral no sétimo dia após a infecção.

O fato de anticorpos anti-X terem sido preparados utilizando-se a décima passagem seriada do vírus, permite-nos excluir a possibilidade de que estes anticorpos tenham alguma especificidade para antígenos estruturais de *Trypanosoma cruzi*. Os experimentos de

neutralização sugerem fortemente que o vírus X é um coronavírus, uma vez que a mortalidade dos animais inoculados com o vírus X isolado foi dramaticamente reduzida quando anticorpos anti-X (Tabela III). Entretanto, anticorpos anti-MHV 3, aparentemente não têm nenhum efeito nos níveis de parasitemia e na mortalidade de animais infectados com os estoques contaminados (Tabela IV). Este fato pode ser interpretado admitindo-se a presença de dois vírus ou que o vírus X é um coronavírus de especificidade diferente do MHV-3. Desde que nenhum outro vírus foi detectado no Map test realizado, é provável que o vírus X seja um coronavírus que apresente algumas diferenças biológicas em relação ao MHV-3.

Várias linhagens dentro da família Coronaviridae que variam em sua virulência, genética e composição antigênica, têm sido isoladas (Bond *et al.*, 1979; Barthold & Smith, 1984; Barthold, 1986). Os vírus desta família, apresentam distribuição mundial e têm alta prevalência em diversos biotérios (Lussier & Descoteaux, 1986; Kraft & Meyer, 1990). A rota primária de transmissão parece ser a naso-oral (Taguchi *et al.*, 1979) e o contato direto com animais infectados ou com equipamentos contaminados, tais como gaiolas, bebedouros, maravalha ou ração, são as rotas comuns de transmissão numa colônia. Não há evidências de transmissão intrauterina para o feto em condições naturais, mas este tipo de transmissão tem sido reportado em condições experimentais (Katami *et al.*, 1978). O quadro clínico depende do genótipo e da idade do animal, mas de um modo geral animais adultos, imunocompetentes, mostram pouco ou nenhum sinal clínico com a infecção natural. Linhagens susceptíveis a este patógeno, como, por exemplo, animais BALB/c e C57BL, desenvolvem uma hepatite aguda e morrem entre o terceiro e quinto dias após a infecção, enquanto que animais C3H são relativamente resistentes (Taguchi *et al.*, 1976).

Os resultados obtidos evidenciam que um dos estoques da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, mantido em nosso laboratório, está contaminado por um vírus, antigenicamente relacionado com o MHV 3. A presença deste vírus na cepa CL de *Trypanosoma cruzi* pode ser inferida pelo fato de anticorpos anti-X induzirem uma redução significativa no nível de parasitemia e na taxa de mortalidade de animais infectados com esta cepa do parasita. A contaminação dos estoques do parasita com um vírus murino não é um fenômeno restrito ao nosso laboratório. Torrecilhas *et al.* (1994) também atribuem à contaminação pelo MHV

tipo 3, resultados discrepantes encontrados em ensaios para dosagem de IL-10 produzida em animais infectados com o parasita. Além disso, em um recente levantamento sobre os dezoito principais biotérios de diferentes instituições ligadas ao ensino e pesquisa, todos eles, excluindo-se o CEMIB-UNICAMP, apresentavam-se contaminados com pelo menos coronavírus além de outras infecções virais e parasitárias (Giglioli, R. & Rangel, H.. Comunicação pessoal).

Alguns protozoários podem ser encontrados infectados com vírus que alteram suas características biológicas (Wang & Wang, 1991). Entretanto, até agora nenhum vírus foi detectado em *Trypanosoma cruzi* e o fato do vírus X ser seriadamente transferido em animais na ausência do parasita, praticamente permite-nos descartar a hipótese de que o vírus X teria uma ação direta sobre o *Trypanosoma cruzi*. Por outro lado, este vírus poderia estar alterando a resposta do hospedeiro, como já demonstrado ocorrer com outros vírus murinos (Jolicouer & Lamontagne, 1989; Fallon *et al.*, 1991; Smith *et al.*, 1991).

Animais infectados com o estoque Y_{2orig} ou com o estoque TC + vírus apresentaram uma queda marcante no número de linfócitos circulantes no sangue, confirmando nossas primeiras observações de uma provável contaminação e de uma possível ação do vírus alterando a resposta imune do hospedeiro. Alterações na resposta imune induzidas por infecções virais têm sido reportadas por vários autores (McChesney & Oldstone, 1987; MacChesney & Oldstone, 1989; Mosier, 1994) e recentemente Silva *et al.* (1994) observaram a ocorrência de elevada parasitemia e alta taxa de mortalidade em camundongos infectados, concomitantemente, com *Trypanosoma cruzi* (cepa Tulahuen) e vírus da leucemia murina (LMV).

A análise das alterações hematológicas encontradas em animais infectados com parasitas tem sido utilizada, no sentido de se estabelecer os tipos celulares envolvidos na eliminação do parasita, bem como dar um panorama da citodinâmica nas diferentes fases desta infecção (Cardoso & Brener, 1980; Duffey *et al.* 1985). No presente trabalho, a fase precoce da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* foi eleita com o objetivo de se verificar alterações de células sanguíneas que pudessem explicar as alterações observadas, quando os animais são inoculados com os diferentes estoques de parasita. Segundo os dados apurados com nossas amostras da cepa Y, não podemos atribuir ao parasita qualquer alteração de

leucócitos do sangue periférico. Entretanto, podemos concluir que o fator existente no plasma do estoque Y_{2orig} é capaz de causar alterações quantitativas de populações leucocitárias, uma vez que também foram observadas alterações hematológicas em camundongos injetados apenas com o plasma obtido de animais infectados com este estoque ou com o vírus após seu isolamento (Figura 6). Anticorpos específicos para este vírus foram capazes de neutralizar os efeitos induzidos pelo plasma de animais infectados com o estoque Y_{2orig} e pelo vírus isolado e também foram capazes de abolir as alterações observadas quando o estoque Y_{2orig} era utilizado (Figura 7). Estes resultados encontram-se de acordo com resultados obtidos por Fujioka *et al.* (1985), onde os autores demonstram alterações hematológicas induzidas pelo MHV-3.

Alterações hematológicas têm sido descritas em consequência de infecções virais (Piazza *et al.*, 1965; Fujioka *et al.*, 1985) bem como em muitas tripanosomíases experimentais incluindo *Trypanosoma musculi* (Duffey *et al.*, 1985), *Trypanosoma rhodesiense* (Davis *et al.*, 1974), *Trypanosoma congolense* (Wellde *et al.*, 1978), *Trypanosoma brucei* (Clayton *et al.*, 1980) e *Trypanosoma cruzi* (Cardoso & Brener, 1980; Repka *et al.*, 1985). As alterações hematológicas descritas aqui são, inequivocamente, causadas pelo vírus mas, em razão das observações serem restritas a poucos estoques do parasita e a um período precoce da infecção, não podemos descartar a possibilidade de que outros estoques do parasita induzam efeitos semelhantes.

A obtenção de estoques polares do parasita, com características de alta virulência (TS) e de baixa virulência (TC), permitiu-nos comparar a evolução da infecção chagásica, na busca de um melhor entendimento da resposta do hospedeiro a este tipo de infecção.

Os resultados mostraram uma reação focal, representada por uma hiperplasia no linfonodo homolateral, ou seja, próximo ao local da inoculação, em todos os grupos investigados. Esta hiperplasia foi pequena, quando os animais receberam apenas o vírus mas foi muito pronunciada quando os animais receberam parasitas do estoque TC. A inoculação dos dois patógenos em associação (TC + vírus) provocou uma hiperplasia no órgão semelhante àquela apresentada quando os animais receberam parasitas do estoque TS.

Hiperplasia linfóide tem sido observada na maioria, senão em todas, as infecções parasitárias (Freeman & Parish, 1978; Roberts & Weidanz, 1978; Minóprio *et al.*, 1986;

Inchley, 1987; Lohoff *et al.*, 1988) e evidências para a presença de substâncias mitogênicas em protozoários tem sido relatada (Mansfield *et al.*, 1976; Assoku & Tizard, 1978; Clayton *et al.*, 1979). Contudo, a presença ou a secreção de fatores imunossupressores do tripanosoma (TIF) também é bastante citada (Cunningham & Kuhn, 1980; Kierszenbaum, 1981; Reed *et al.*, 1984; Kierszenbaum *et al.*, 1990). A diferença observada quanto à intensidade da hiperplasia induzida pelos estoques TC e TS do parasita sugere diferenças quanto à concentração destes fatores.

A literatura apresenta muita controvérsia em relação à atividade mitogênica de vírus (Scalzo & Anders, 1985; Deckhut *et al.*, 1993), mas imunossupressão causada pela infecção de células imunocompetentes tem sido observada em numerosas infecções virais em humanos e em animais (Mims, 1986; Casebolt *et al.*, 1987; McChesney & Oldstone, 1987; McChesney *et al.*, 1989; Souza *et al.*, 1991). O fato do vírus isolado induzir apenas uma pequena hiperplasia e de também ser capaz de reduzir a hiperplasia induzida pelo estoque TC de parasitas, sugere que este vírus tem uma ação inibitória ou supressora sobre a proliferação celular.

Os linfócitos T têm demonstrado um papel importante nas infecções experimentais com *Trypanosoma cruzi* uma vez que animais “nude” ou linhagens mutantes de camundongos que não possuem subpopulações CD4⁺ e CD8⁺ são extremamente susceptíveis e invariavelmente morrem quando inoculados com doses relativamente baixas do parasita (Kierszenbaum & Pienkowski, 1979; Trischmann & Bloom, 1980; Araújo, 1989; Tarleton *et al.*, 1992; Rottenberg *et al.*, 1993). Tem sido atribuído um papel protetor na infecção com o *Trypanosoma cruzi* tanto para subpopulações CD4⁺, com atividade “helper” sobre células B e/ou macrófagos (Krettli & Brener, 1982; Silva *et al.*, 1992), como para sub-populações CD8⁺, com função efetora direta de lise sobre células infectadas pelo parasita (Nickell *et al.*, 1993).

A população celular que apresentou uma maior expansão neste órgão, em todos os grupos experimentais, foi aquela com marcador para CD8. Atividade citolítica bem como uma atividade supressora tem sido associada às células T CD8⁺ (Cantor & Boyse, 1975; Nabholz & MacDonald, 1983). A ativação de linfócitos T citotóxicos (CTL) em infecções virais é bem conhecida (Zinkernagel & Doherty, 1977), mas recentemente tem sido

demonstrada a participação destas células também como principais efetores da resposta imune contra diferentes protozoários (Kumar *et al.*, 1988; Hakim *et al.*, 1991; Titus *et al.*, 1987; Weiss *et al.*, 1988). Tarleton (1990) também postula a importância desta subpopulação celular na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, baseado tanto na observação de que animais altamente resistentes à infecção com a cepa Brazil tornam-se susceptíveis, quando depletados no início da infecção de células T CD8⁺, como também no conhecimento da interação do parasita com as células do hospedeiro. É bem conhecido o fato do parasita, após penetrar na célula do hospedeiro, ser capaz de residir livremente no seu citoplasma e desta forma seus antígenos serem processados e apresentados junto com moléculas de classe I do complexo maior de histocompatibilidade (Araújo, 1985; Carbone & Bevan, 1990).

Reações semelhantes às encontradas no linfonodo homolateral, apenas de menor intensidade, foram observadas no linfonodo contralateral indicando a existência de uma reação sistêmica. A histologia destes dois órgãos mostrou apenas uma reação inflamatória geral sem distinção entre os grupos.

O conjunto de dados obtidos com a observação do linfonodo homolateral e contralateral indica que nestes órgãos ocorreu apenas uma resposta inflamatória, à base de células CD8⁺ e que esta resposta foi mais rápida e mais intensa quando o animal foi inoculado com parasitas do estoque TC.

Um aumento marcante no peso do baço foi observado nos animais inoculados com parasitas do estoque TS. Este aumento não seguiu paralelamente ao aumento de células totais, que foi discreto e sem alterações significativas no percentual de células B, CD4⁺ ou CD8⁺. Estes dados indicam que a esplenomegalia foi provavelmente causada por fenômenos hemodinâmicos, pelo menos em parte. De fato, os dados histológicos demonstram uma grande perda da estrutura da polpa vermelha com intensa congestão. Ademais, observou-se neste grupo um hiperesplenismo, com grande número de megacariócitos, indicando produção de células neste órgão para serem repostas rapidamente, provavelmente em virtude de comprometimento de outros órgãos linfopoiéticos. Este resultado está de acordo com o trabalho de Takasu *et al.*, 1990, onde os autores demonstram que o baço é um órgão hematopoiético em camundongos e um aumento da hemopoiese ocorre durante a doença de

Chagas experimental.

No caso dos animais inoculados com o estoque TC de parasitas é notável o espessamento que ocorreu com a zona marginal, observado no exame histológico. Hirokawa *et al.*, 1981, estudando a hiperplasia linfóide decorrente da infecção com *Trypanosoma musculi*, correlacionaram a presença de substâncias derivadas do parasita, e depositadas na zona marginal do baço dos animais, com a imunodepressão também observada neste tipo de parasitose. É possível que a ausência de substâncias supressoras no estoque TC de parasitas permita uma maior expansão da zona marginal. Além disso, observou-se um marcante aumento de células T CD4⁺. A literatura mostra que este tipo celular pode estar envolvido tanto no desenvolvimento da resistência ao parasita como na patogênese da doença de Chagas (Ben Younes-Chennoufi *et al.*, 1988; Hontebeyrie-Joskowicz *et al.*, 1987; Minóprio *et al.*, 1987). Os dados aparentemente contraditórios podem estar relacionados com a existência de duas categorias de linfócitos T, os linfócitos Th1 e Th2, baseadas no perfil de citocinas secretadas (Mosmann *et al.*, 1986; Mosmann & Coffman, 1989). Entretanto, no caso da infecção com o *Trypanosoma cruzi* ainda não é clara a participação preferencial ou predominante de um ou de outro clone de células T, uma vez que são detectadas interleucinas secretadas pelos dois sub-tipos celulares nos animais infectados com este parasita (Silva *et al.*, 1992).

Animais inoculados apenas com vírus não mostraram grandes alterações neste órgão, mas os animais inoculados com o estoque TC de parasitas e com vírus associado tiveram um significativo aumento no peso do baço, e as observações histológicas foram semelhantes às encontradas nos animais inoculados com o estoque TS de parasitas.

A menor e mais tardia proliferação celular observada nos animais que foram infectados com os parasitas do estoque TS também pode envolver outros mecanismos de supressão, além da suposição de que as formas tripomastigatas exerçam uma ação direta sobre as funções de linfócitos T. E neste sentido vários autores têm descrito a indução de células esplênicas supressoras, semelhantes a macrófagos, durante a infecção com o *Trypanosoma cruzi* (Cunningham & Kuhn, 1980; Kierszenbaum, 1982; Tarleton, 1988; Cerrone & Kuhn, 1991; Cerrone *et al.*, 1992; Abrahamsohn & Coffman, 1995).

A ativação de diferentes subpopulações, de acordo com a proximidade do local da

infecção, é intrigante. Entretanto, dados encontrados na literatura mostram a participação das duas subpopulações de células T (Tarleton, 1990; Sato *et al.*, 1992) durante a infecção experimental com o *Trypanosoma cruzi*, o que poderia explicar nossos resultados, uma vez que investigamos as possíveis alterações induzidas pelo parasita em vários compartimentos linfóides. Esta ativação diferencial pode significar diferenças fisiológicas entre os dois órgãos ou ainda que células T CD8⁺ tenham um papel crítico no desenvolvimento da resposta inflamatória focal.

Uma grande perda de peso e de celularidade no timo foi observada, quando os animais foram inoculados com vírus. Estes dados correlacionam-se com a linfopenia observada logo após a inoculação dos animais com o estoque Y_{2orig} de parasitas e que perdura por mais ou menos três dias. Entretanto, os animais inoculados apenas com vírus mostram uma tendência de recuperação do órgão, após o quinto dia de infecção, o que pode explicar o fato destes animais sobreviverem. Ao contrário, a intensa atrofia observada nos animais inoculados com parasitas e vírus simultaneamente (TC + vírus) não parece ser temporária, pois que os animais não sobrevivem, e ainda indica uma ação concorrente dos dois patógenos sobre este órgão. Animais inoculados com parasitas do estoque TS apresentaram, nos três primeiros dias da infecção, uma pequena queda na celularidade relacionada com queda na porcentagem de células expressando o marcador CD8. Alterações quantitativas significantes devem aparecer com o decorrer da infecção, uma vez que os animais não sobrevivem à infecção com este estoque de parasitas.

O exame histológico não mostrou nenhuma alteração quando os animais receberam parasitas do estoque de baixa virulência (TC). Contudo, os animais inoculados com parasitas do estoque TS apresentaram uma queda no número de mitoses e, por volta do sétimo dia de infecção, estes animais apresentaram alterações mais severas neste órgão, sendo inclusive observado por ocasião da morte do animal (12 dias após a infecção), a presença de ninhos de parasitas, indicando que o timo pode ser um órgão alvo na infecção com parasitas do estoque TS. Estes resultados estão de acordo com os resultados obtidos por outros autores (Savino *et al.*, 1989; Savino *et al.*, 1992), mostrando que o timo é um órgão alvo durante a infecção com *Trypanosoma cruzi*. E, embora não tenha sido observada, é provável que o estoque TC também exerça alterações no timo talvez de pequena intensidade, não

detectáveis pelos métodos utilizados neste estudo.

Vários trabalhos têm relatado modificações no microambiente tímico em animais infectados com diferentes vírus (Le Prevost *et al.*, 1975; Knobler & Oldstone, 1987; Lamontagne & Jolicoeur, 1991; Savino *et al.*, 1992; King *et al.*, 1992). Entretanto, a presença de partículas virais neste órgão nem sempre é detectada, sugerindo uma infecção não produtiva das células do estroma tímico com indução de apoptose (Jolicoeur & Lamontagne, 1994). A presença de uma ação direta do vírus no timo não foi investigada no presente trabalho, mas a perda da arquitetura tímica, observada nestes animais logo no início da infecção, com a presença de restos celulares e de histiócitos frequentes, parece ser resultante de lise celular direta ou indireta induzida pelo vírus.

A alteração ou a perda da histoarquitetura tímica, observada nos animais inoculados com parasitas do estoque TS, com vírus e com parasitas do estoque TC mais o vírus, deve provocar mudanças no processo de seleção de células T, uma vez que a interação destas células com as células do microambiente tímico está, provavelmente, comprometida. Neste sentido, pode-se esperar uma expansão clonal anormal e até uma migração para a periferia de clones de células T auto-reativas. Além disso, Savino (1995) postula que a exposição de tímócitos à antígenos do parasita poderiam alterar o padrão normal de maturação para formação do repertório de células T. A presença de partículas virais em células epiteliais tímicas também poderia induzir alterações semelhantes e, de fato, respostas imunológicas aberrantes após algumas infecções virais, incluindo infecção por coronavírus, são suspeitas de dispararem doenças autoimunes (Oldstone, 1987; Wraith *et al.*, 1989). No entanto, as alterações observadas no timo de animais infectados apenas com o vírus são transitórias, e o órgão é capaz de se recuperar garantindo a sobrevivência do animal. A infecção associada de parasitas e de vírus (TC + vírus) não permite esta recuperação e o animal morre, provavelmente, devido a uma exaustão de suas células linfóides sem subsequente reposição.

Este resultados estão de acordo com a literatura que mostra o comprometimento do timo em várias situações naturais e experimentais, como por exemplo, em casos de má nutrição (Dourov, 1986), uso de drogas (Lopez *et al.*, 1992; Schuurman *et al.*, 1990), durante o desenvolvimento de processos autoimunes (Dardenne *et al.*, 1983), durante o processo de envelhecimento (Dardenne *et al.*, 1993), nas infecções virais (Lamontagne &

Jolicoeur, 1991; Price *et al.*, 1993; Savino *et al.*, 1986) e nas infecções parasitárias (Savino *et al.*, 1989; Gonçalves Costa *et al.*, 1991; Roberts & Weidanz, 1978).

Estes dados mostram que os parasitas do estoque TS e o vírus exercem uma ação a um nível central. E, embora não pudesse ser observada uma ação sobre o timo quando os animais receberam parasitas do estoque TC, é possível que os parasitas deste estoque também atuem sobre este órgão de uma forma menos intensa.

Alterações, ainda que apenas histológicas, foram observadas na medula óssea dos animais infectados com o estoque TS de parasitas e com vírus, associado ou não ao estoque TC. O comprometimento neste órgão linfóide primário pode ser responsável por um retardo ou até mesmo um bloqueio na saída de células linfóides destinadas ao timo e desta forma aumentar o comprometimento deste órgão. Aparentemente, entretanto, apenas as infecções com parasitas do estoque TS e com o estoque TC mais o vírus são duradouras, uma vez que os animais inoculados apenas com o vírus sobrevivem à infecção, provavelmente porque conseguem reverter as alterações iniciais.

O comprometimento da medula óssea tem sido relatado em diversas infecções parasitárias (Marcondes *et al.*, 1991; Clayton *et al.*, 1980). Entretanto, um estudo mais profundo dos componentes da medula óssea de animais infectados com os diferentes patógenos poderia elucidar diferentes mecanismos supressores ou ativadores de células precursoras e uma possível correlação com alterações hematológicas e em tecidos linfóides periféricos..

É interessante ressaltar que o estoque TC de parasitas além de não provocar a morte dos animais, mesmo quando inoculado em altas doses (10^5 parasitas/animal), induz o fenômeno da resistência precoce, descrito em nosso laboratório (Camargo *et al.*, 1991), onde camundongos inoculados com parasitas do estoque TC e desafiados três dias depois com uma dose letal do estoque virulento do parasita (TS), desenvolvem uma resistência específica ao parasita com baixa parasitemia e nenhuma mortalidade. Logo, eventos que tem lugar imediatamente após a penetração do parasita no hospedeiro são extremamente importantes no desenvolvimento da doença, sendo capazes até mesmo de determinar a sobrevivência do animal. A ativação policlonal de células T nos animais infectados com o estoque TC que é maior e mais rápida do que a ativação observada nos animais infectados

com o estoque TS, pode indicar diferenças entre os estoques que poderiam estar relacionadas com a presença de substâncias supressoras neste último estoque ou com um aumento de substâncias mitogênicas no primeiro. Alternativamente, seria interessante investigar a indução de células supressoras quando os animais são infectados com os diferentes estoques do parasita e nos diferentes compartimentos linfóides. A diferença temporal, na ativação policlonal, entre os dois estoques é de aproximadamente 3 ou 4 dias, o que certamente representa um tempo longo na vida do camundongo, podendo significar inclusive a diferença entre a sobrevivência e a morte.

A associação de parasitas do estoque TC com o vírus revelou alterações semelhantes às encontradas quando os animais foram inoculados com o estoque TS. A inoculação de TC + vírus foi capaz de provocar uma ativação policlonal de intensidade semelhante à encontrada nos animais inoculados com TS e levou os animais à morte. Entretanto, as células que tiveram sua porcentagem aumentada foram aquelas com marcador para CD8, semelhantemente ao resultado encontrado com a inoculação apenas com o vírus. Aparentemente, a presença do vírus força um aumento preferencial de células CD8⁺. Profundas alterações tímicas também puderam ser observadas, semelhantes às induzidas e descritas para a infecção apenas com o vírus. Portanto, é altamente provável que a interação entre os dois patógenos afete algum(s) mecanismo(s) básico(s) de resistência, levando o sistema imunológico à falência. Vários mecanismos, associados ou não, poderiam estar envolvidos: (a) a extensa morte celular observada no timo; (b) o bloqueio na produção de células T a nível de medula óssea e consequente não repovoamento do timo e de outros órgãos linfóides periféricos; (c) indução de células supressoras; (d) expansão e ativação de diferentes populações e subpopulações celulares.

O fato de o estoque virulento do parasita também ser capaz de induzir a morte dos animais, muito embora este estoque não se encontre contaminado com o vírus, parece refletir diferenças individuais dentro de uma mesma cepa do parasita, tornando-a mais ou menos agressiva para o hospedeiro.

RESUMO

A manutenção de formas sanguícolas do *Trypanosoma cruzi* nos laboratórios que desenvolvem pesquisas com o parasita é realizada através de repiques de sangue do hospedeiro previamente infectado. Entretanto, até recentemente estes animais eram criados de modo convencional, ou seja, em condições favoráveis à infecção com diferentes patógenos naturais, inclusive vírus de difícil detecção e controle.

Com a implantação do CEMIB-UNICAMP, capaz de fornecer animais controlados do ponto de vista genético e sanitário, resolvemos investigar se algum destes patógenos murinos, estaria sendo transmitido junto com o parasita e se algumas características da Doença de Chagas experimental estariam sendo alteradas por este(s) contaminante(s).

MAP testes realizados com soro de animais infectados com *Trypanosoma cruzi* indicaram a presença de coronavírus em estoques do parasita mantidos exclusivamente por passagem de animal para animal. Estoques previamente mantidos em meios de cultura de células ou em meios axênicos não indicaram a presença de contaminantes.

Os resultados obtidos mostraram que camundongos infectados com o estoque contaminado apresentavam níveis de parasitemia e taxa de mortalidade mais elevados que os animais infectados os estoques não contaminados. Além disso, o plasma filtrado de animais infectados com o estoque contaminado foi capaz de elevar os níveis de parasitemia e de mortalidade de animais infectados com os estoques não contaminados. O fator, presente no plasma dos animais infectados com o estoque contaminado era sem dúvida um vírus, denominado vírus X, uma vez que podia ser seriadamente transferido de animal para animal, era completamente inativado quando aquecido a 56^o C por 45 minutos e tinha sua virulência aumentada provocando a morte de animais de quatro semanas de idade após a transferência seriada. Anticorpos anti-X, preparados com a décima passagem seriada do vírus, ou anticorpos anti-MHV3 (Murine Virus Hepatitis-3) foram capazes de proteger os animais jovens da morte, quando estes eram desafiados com o vírus X, e de diminuir a parasitemia quando os animais eram infectados com o estoque contaminado. Estes dados indicavam que cepas de *Trypanosoma cruzi*, mantidas apenas por transferência de animal para animal, poderiam estar contaminadas com um vírus capaz de aumentar a patogenicidade do parasita ou de alterar a resposta imune do hospedeiro.

Animais infectados com o estoque contaminado ou com o vírus isolado, apresentaram uma marcada linfopenia, no segundo dia após a infecção, enquanto que nenhuma alteração foi observada nos animais infectados com os outros estoques do parasita. Experimentos de neutralização, utilizando anticorpos anti-X, mostraram que esta linfopenia podia ser completamente abolida. Alterações do peso e da celularidade de diferentes órgãos linfóides também foram observadas, sendo evidenciada perda da arquitetura tímica e alterações no processo de maturação de células da medula óssea quando os animais eram infectados com o estoque de parasitas contaminado ou com o vírus isolado. As populações de células, apresentando marcadores específicos para linfócitos B e T, mostraram alterações em diferentes tecidos linfóides. Observou-se uma profunda queda na porcentagem de células T e B, quando os animais eram infectados com o vírus isolado ou com o estoque do parasita contendo este contaminante.

Estes resultados confirmam e estendem, também para a Doença de Chagas experimental, os dados obtidos na literatura de que este vírus é capaz de alterar as respostas do hospedeiro, através da imunomodulação, e indicam que alguns dados obtidos com a infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi* devem ser interpretados com cautela.

NOTA FINAL

No Brasil o surgimento de um centro especializado na criação de animais SPF teve início na década de 70, quando o então Reitor da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), Prof. Dr. Zeferino Vaz, anteviu a necessidade da criação de um Biotério Central que atendesse a toda comunidade científica da Universidade. Muito embora não possuísse recursos suficientes para a completa implantação de um Centro especializado na criação de animais SPF, a Unicamp edificou um prédio, a partir de um ante-projeto elaborado pelo Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia, para a criação de animais controlados do ponto de vista sanitário e ambiental. Arquitetonicamente construído para abrigar animais SPF, mas sem dispor ainda dos equipamentos necessários para a criação destes animais, o Biotério Central inaugurado em 1980, passou a criar e a fornecer aos seus usuários animais isogênicos, ainda que mantidos de maneira convencional.

Por volta de 1984 instituições governamentais, tais como a Fundação de Amparo à Pesquisa no Estado de São Paulo (FAPESP) e a Financiadora de Estudos e Projetos (FINEP), preocupadas com a qualidade dos animais utilizados na pesquisa, após um rastreamento detalhado das necessidades do país criaram programas visando a melhoria da qualidade dos animais de laboratório. Um programa especial da FAPESP permitiu levar a cabo um projeto - o projeto CEMIB (Centro Multi-Institucional de Bioterismo) - integrado pela UNICAMP, pela Universidade de São Paulo (USP) e pela Escola Paulista de Medicina (EPM). Este projeto, avaliado periodicamente por consultores nacionais e estrangeiros¹, permitiu equipar o Biotério Central da Unicamp, viabilizando a produção de animais SPF e permitindo sua transformação, em 1989, no Centro Multi-Institucional de Bioterismo - CEMIB/UNICAMP (Carvalho da Silva, 1994).

Um programa de treinamento de pessoal que contou com o apoio do Conselho Nacional para o Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), no Brasil, e o Kernforschungsanlage (KFA), na Alemanha, permitiu a formação de especialistas nas diferentes áreas de controle genético, sanitário e criopreservação, necessários ao desenvolvimento do Centro.

Com a consolidação do CEMIB-UNICAMP e conseqüente melhoria dos animais experimentais, um esforço se fez necessário no próprio Departamento de Microbiologia e Imunologia (DMI) que precisava agora se modernizar para que a qualidade dos animais fosse mantida durante todo o período experimental. Aproveitando a tecnologia e a experiência do CEMIB-UNICAMP foi possível a instalação, no DMI, de uma área equipada com unidades isoladoras onde os animais são mantidos durante todo o período experimental.

Assim, desde 1991 temos recebido e mantido animais experimentais de alta qualidade, o que nos permite estudar a resposta imune com maior segurança nos resultados obtidos.

¹Dr. Edwin Les do Jackson Laboratories/E.U.A.; Dr. Silvio Thales Torres da Universidade Federal Fluminense/Br.; Dr. Jean Louis Guénét do Instituto Pasteur de Paris/Fr.; Dr. Michael Festing do Medical Council Research/U.K.; Dr. Hans Hedrich e Dr. Volker Kraft do Zentralinstitut für Versuchstierkd/Hannover/AL.; Dr. Enio Cardoni Vieira da Universidade Federal de Minas Gerais/Br..

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAHAMSOHN, I.A. & COFFMAN, R.L. 1995. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** **155**: 3955-3963.
- AKERSTROM, B.; BRODIN, T.; REIS, K. & BJORCK, L. 1985. Protein G: a powerful tool for binding and detection of monoclonal and polyclonal antibodies. **J. Immunol.** **135**: 2589-2592.
- ANDRADE, Z.A. 1991. Pathogenesis of Chagas disease. **Res. Immunol.** **142**: 126-129.
- ANDRADE, V.; BARRAL-NETO, M. & ANDRADE, S.G. 1985. Patterns of resistance of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* are determined by parasite strain. **Braz. J. Med. Res.** **18**: 499-506.
- ARAÚJO, F. 1989. Development of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes. **Infect. Immun.** **57**: 2246-2248.
- ARAÚJO, F. 1985. *Trypanosoma cruzi*: expression of antigens on the membrane surface of parasitized cells. **J. Immunol.** **135**: 4149-4154.
- ASSOKU, R.K. & TIZARD, I.R. 1978. Mitogenicity of autolysates of *Trypanosoma congolense*. **Experimentia.** **34**: 127-129.
- BARTHOLD, S.W. 1986. Research complications and state of knowledge of rodent coronaviruses. In **Complication of viral and mycoplasmal infections in rodents to toxicology research and testing**. T.E. Hamm ed, Hemisphere Publishing Corporation, Washington, DC. P: 53-89.
- BARTHOLD, S.W. and SMITH, A.L. 1984. Mouse hepatitis virus strain-related patterns of tissue tropism in suckling mice. **Archives of Virol.** **81**:103-112.
- BELTZ, L.A.; SZTEIN, M.B. & KIERSZENBAUM, F. 1988. Novel mechanism for *Trypanosoma cruzi* - induced suppression of human lymphocytes. Inhibition of IL-2 Receptor expression. **J. Immunol.** **141**: 289-294.
- BELTZ, L.A. ; SONNENFELD, G. & KIERSZENBAUM, F. 1989. Inhibition by *Trypanosoma cruzi* of interferon-gamma production by mitogen-stimulated mouse spleen cells. **Int. J. Parasitol.** **19**: 555-559.
- BEN YOUNES-CHENNOUFI, A.; SAID, G.; EISEN, H.; DURAND, A. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. 1988. Cellular immunity to *Trypanosoma cruzi* is mediated by helper T cells. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** **82**: 84-89.
- BOND, C.W.; LEIBOWITZ, J.L. & ROBB, J.A. 1979. Pathogenic murine coronaviruses. II. Characterization of virus-specific proteins of murine coronaviruses JHMV and A59V. **Virology.** **94**: 371-384.
- BONGERTZ, V. & DVORAK, J.A. 1983. *Trypanosoma cruzi*: antigenic analysis of cloned stocks. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **32**: 716-722.
- BORGES, M.M.; ANDRADE, S.G.; PILATTI, C.G.; PRADO, J.C. & KLOETZEL, J.K. 1992. Macrophage activation and histopathological findings in *Calomys callosus* and swiss mice infected with several strains of *Trypanosoma cruzi*. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **87**(4): 493-502.

- BRENER, Z. 1965. Comparative studies of different strains of *Trypanosoma cruzi*. **Ann. Trop. Parasitol.** **59**: 19-26.
- BRENER, Z. 1977. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct features. **Pan Am. Health Organization, Scientific Publication.** **347**:11-21.
- BRENER, Z. & CHIARI, E. 1963. Variações morfológicas observadas em diferentes amostras de *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo** **5**: 220-244.
- BRENER, Z.. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv. Parasitol.**, **18**:247-291.
- BURKE, J.D.; WEYMOUTH, R. & SEIBEL, H.R. 1972. Histological methods. In: **Essentials of Histology.** N. York: **Barron's Educational Series**: 5-7.
- CALABRESE, K.S.; P.G. BAUER; P.H. LAGRANGE & S.C. GONÇALVES DA COSTA. 1991. *Trypanosoma cruzi* infection in immunosuppressed mice. **Immunol. Letters**, **31**: 91-96.
- CAMARGO, I.J.B.; SAKURADA, J.K.; ZUCATO, M.R.; ARAÚJO, P.M.F. & RANGEL, H.A. 1989. The early phase of the immune response of CBA mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunol. Letters.** **20**: 213-216.
- CAMARGO, I.J.B.; SAKURADA, J.K.; ARAÚJO, P.M.F.; STACH-MACHADO, D.R. & RANGEL, H.A. 1991. *Trypanosoma cruzi* : Early resistance induced by culture-derived trypomastigotes. **Exp. Parasitol.** **73**: 260-268.
- CANTOR, H. & BOYSE, E.A. 1975. Functional subclasses of T lymphocytes bearing different Ly antigens. I. The generation of functionally distinct T cell subclasses is a differentiative process independent of antigen. **J. Exp. Med.** **141**: 1376-1381.
- CARBONE, F.R. & BEVAN, M.J. 1990. Class I restricted processing and presentation of exogenous cell-associated antigen *in vivo*. **J. Exp. Med.** **171**: 377-387.
- CARDOSO, J.E. & BRENER, Z. 1980. Hematological changes in mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi* . **Memórias do Inst. Oswaldo Cruz.** **75**: 97-104.
- CARVALHO DA SILVA, A. 1994. Fapesp 30 anos. Ed. **Universidade de São Paulo**: 100-108.
- CASEBOLDT, D. B.; SPALDING, D.M.; SHOEB, T.R. & LINDSEY, J.R. 1987. Suppression of immune response induction in Peyer's patch lymphoid cells from mice infected with mouse hepatitis virus. **Cell. Immunol.** **109**: 97-101.
- CELENTANO, A.M. & GONZÁLES CAPPÁ, S.M. 1992. Induction of macrophage activation and opsonizing antibodies by *Trypanosoma cruzi* subpopulations. **Paras. Immunol.** **14**: 155-167.
- CERRONE, M. & KUHN, R.1991. Macrophage regulation of immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **Cell. Immunol.** **138**: 423-436.
- CERRONE, M.; RITTER, D. & KUHN, R. 1992. Effect of antigen-specific T helper cells or interleukin 2 on suppressive ability of macrophage subsets detected in spleens of *Trypanosoma cruzi*-infected mice as determined by limiting dilution partition analysis. **Infect. Immun.** **60**: 1489-1498.

- CHAGAS, C. 1909. Nova tripanozomíaze humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi* n.gen., n.sp., agente etiológico de nova entidade morbida do homem. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** 1: 159-218.
- CLAYTON, C.E.; SELKIRK, M.E.; CORSINI, A.C.; OGILVIE, B.M. & ASKONAS, B.A. 1980. Murine trypanosomiasis: Cellular proliferation and functional depletion in the blood, peritoneum, and spleen related to changes in bone marrow stem cells. **Infect. Immun.** 28: 824-831.
- CLAYTON, C.E.; SACKS, D.L.; OLGIVIE, B.M. & ASKONAS, B.A.. 1979. Membrane fractions of trypanosomes mimic the immunosuppressive and mitogenic effects of living parasites on the host. **Parasite Immunol.** 1: 241-249.
- 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: 187-207.
- CORSINI, A.C.; M.G. COSTA; O.L.P. OLIVEIRA; I.J.B. CAMARGO & A. STELINI JR. 1980. A susceptibility of inbred mice to *Trypanosoma cruzi* strain Y. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, 22: 192-196.
- CULBERTSON, J.T. & KOLODNY, M.H. 1938. Acquired immunity in rats against *Trypanosoma cruzi*. **J. Parasitol.** 24: 83-90.
- CUNNINGHAM, D.S. & KHUN, R.E. 1980. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of the primary immune response in murine cell cultures to T-cell-dependent and -independent antigens. **J. Parasitol.** 66: 16-27.
- DARDENNE, M. ; SAVINO, W.; GASTINEL, L.N. & BACH, J.F. 1983. Thymic dysfunction in the mutant diabetic (db/db) mouse. **J. Immunol.** 130: 1195-1199.
- DARDENNE, M.; BOUKAIBA, N.; GAGNERAULT, M.C.; HOMO-DELARCHE, F.; CHAPPUIS, P.; LEMMONIER, D. & SAVINO, W. 1993. Restoration of the thymus in aging mice upon *in vivo* zinc supplementation. **Clin. Immunol. Immunopathol.** 66: 135-137.
- DAVIS, C.E.; R.S. ROBBINS; R.D. WELLER & A.J. BRANDE. 1974. Thrombocytopenia in experimental trypanosomiasis. **J. Clin. Invest.** 53: 1359-1367.
- DECKHUT, A.M.; ALLAN, W.; McMICKLE, A.; EICHELBERGER, M.; BLACKMAN, M.A.; DOHERTY, P.C. & WOODLAND, W.D. 1993. Prominent usage of V β 8.3 T cells in the H-2D^b - restricted response to an influenza A virus nucleoprotein epitope. **J. Immunol.** 151: 2658-2666.
- De MAYER, E. & De MAYER-GUINARD, J. 1992. Interferon γ . **Curr. Opinion Immunol.** 4: 321-326.
- DILLEHAY, D.L.; LEHNER, N.D.M. & HUERKAMP, M.J. 1990. The effectiveness of a microisolator cage system and sentinel mice for controlling and detecting MHV and Sendai virus infections. **Lab. Anim. Sci.** 40: 367-370.
- DILLBERGER, J.E.; P. MONROY & N.H. ALTMAN. 1987. The effects of three bleeding techniques on lactic dehydrogenase levels in mice: implications for lactic dehydrogenase virus bioassay. **Lab. Anim. Sci.** 37: 356-359.
- DOUROV, N. 1986. Thymic atrophy and immune deficiency in malnutrition. In **The human thymus. Histophysiology and Pathology**. H.k. Muller- Hermelink ed., Springer-Verlag, Berlim. p127-150.

- DOYLE, P.S.; DVORAK, J.A. & ENGEL, J.C. 1984. *Trypanosoma cruzi*: quantification and analysis of the infectivity of cloned stocks. **J. Protozool.** **2**: 280-283.
- DUFFEY, L.M.; J.W. ALBRIGHT & J.F. ALBRIGHT. 1985. *Trypanosoma musculi*: Population dynamics of erythrocytes and leukocytes during the course of murine infection. **Exp. Parasitol.** **59**: 375-389.
- FALLON, M.T.; BENJAMIN, W.H. JR.; SCHOEB, T.R. & BRILES, D.E. 1991. Mouse hepatitis virus strain UAB infection enhances resistance to *Salmonella typhimurium* in mice by inducing suppression of bacterial growth. **Infection and Immunity.** **59**: 852-856.
- FIRESTEIN, G.S.; ROEDER, W.D.; LAXER, J.A.; TOWNSEND, K.S.; WEAVER, C.T.; HOM, J.T.; LINTON, J.; TORBETT, B.E. & GLASEBROOK, A.L. 1989. A new murine CD4⁺ T cell subset with unrestricted cytokine profile. **J. Immunol.** **143**: 518-525.
- FREEMAN, R.R. & PARISH, C.R. 1978. Polyclonal B-cell activation during rodent malaria infections. **Clin. Exp. Immunol.** **32**: 41-45.
- FUCS, R. & BARCINSKI, M. A. 1987. Effects of hydroxyurea on the concanavalin-A proliferative response of *Trypanosoma cruzi* infected mice. **Immunol. Lett.** **15**: 317-324.
- FUJIOKA, N.; K. FUJIWARA; K. YAMANOUCHI & M. HAYAMI. 1985. Histopathology and hematology of acute infection with mouse hepatitis virus, MHV-3, in mice with different susceptibility. **Jpn. J. Vet. Sci.** **47**: 761-768.
- FUJIWARA, K. 1988. Persistent mouse hepatitis virus infection in nude mice. **Jpn J. Exp. Med.** **58**: 115-121.
- FUJIWARA, K. & WAGNER, J.E. 1994. Mouse Hepatitis Virus. in **Manual of Microbiologic Monitoring of Laboratory Animals**. Nomura, T; Waggie, H.; Kagiya, N & Allen, A. Ed. 2^a Ed.
- GONÇALVES COSTA, S.C.; CALABRESE, K.S.; BAUER, P.G.; SAVINO, W. & LAGRANGE, P.H. 1991. Studies on the thymus in Chagas disease. III. Colonization of the thymus and other lymphoid organs from adult and newborn mice by *Trypanosoma cruzi*. **Pathol. Biol.** **39**:91-97.
- HAKIM, F. ; GAZZINELLI, R.T.; DENKERS, E.; HIENY, S. SHEARER, G.M. & SHER, A. 1991. CD8⁺ T cells from mice vaccinated against *Toxoplasma gondii* are cytotoxic for parasite-infected or antigen-pulsed host cells. **J. Immunol.** **147**: 2310-2316.
- HAYES, M. & KIERSZENBAUM, F. 1981. Experimental Chagas' disease: Kinetics of lymphocyte responses and immunological control of the transition from acute to chronic *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. and Immunity.** **31**: 117-124.
- HEINSEL, F.P.; SHOENHAUT, D.S.; RERKO, R.M.; ROSSER, L.E. & GATELY, M.K. 1993. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **J. Exp. Med.** **177**: 1505-1509.
- HIROKAWA, K.; EISHI, Y.; ALBRIGHT, J.W. & ALBRIGHT, J.F. 1981. Histopathological and immunocytochemical studies of *Trypanosoma musculi* infection in mice. **Infect. Immun.** **34**: 1008-1017.
- HOFT, D.F.; LYNCH, R.G. & KIRCHHOF, L.V. 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune response in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **151**: 7038-7047.

- HONTEBEYRE-JOSKOWICZ, M.; SAID, G.; MILLON, G.; MARCHAL, G. & EISEN, H. 1987. L3T4⁺ cells able to mediate parasite-specific delayed-type hypersensitivity play a role in the pathology of experimental Chagas' disease. **Eur. J. Immunol.** **17**: 1027-1033.
- HSIEH, C.S.; MACATONIA, S.E.; TRIPP, C.S.; WOLF, S.F. O'GARRA, A. & MURPHY, K.M. 1993. Development of Th1 CD4⁺ T cells through IL 12 produced by *Listeria*-induced macrophages. **Science**. **260**: 547-549.
- HULSEBOS, L.H.; CHOROMANSKI, L. & KUHN, R.E. 1989. The effect of interleukin 2 on parasitemia and myocarditis in experimental Chagas' disease. **J. Protozool.** **36**: 293-298.
- HUS, S. M.; RAINE, L.; FANGER, H. 1981. A comparative study of the peroxidase antiperoxidase method and avidin-biotin complex method for studying polypeptide hormones with radioimmunoassay antibodies. **Am. J. Clin. Pathol.** **75**: 734-738.
- INCHLEY, C.J. 1987. The contribution of B-cell proliferation to spleen enlargement in *Babesia microti*-infected mice. **Immunology**. **60**: 57-61.
- JAMES, S.L.; KIPNIS, T.L.; SHER, A. & HOFF, R. 1982. Enhanced resistance to acute infection with *Trypanosoma cruzi* in mice treated with an interferon inducer. **Infect. Immun.** **35**: 588-593.
- JOLICOUER, P. AND LAMONTAGNE, L. 1989. Mouse hepatitis virus 3 pathogenicity expressed by a lytic viral infection in bone marrow 14.8+ μ + B lymphocyte subpopulation. **J. Immunol.** **143**: 3722-3730.
- JOLICOUER, P. AND LAMONTAGNE, L. 1994. Impaired T and B cell subpopulations involved in a chronic disease induced by Mouse Hepatitis virus type 3. **J. Immunol.** **153**: 1318-1327.
- KATAMI, K.; TAGUCHI, F.; NAKAYAMA, M.; GOTO, N. & FUJIWARA, K. 1978. Vertical transmission of mouse hepatitis virus infection in mice. **Jpn. J. Exp. Med.** , **48**: 481-490.
- KIERSZENBAUM F. & FERRARESI, R.W. 1979. Enhancement of host resistance against *Trypanosoma cruzi* infection by immunoregulatory agent Muramyl Dipeptide. **Infect. Immun.** **25**: 273-278.
- KIERSZENBAUM, F.; KNECHT, E.; BUDZKO, D.B. & PIZZIMENTI, M. 1974. Phagocytosis: a defensive mechanism against infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **112**: 1839-1843.
- 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. **Immunology**. **44**: 641-648.
- KIERSZENBAUM, F. 1982. Immunologic deficiency during experimental Chagas' disease: role of adherent, non-specific esterase positive splenic cells. **J. Immunol.** **129**: 2202-2205.
- 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.; LOPEZ, H.M. & SZTEIN, M.B. 1994. Inhibition of *Trypanosoma cruzi* - specific immune response by a protein produced by *T. cruzi* in the course of Chagas' disease. **Immunol.** **81**: 462-467.

- KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKI, P.. 1979. Thymus-dependent control of host defence mechanisms against *Trypanosoma cruzi* . **Infect. Immun.** **24**: 117- 123.
- KIERSZENBAUM, F.; MORETTI, E. & SZTEIN, M. 1991. *Trypanosoma cruzi* induces suppression of DNA syntesis and inhibits expression of interleukin 2 receptors by stimulated human B lymphocytes. **Immunol.** **74**: 317-322.
- KIERSZENBAUM, F.; LOPEZ, M. & SZTEIN, M.B. 1993. Does interleukin 2 restore lymphocyte responses suppressed by *Trypanosoma cruzi* . **Immunology.** **80**: 445-450.
- KING, C.C.; JAMIESON, B.D.; REDDY, K.; BALI, N.; CONCEPTION, R.J. & AHMED, R. 1992. Viral infection of thymus. **J. Virol.** **66**: 3155-3160.
- KNOBLER, R.L. & OLDSTONE, M.B.A. 1987. Infection and involution of mouse thymus by MHV4. **Adv. Exp. Med. Biol.** **218**:451-455.
- KRAFT, V. & MEYER, B. 1986. Diagnosis of murine infections in relation to test methods employed. **Lab. Ani. Sci.** **36**: 272-276.
- KRAFT, V. & MEYER, B. 1990. Seromonitoring in small laboratory colonies. A five year survey: 1984-1988. **Z. Versuchstierkd.** **33**: 29-35.
- KRETTLI, A.U. & BRENER, Z.. 1982. Resistance against *Trypanosoma cruzi* associated to anti living trypomastogote antibodies. **J. Immunol.** **128**: 2009-2012.
- KRETTLI, A.U.; WEIZ-CARRINGTON, P. & NUSSENZWEIG, R.S. 1979. Membrane-bound antibodies to blood-stream *Trypanosoma cruzi* in mice: Strain differnces in susceptibility to complement-mediated lysis. **Clin. Exp. Immunol.** **37**: 416-423.
- KUMAR, S.; MILLER, L.H.; QUAKYI, I.A.; KREISTER, D.B.; HOUGHTEN, R.A.; MALOY, W.L.; MOSS, B.; BERZOFSKY, J.A. & GOOD, M.F. 1988. Cytotoxic T cell specific for the circumsporozoite protein of *Plasmodium falciparum*. **Nature.** **334**: 258-262.
- LAFAILLE, M.A.C.; OLIVEIRA, L.C.B.; LIMA, G.C.A. & ABRAHAMSOHN, I. 1990. *Trypanosoma cruzi*: Maintenanceof Parasite-Specific T cell responses in Lymph nodes during the acute phase of the infection. **Exp. Parasitol.** **70**: 164-174.
- LAGES-SILVA, E.; RAMIREZ, L.E.; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1987. Effect of protective and non-protective antibodies in the phagocytosis rate of *Trypanosoma cruzi* blood forms by mouse peritoneal macrophages. **Parasite Immunol.** **9**: 21-30.
- LALONDE, R.; ALI-KHAN, Z. & TANOWITZ, H. 1985. *Trypanosoma cruzi*: Regulation of mitogenic responses during infection in genetically resistant and susceptible strains of mice. **Exp. Parasitol.** **59**: 33-43.
- LAMONTAGNE, L. & JOLICOEUR, P. 1991. Mouse hepatitis virus 3 thymic cell interactions correlating with viral pathogenicity. **J. Immunol.** **146**:3152.-3159.
- Le PREVOST, C.; VIRELIZIER, J.L. & DUPUY, J.M.. 1975. Immunopathology of mouse hepatitis virus type 3 infection. III. Clinical and virologic observation of a persistent infection. **J. Immunol.** **115**:640-643.

- LIMA, M.T.; JANSEN, A.M.; RONDINELLI, E. & GATTASS, C.R. 1990. *Trypanosoma cruzi*: properties of a clone isolated from CL strain. **Parasitol. Res.** 77: 77-81.
- LIMA-MARTINS, M.V.C.; SANCHEZ, G.A.; KRETTLI, A.U. & BRENER, Z. 1985. Antibody-dependent cell cytotoxicity against *Trypanosoma cruzi* is only mediated by protective antibodies. **Parasite Immunol.** 7: 367-376.
- LOHOFF, M.; MATZNER, C. & ROLLINGHOF, M. 1988. Polyclonal B-cell stimulation by L3T4+ T cells in experimental leishmaniasis. **Infect. Immun.** 56: 2120-2124.
- LOPEZ, M.C.; COLOMBO, L.L.; HUANG, D.S. & WATSON, R.R. 1992. Alteration of thymic cell subsets by cocaine administration and murine retrovirus infection in protein undernourished mice. **Thymus.** 20: 171-181.
- LUSSIER, G. & J.P. DECOTEAUX. 1986. Prevalence of natural viral infections in laboratory mice and rats used in Canada. **Lab. Anim. Sci.** 36:145- 147.
- MACKANESS, G.B. 1969. The influence of immunologically committed lymphoid cells on macrophage activity *in vivo*. **J. Exp. Med.** 129: 973-978.
- MANSFIELD, J.M.; CRAIG, S.A. & STELZER, G.T. 1976. Lymphocyte function in experimental African trypanosomiasis: Mitogenic effects of trypanosome extracts *in vitro*. **Infect. Immun.** 14: 1976-1981.
- MARCONDES, M.C.G.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N.; STAROBINAS, N. & RUSSO, M. 1991. Experimental infection by the CL strain of *T. cruzi*: lethality and bone marrow activity. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 86: 219.
- MARCONDES, M.C.G.; BORELLI, P.; YOSHIDA, N. & RUSSO, M. 1991. Experimental infection by G and Tulahuen strains of *T. cruzi*: bone marrow and blood cellularity macrophage activation and antibody production. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** Vol. 86: 220.
- MARSDEN, P.D.; SEAH, S.K.; MOTT, K.E.; PRATA, A. & PLATT, H. 1970. Immunoglobulins in Chagas disease. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** 73: 157-161.
- McCHESNEY, M.B. & M.B.A. OLDSTONE. 1987. Viruses perturb lymphocyte function: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression. **Annu. Rev. Immunol.** 5: 279-304.
- McCHESNEY, M.B. & OLDSTONE, M.B.A. 1989. Virus-induced immunosuppression: Infections with measles virus and human immunodeficiency virus. **Adv. Immunol.** 45: 335-380.
- McKINNEY, M. M. & PARKINSON, A. 1987. A simple, non-chromatographic procedure to purify immunoglobulins from serum and ascites fluids. **J. Immunol. Methods.** 96: 271-278.
- MELBY Jr, E.C. & BALK, M.W. 1983. **The importance of Animal Genetics, Health and Environment in Biomedical Research.** Academic Press, INC.
- MELO, R.G. & BRENER, Z. 1978. Tissues tropism of different *T. cruzi* strain. **J. Parasitol.** 64: 475-482.
- MILON, G. & LOUIS, J. 1993. CD8+ T cells and immunity to intracellular pathogens. **Parasitol. Today.** 9: 196-197.
- MIMS, C. 1986. Interaction of virus with the immune system. **Clin. Exp. Immunol.** 66: 1-16.

- MIMS, C. 1986. Virus-related immunomodulation. *In Viral and Mycoplasmal infections of laboratory rodents*. Chapter 28.
- MINÓPRIO, P.; EISEN, H.; HONTEBEYRE-JOSKOWICZ, M.; PEREIRA, P. & COUTINHO, A. 1987. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi*-infected mice by treatment with anti L3T4 antibodies. **J. Immunol.** **139**: 545-550.
- MINÓPRIO, P.; BURLIN, O.; PEREIRA, P.; GUILBERT, B.; ANDRADE, L.; HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* infection lack parasite specificity. **Scand. J. Immunol.** **28**: 553-558.
- MINÓPRIO, P.M.; EISEN, H.; FORNI, L.; D'IMPÉRIO-LIMA, M.R.; JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. 1986. Polyclonal lymphocyte responses to murine *Trypanosoma cruzi* infection: Quantitation of both T and B cell responses. **Scand. J. Immunol.** **24**: 661-668.
- MINÓPRIO, P.M.. 1991. Chagas disease, CD5 B cell dependent Th2 pathology?. **Res. Immunol.** **142**: 137-140.
- MOSIER, D.E. 1994. Consequences of secondary or co-infections for immunity. **Curr. Op. Immunol.** **6**: 539-544.
- 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 profile of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.** **136**: 2348-2357.
- MOSMANN, T.R. & COFFMAN, R.L. 1989. Th1 and Th2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. **Ann. Rev. Immunol.** **7**: 145-173.
- MULLER, L.A.; AÑASCO, N. & GONZÁLES CAPPA, S.M. 1986. *Trypanosoma cruzi*: isolate dependence in the induction of lytic antibodies in the mouse and rabbit. **Exp. Parasitol.** **61**: 284-293.
- NABHOLZ, m. & MacDONALD, H.R. 1983. Cytolytic T lymphocytes. **Ann. Rev. Immunol.** **1**: 273-306.
- NICKELL, S.P.; GEBREMICHAEL, A.; HOFF, R. & BOYER, M.H. 1987. Isolation and functional characterization of T cell lines and clones specific for the protozoan parasite *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **138**: 161-166.
- NICKELL, S.P.; STRYKER, G.A. & AREVALDO, C. 1993. Isolation from *Trypanosoma cruzi* mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.** **150**: 1446-1457.
- NOGUEIRA, N.; ELLIS, J.; CHAPLAN, S. & COHN, Z. 1981. *Trypanosoma cruzi*: in vivo and in vitro correlation between T-cell activation and susceptibility in inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** **51**: 325-330.
- O'DALY, J.A.; SIMONIS, S.; ROLO, N. & CABALLERO, H. 1984. Suppression of humoral immunity and lymphocyte responsiveness during experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **Rev. Inst. Med. Trop. S. Paulo.** **26**: 67-77.
- OLDSTONE, M.B.A. 1987. Molecular mimicry and autoimmune disease. **Cell.** **50**: 819-820.

- PARKER, J.C. & C.B. RICHTER. 1982. Viral diseases in the respiratory system . In **The mouse in biomedical research** (Foster, H.L.; J.D. Small & J.G. Fox, eds). New York, Academic Press, v.II:109-158.
- PFEFFERKORN, E.R. & GUYRE, P.M. 1983. Recombinant human gamma interferon blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in cultered human fibroblasts. **Federation Proceedings**. **42**: 964-967.
- PHILLIPS, N.R. 1960. Experimental studies on the quantitative transmission of *Trypanosoma cruzi* : Considerations regarding the standardization of materials. **Ann. Trop. Med. Parasitol.** **54**: 60-66.
- PIAZZA, M.; PICCININO, F. & MATANO, P. 1965. Haematological changes in viral (MHV-3) murine hepatitis. **Nature**. **205**: 1034-1035.
- PIFANO, F.C.; ANSELMINI, A.; ALEMAN, C.; SUAREZ, J.A. & VASQUEZ, A.D. 1962. Miocardiopatía chagásica experimental. Valoración del método de investigación experimental para el estudio de las propiedades fundamentales del corazón del perro con infección chagásica aguda y crónica. **Arch. Venezol. Med. Trop. Parasitol. Med.** **4**: 37-62.
- PLATA, F.; WIETZERBIN, J.; GARCIA-PONS, F.; 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.
- PLATA, F.; GARCIA-PONS, F. & WIETZERBIN, J. 1987. Immune resistance to *Trypanosoma cruzi*: synergy of specific antibodies and recombinant interferon gamma in vivo. **Ann. Inst. Pasteur.** **138**: 397-415.
- POSTAN, M.; DVORAK, J.A. & MacDANIEL, P.J. 1983. Studies of *Trypanosoma cruzi* clones in inbred mice: I. A comparison of the course of infection of C3H/HEN mice with two clones isolated from a common source. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** **32**: 497-506.
- PRICE, P.; OLIVER, S.D.; GIBBONS, A.E.; TEO, H.K. & SHELLAM, G.R. 1993. Characterization of thymic involution induced by murine cytomegalovirus infection. **Immunol. Cell Biology**. **71**: 155-165.
- REED, L.J. AND MUENCH, H. 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. **American Journal of Hygiene**. **27**: 493-497.
- REED, S.G. 1980. Adoptive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T lymphocyte-enriched spleen cells. **Infect. Immun.** **28**: 404-409.
- REED, S.G.; BROWNELL, C.E.; RUSSO, D.M.; SILVA, J.S.; GRABSTEIN, K.H. & MORRISSEY, P.J. 1994. IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** **153**: 3135-3140.
- REED, S.G.; INVERSO, J.A. & ROTERS, S.B. 1984. Suppressed antibody responses to sheep erythrocytes in mice with chronic *Trypanosoma cruzi* infections are restored with interleukin 2. **J. Immunol.** **133**: 3333-3337.
- REPKA, D. ; RANGEL, H.A.; ATTA, A.M.; GAVINO, V.A. & PEDRABUENA, A.E. 1985. Experimental Chagas'disease in mice infected with one LD_{50%} of parasite. **Rev. Bras. de Biologia**. **45**,301-316.
- ROBERSON, E.L.; HANSON, W.L.; CHAPMAN, W.L. 1973. *Trypanosoma cruzi*: effects of anti thymocyte serum in mice and neonatal thymectomy in rats. **Exp. Parasitol.** **34**: 168-180.
- ROBERTS, D.W. & WEIDANZ, W.P. 1978. Splenomegaly, enhanced phagocytosis, and anemia are thymus-dependent responses to malaria. **Infect. Immun.** **20**: 782-731.

- RODRIGUES, A.; SANTORO, F.; AFCHAIN, H. & CAPRON, A. 1981. *Trypanosoma cruzi* infection in B cell deficient rats. **Infect. Immun.** **31**: 524-528.
- ROTTENBERG, M.E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H. & ORN, A. 1993. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.** **61**: 5129-5133.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.S.; MINÓPRIO, P.; COUTINHO, A. & JOSKOWICZ, M. 1988. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi*-infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pasteur/Immunol.** **139**: 225-236.
- RUSSO, M.; STAROBINAS, N.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; MINÓPRIO, P. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. 1989. Susceptible mice present higher macrophage activation than resistant mice during infections with myotropic strains of *Trypanosoma cruzi*. **Paras. Immunol.** **11**: 385-392.
- SATO, M.N.; YAMASHIROKANASHIRO, E.H.; TANJI, M.M.; KANENO, R.; HIGUCHI, M.L. & DUARTE, A.J.S. 1992. CD8+ cells and natural cytotoxic activity among spleen, blood, and heart lymphocytes during the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infections in rats. **Infect. Immun.** **60**: 1024-1030.
- SAVINO, W., M.C. LEITE DE MORAES; M.H. JOSKOWICZ & M. DARDENNE. 1989. Studies on the thymus in Chagas'disease I. Changes in the thymic microenvironment in mice acutely infected with *Trypanosoma cruzi*. **Eur. Immunol.**, **19**: 1727-1733.
- SAVINO, W.; DARDENNE, M.; MARCHE, C.; TROPHYLME, D.; DUPUI, J.M. ; PEKOVIC, D. & BACH, J.F. 1986. Thymic epithelium in AIDS: an immunohistologic study. **Am. J. Pathol.** **122**: 302-307.
- SAVINO, W.; LEITE DE BARROS, M.C.; BARBOSA, S.D.S.; CARVALHO DA FONSECA, E.; ALMEIDA, V.C. & HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ. 1992. Is the thymus a target organ in infectious diseases? **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** **87**: 73-78.
- SAVINO, W. 1995. Intrinsic and extrinsic circuits controlling the thymic microenvironment. **Ciencia e Cultura.** **46**: 333-350.
- SCALZO, A.A. & ANDERS, E.M. 1985. Influenza viruses as lymphocyte mitogens: II. Role of I-E molecules in B cell mitogenesis by influenza A viruses of the H2 and H6 subtypes. **J. Immunol.** **135**: 3524-3529.
- SCHUURMAN, H.J.; LOVEREN, H.V.; ROZING, J.; DIJK, A.V. ; LOEBER, J.G. & VOS, J.G.1990. Cyclosporin and the rat thymus. An immunohistochemical study. **Thymus.** **16**: 235-254.
- SEAH, S.K.; MARSDEN, P.D.; VOLLER, A. & PETTIT, L.E. 1974. Experimental *Trypanosoma cruzi* infection in Rhesus monkeys: the acute phase. **Trans. Org. Soc. Trop. Med. Hyg.** **68**: 63-69.
- SELIN, L.K. & WELSH, R.M. 1994. Specificity and editing by apoptosis of virus induced cytotoxic T lymphocytes. **Curr. Op. Immunol.** **6**: 553-559.
- SILVA, J.S.; MORRISON, K.H.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D. & REED, S.G. 1992. Interleukin-10 and Interferon- δ regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** **175**: 169-174.

- SILVA, J.S.; M. BARRAL-NETO & S.G. REED. 1994. Aggravation of both *Trypanosoma cruzi* and murine leukemia virus by concomitant infections. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** , **49**: 589-597.
- SILVA, L.H.P. & NUSSENZWEIG, V. 1953. Sobre uma cepa de *Trypanosoma cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. **Folia Clínica et biológica, São Paulo.** **20**: 191-201.
- SMITH, A.L.; WINOGRAD, D.F. & SOUZA, M.S. 1991. In vitro splenic T cell responses of diverse mouse genotypes after oronasal exposure to mouse hepatitis virus, strain JHM. **Lab. Anim. Sci.** **41**: 106-111.
- SMITH, A.L.; SOUZA, M.S.; FINZI, D. & BARTHOLD, S.W. 1992. Responses of mice to murine coronavirus immunization. **Arch. Virol.** **125**: 39-52.
- SOONG, L. & TARLETON, R. 1992. Selective suppressive effects of *Trypanosoma cruzi* infection on IL-2, c-myc and c-fos gene expression. **J. Immunol.** **149**: 2095-2102.
- SOUZA, M.S.; SMITH, A.L. & BOTTOMLY, K. 1991. Infection of Balb/cByJ mice with the JHM strain of mouse hepatitis virus alters the in vitro splenic T cell proliferation and cytokines production. **Lab. Anim. Sci.** **41**: 99-101.
- TAGUCHI, F.; HIRANO, N.; KIUCHI, Y. & FUJIWARA, K. 1976. Difference in response to mouse hepatitis virus among susceptible mouse strains. **Jpn. J. Microbiol.** **20**: 293-302.
- TAGUCHI, F.; GOTO, Y.; AIUCHI, M.; HAYASHI, T. & FUJIWARA, K. 1979. Pathogenesis of mouse hepatitis virus infection: the role of nasal epithelial cells as a primary target of low virulence virus, MHV-S. **Microbiol. Immunol.** , **23**: 249-262.
- TAKASU, N.; NISHIMURA, T.; KATO, K. & HASHIMOTO, Y. 1990. Increase in CSF in serum and augmentation of CSF responsiveness of lymphoid mononuclear cells by acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Exp. Med.** **160**: 67-73.
- TALIAFERRO, W.H. & PIZZI, T. 1955. Connective tissue reactions in normal and immunized mice to a reticulotropic strain of *Trypanosoma cruzi*. **J. Infec. Dis.** **96**: 199-205.
- TANOWITZ, H.B.; KIRCHHOFF, L.V.; SIMON, D.; MORRIS, S.A.; WEISS, L.M. & TAQUINI, A.C. 1942. El electrograma en la enfermedad de Chagas experimental. **Rev. Arg. Cardiol.** **8**: 115-121.
- TARLETON, R.L. & KUHN, R.E. 1984. Restoration of in vitro immune response of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing interleukin 2. **J. Immunol.** **133**: 1570-1577.
- TARLETON, R. 1988. *Trypanosoma cruzi*-induced suppression of IL2 production. I. Evidence for the presence of IL2-producing cells. **J. Immunol.** **140**: 2763-2768.
- TARLETON, R.L. 1990. Depletion of CD8+ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** **144**: 717-724.
- TARLETON, R.; KOLLER, B.H.; LATOUR, A. & POSTAN, M. 1992. Susceptibility of β_2 microglobulin deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature** **356**: 338-340.
- TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, M.L. & SANTOS-BUCH, C.A. 1975. The immunology of experimental Chagas disease. IV. The production of lesions in rabbits like those of chronic Chagas disease in man. **Am. J. Pathol.** **80**: 163-178.

- TITUS, R.G.; MILO, G.; MARCHAL, G.; VASSALI, P.; CERROTINI, J.C. & LOUIS, J.A. 1987. Involvement of specific Lyt2+ T cells in the immunological control of experimentally induced murine cutaneous leishmaniasis. **J. Immunol.** **137**: 1429-1434.
- TORRECILHAS, A.C.T.; VERAS DA SILVA, A.; SILVA, V.R. & ABRAHAMSOHN, I.A. 1994. MHV infection increases IL 10 production and susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Mem. Inst. Oswaldo cruz.** **89 (I)**: 143.
- TRISCHMANN, T.M.; TANOWITZ, H.; WITTNER, M. & BLOOM, B. 1978. *Trypanosoma cruzi*: role of the immune response in the natural resistance of inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** **45**: 160-168.
- TRISCHMANN, T.M. & BLOOM, B.R. 1980. *Trypanosoma cruzi*: ability of T-cell-depleted and -enriched populations to passively protect mice. **Exp. Parasitol.** **49**: 225-231.
- TRISCHMANN, T.M. 1983. Non-antibody mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. **J. Immunol.** **130**: 1953-1957.
- TRISCHMANN, T.M. 1984. Role of cellular immunity in protection against *Trypanosoma cruzi* in mice. **Paras. Immunol.** **6**: 561-570.
- TRISCHMANN, T.M. 1986. *Trypanosoma cruzi*: Early parasite proliferation and host resistance in inbred strains of mice. **Exp. Parasitol.** **62**: 194-201.
- VANDEKERCKHOVE, F.; DARJI, A.; RIVERA, M.T.; CARLIER, Y.; VRAY, B./ BILLIAU, A. & BAETSELIER, P. 1994. Modulation of T cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection: analysis in different lymphoid compartments. **Paras. Immunol.** **16**: 77-85.
- WANG, A.L. & WANG, C.C. 1991. Viruses of Parasitic Protozoa. **Parasitol. Today.** **7**: 76-80.
- WEISS, W.R.; SEDAGAH, M.; BEAUDOIN, R.L.; MILLER, L.H. & GOOD, M.F. 1988. CD8+ T cells are required for protection in mice immunized with malaria sporozoites. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** **85**: 573-575.
- WELLDE, B.T. ; R.M. KOVATCH; D.A. CHUMO & D.A. WYKOFF. 1978. *Trypanosoma congolense*: thrombocytopenia in experimentally infected cattle. **Exp. Parasitol.** **45**: 26-33.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1991. Control of Chagas' disease. **W.H.O.** **187**: 1.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1977. Report of the first meeting of the scientific working group of Chagas' disease. Buenos Ayres. Argentina. **W.H.O.** **77**: 3.
- WRAITH, D.C.; McDEVITT, H.O.; STEINMAN, L. & ACHA-ORBEA, H. 1989. T cell recognition on the target for immune intervention in autoimmune disease. **Cell.** **57**: 709-715.
- WRIGHTSMAN, R.; KRASSNER, S. & WATSON, J. 1982. Genetic control of responses to *Trypanosoma cruzi* in mice: multiple genes influencing parasitemia and survival. **Infect. Immun.** **36**: 637-644.
- WRIGHTSMAN, R.A. ; KRASSNER, S.M. ; WATSON, J.D. & MANNING, J.E. 1984. Role of the H-2S haplotype in survival of mice after infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** **44**: 351-357.
- ZAR, J.H. 1984. **Biostatistical Analysis**. 2nd ed. Prentice Hall Inc. Englewood cliffs, New Jersey. p: 151-158.

ZINKERNAGEL, R. & DOHERTY, P. 1977. Major transplantation antigens, viruses and specificity of surveillance T cells. **Contemp. Top. Mol. Immunol.** 7: 119-123.