

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
INSTITUTO DE BIOLOGIA  
"CAMPUS" DE CAMPINAS

# INFECÇÃO POR DOIS ESTOQUES DE *Trypanosoma cruzi* EM DIFERENTES LINHAGENS DE CAMUNDONGOS

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

24/02/97

**Rosely Yukiko Nagamatsu**

Orientador: Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo

Tese apresentada para cumprimento parcial das  
exigências para o título de

Mestre em Imunologia

CAMPINAS  
Estado de São Paulo  
1997

UNICAMP  
BIBLIOTECA CENTRAL

97 05728



UNIDADE	BC		
N.º CHAMADA:	UNICAMP		
	N131i		
V.	EX		
TUMBO BC/	30464		
PROC.	281197		
C	<input type="checkbox"/>	D	<input checked="" type="checkbox"/>
PREÇO	11,00		
DATA	23/05/97		
N.º CPD			

CM-00098891-8

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA  
BIBLIOTECA CENTRAL DA UNICAMP

N131i

Nagamatsu, Rosely Yukiko

Infecção por dois estoques de *Trypanosoma cruzi*  
em diferentes linhagens de camundongos / Rosely  
Yukiko Nagamatsu. -- Campinas, SP : [s.n.], 1997.

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

1. *Trypanosoma cruzi*. 2. Camundongo - Genética.  
I. Camargo, Irineu José Barsanti de. II. Universidade  
Estadual de Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.



LOCAL E DATA: Campinas, 24 de Fevereiro de 1997.

BANCA EXAMINADORA:

TITULARES:

Prof. Dr. Irineu José Barsanti de Camargo

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Assinatura

Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Assinatura

Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo

A handwritten signature in black ink, written over a horizontal line.

Assinatura

SUPLENTE:

Profa. Dra. Leonilda Maria Barbosa dos Santos

A horizontal line indicating the position for a signature.

Assinatura



A

gradecimentos

*Agradecimentos ao Prof. Dr. Paulo M.F. Araújo*

*Agradecimentos aos apoios técnicos oferecidos*

*À Ana (lab 5), Christina e Dirce (lab 8), Ismália (sala de isoladores),  
Guilherme (sala de esterilização)*

*“ É preciso correr riscos, dizia ele. Só entendemos o milagre da vida, quando deixamos que o inesperado aconteça.*

*Todos os dias Deus nos dá um momento em que é possível mudar tudo que nos deixa infelizes. Todos os dias procuramos fingir que não percebemos este momento, que hoje é igual a ontem e será igual ao amanhã. Mas quem presta atenção ao seu dia descobre o instante mágico. Ele pode estar escondido na hora em que enfiamos a chave na porta pela manhã, no instante de silêncio logo após o jantar, nas mil e uma coisas que nos parecem iguais. Mas este momento existe - um momento em que toda a força das estrelas passa por nós, e nos permite fazer milagres.*

*A felicidade às vezes é uma benção - mas geralmente é uma conquista. O instante mágico nos ajuda a sair em busca de sonhos. Vamos sofrer, vamos ter momentos difíceis e vamos enfrentar muitas decepções. Mas tudo isto é passageiro, e não deixa marcas.” ( Paulo Coelho)*

*Obrigação pela amizade durante o trampo*

*Ana, Lú, Chris, Dircinha, Prof. Rangel, Edson, Angelinha, Eleni, Guilherme,  
Dori, Chris loira, Ismalinha, Antônio, Guto, Rovilson, Julinha, Márcia, Jack,  
Wanderley, Paulo, Márcio, Wirla, Léo, Airtinho, Akemi, Sé, Fú, meninas da  
SPG-IB/UNICAMP, pessoal do VHF , Feio, Kurô e Ni.*

*Aviso na montra de uma loja de roupas em Nottingham, na Inglaterra:*

*“Fomos fundados há mais de 100 anos e desde então temos agradado e desagradado a nossos clientes. Ganhamos e perdemos dinheiro, sofremos os efeitos da nacionalização do carvão, do racionamento do carvão, do controle do governo e dos caloteiros. Falaram bem e mal de nós, fomos maltratados, enganados, roubados e vulgarizados. A única razão por que ainda continuamos em atividade é para ver o que vai acontecer depois.”*

ج

ndice

# Índice

Introdução.....	001
desde Carlos Chagas até hoje	
as pesquisas referentes ao <i>Trypanosoma cruzi</i>	
tentativas de vacinação e mecanismo indutores de proteção	
as pesquisas imunológicas da doença de chagas experimental	
o papel dos linfócitos T	
os estudos em diferentes modelos experimentais	
Objetivo.....	027
Material e Método.....	028
1. animais.....	028
2. <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	028
cepa Y e estoques utilizados	
manutenção dos estoques	
estoque TC	
estoque TS	
infecção	

3. indução do fenômeno de resistência precoce em camundongos da linhagem CBA/J.....	030
4. determinação da taxa de mortalidade nas linhagens de camundongos A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J infectados pelos estoques sanguíneas (TS) ou de cultura (TC) de <i>Trypanosoma cruzi</i> .....	030
infecção por 10 <sup>5</sup> formas de tripomastigotas dos estoques TC ou TS	
infecção com outras doses dos estoques de TC ou TS	
5. determinação da curva parasitária nas linhagens de camundongos A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J inoculados com 10 <sup>5</sup> parasitas dos estoques TC e TS.....	031
6. determinação do efeito do inóculo de 10 <sup>5</sup> parasitas do estoque TS em camundongos das linhagens A/J e BALB/cJ previamente imunizados 10 <sup>5</sup> parasitas do estoque TC.....	032
7. caracterização das populações de células T CD4 e T CD8 de órgãos linfóides de camundongos infectados com 10 <sup>5</sup> formas dos estoques TC, TS ou TC+TS pelo método de imunoperoxidase.....	032
divisão dos grupos de infecção experimental para preparo do ensaio imunohistoquímico	
anticorpos monoclonais e hibridomas utilizados	
ascite	
preparo dos órgãos para suspensões celulares e para cortes histológicos	
lâminas	
preparo das suspensão de células	
cortes de tecidos congelados	
fixação e estocagem	
técnica de imunoperoxidase	
cálculo da porcentagem celular	

material fotográfico

Resultados.....	038
1. demonstração da indução do fenômeno de resistência precoce em camundongos da linhagem CBA/J.....	038
2. determinação da taxa de mortalidade na infecção por estoques sang�u�colas (TS) e de cultura (TC) de <i>T. cruzi</i> nas linhagens de camundongos A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J.....	038
resultado da taxa mortalidade durante a infecção pelo estoque TC	
linhagem A/J	
linhagem BALB/cJ	
linhagem C57Bl/6J	
resultado da taxa de mortalidade na infecção pelo estoque TS	
linhagem A/J	
linhagem BALB/cJ	
linhagem C57Bl/6J	
3. efeito do inóculo de $10^5$ formas do estoque TS em animais das linhagens A/J e BALB/cJ imunizados com $10^5$ formas do estoque TC.....	041
linhagem A/J	
linhagem BALB/cJ	
4. parasitemia das linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J infectados com $10^5$ formas dos estoques TC ou TS.....	046
5. resultados da porcentagem de subsubpopulaç�es de linfócitos T CD4 e T CD8 de baço e linfonodo poplíteo de camundongos das linhagens A/J e BALB/cJ normais.....	048
subpopulações de linfócitos do baço normal	
subpopulações de linfócitos do linfonodo poplíteo homolateral normal	

subpopulações de linfócitos do linfonodo poplíteo contralateral normal	
6- resultados da porcentagem de subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 do baço e do linfonodo poplíteo de camundongos da linhagem A/J infectados com $10^5$ tripomastigotas dos estoques TC ou TS.....	051
subpopulações de linfócitos T do baço infectado (TC/TS)	
subpopulações de linfócitos T de linfonodo homolateral infectado (TC ou TS)	
subpopulações de linfócitos T de linfonodo contralateral infectado (TC ou TS)	
7. resultados da porcentagem de subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 do baço e do linfonodo poplíteo de camundongos da linhagem BALB/cJ infectados com $10^5$ tripomastigotas dos estoques TC ou TS.....	052
subpopulação de linfócitos T do baço infectado (TC ou TS)	
subpopulações de linfócitos T do linfonodo homolateral infectado (TC ou TS)	
subpopulações de linfócitos T do linfonodo contralateral infectado (TC ou TS)	
8- resultados da porcentagem de subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 do baço e do linfonodo poplíteo de camundongos da linhagem A/J imunizados com $10^5$ tripomastigotas dos estoques TC e desafiados com $10^5$ formas do estoque TS (TC+TS).....	053
subpopulação de linfócitos T do baço infectado (TC+TS)	
subpopulações de linfócitos T de linfonodo homolateral infectado (TC+TS)	
subpopulações de linfócitos T de linfonodo contralateral infectado (TC+TS)	
9- resultados da porcentagem de subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 do baço e do linfonodo poplíteo de camundongos da linhagem BALB/cJ imunizados com $10^5$ tripomastigotas dos estoques TC e desafiados com $10^5$ formas do estoque TS (TC+TS).....	054
subpopulações de linfócitos T do baço infectado (TC+TS)	
subpopulações de linfócitos T do linfonodo homolateral (TC+TS)	
subpopulações de linfócitos T do linfonodo contralateral (TC+TS)	

10- imunohistoquímica.....	059
distribuição e localização de linfócitos T CD4 e T CD8 no baço de animais das linhagens A/J e BALB/cJ normais e infetados pelos estoques TC, TS e TC+TS	
distribuição e localização de linfócitos T CD4 e T CD8 no linfonodo poplíteo de animais da linhagem A/J e BALB/cJ normais e infetados pelos estoques TC, TS e TC+TS	
Discussão.....	065
Conclusões.....	081
Bibliografia.....	083
Apêndice.....	098
isolador.....	098
acomodação.....	099
alimentação.....	099
eutanásia.....	099
anticorpos monoclonais e hibridomas.....	100
imunoperoxidase.....	102
reagentes.....	103
tabelas.....	103



breviações

# Abreviações

a	arteriola	IFN- $\gamma$	interferon gama
ADCC	citotoxicidade celular dependente de anticorpos (antibody dependent cellular cytotoxicity)	Ig	imunoglobulina
bpa	bainha periarteriolar	NK	natural killer cell
BSA	albumina bovina (bovine serum albumin)	PC	paracortical, área
C	corona	PB	polpa branca
CD	cluster of differentiation	PV	polpa vermelha
CT	contralateral, linfonodo	SPF	specific pathogen free
CHP	complexo de histocompatibilidade principal	TC	<i>Trypanosoma cruzi</i> mantidos em cultura celular
DMI	Departamento de Microbiologia e Imunologia	TS	<i>Trypanosoma cruzi</i> mantidos em camundongos
F	folículo	TC+TS	imunização com o estoque TC e desafio com o estoque TS
GM-CSF	fator estimulante de colônias de fagócitos e granulócitos (granulocytes, mononuclear phagocytes - colony stimulating factor)	<i>T. cruzi</i>	<i>Trypanosoma cruzi</i>
H	homolateral, linfonodo	Th	células T auxiliares (T helper)
IL-	interleucina		

#### *Sumário:*

*Foram estudadas respostas imunológicas apresentadas por diferentes linhagens de camundongos à infecção por estoques de Trypanosoma cruzi, cepa Y, mantidos em in vitro (TC) ou in vivo (TS). Foi observado que a manutenção do parasita em cultura celular atenua a virulência, refletida em menor mortalidade. As linhagens também apresentaram diferentes graus de resistência. Entretanto a linhagem BALB/cJ, de mortalidade intermediária à linhagem A/J e C57Bl6/J, apresentou uma cinética parasitêmica maior, e portanto a parasitemia nem sempre correlaciona com a taxa de mortalidade. A imunização com o TC seguido de desafio após 72hs com o TS provocou uma proteção parcial à letalidade desse estoque. Análises imunohistoquímicas na fase precoce da infecção demonstraram uma hipertrofia do linfonodo poplíteo, do baço e das respectivas áreas povoadas por linfócitos, entretanto sem diferença entre localização das células T CD4 e T CD8. A análise percentual mostrou que na fase inicial da infecção existe uma variação do número de linfócitos T CD4 e T CD8 dependente do estoque utilizado, que pode refletir a proteção induzida por TC.*

*Summary:*

*Immune responses from different strains of mice were studied after infection by stocks of Trypanosoma cruzi, Y strain, with in vitro (TC) or in vivo (TS) maintenance. It was observed that maintenance of parasite in cellular culture reduces virulence, reflected by smaller parasitemia. The strains of mice present different levels of resistance to mortality. However, the BALB/cJ strain, of intermediate level of mortality between A/J and C57Bl6/J strains, presented greatest parasitemic kinetics, and therefore the parasitemia may not always correlate with mortality. The immunization with TC following challenge 72hs after with TS partially protected the lethal action of this stock. Immunohistochemical analysis of early phase of infection demonstrated hypertrophy in spleen, popliteal lymph node and respective lymphocyte populated areas, however without difference between T CD4 or T CD8 lymphocyte localization. The percentual analysis showed that there exists a variation of T CD4 and T CD8 lymphocyte subpopulations quantity in initial phase of infection depended of stock utilized, which may reflect the protection induced by TC.*

Ainda não consegui entender o porquê da Doença de Chagas ainda existir, uma vez que o processo evolutivo implica em sobrevivência e perpetuação, as quais estão intimamente relacionadas com a consciência no caso da espécie *Homo sapiens sapiens*. É também curioso saber que a ida à lua já faz parte da História do passado enquanto que a cura da Doença de Chagas reside no mais incerto futuro. Não sinto pena dos chagásicos mais que dos pesquisadores que se prendem na prática tradicional das comunicações científicas, contribuindo para a permanência dessas doenças e condenando a própria espécie. Por outro lado, pode nesse contexto residir um assombroso fenômeno evolutivo que está longe de ser racionalmente compreendido.



ntrodução

# Introdução

No atual século da ciência e tecnologia, a intelectualidade volta-se para a especialização, e com isso estudos cada vez mais pormenorizados vem à tona, nos quais a pesquisa passa a alimentar a si mesma, pouco voltando a sua aplicabilidade para a população que a financia. Devido ao rumo veloz das descobertas e teorias, o aspecto sócio-político-econômico-científico também necessita de um espaço específico para que a ciência não seja fragmentada em meros compartimentos isolados que acabam distorcendo o seu real significado.

Este estudo aborda temas relativos à Imunologia da atualidade, que, como outras ramificações científicas, é tendenciosa no sentido de pesquisar especializados mecanismos de ação.

A nossa pesquisa está centralizada no estudo da fase inicial da infecção experimental com o *T. cruzi*. Compartmentalizamos o sistema imune em alguns órgãos, chamados linfóides, e discutimos possíveis relações dos mecanismo já conhecidos, como, por exemplo, os processos de ativação e supressão. Somado a esse quadro, ousamos raciocinar que o estudo feito em roedores pode ser aproveitável para o ser humano em se tratando dessa doença.

Primeiramente faremos um relato de algumas pesquisas que visaram o melhor entendimento do que é a Doença de Chagas, uma vez que ela têm sido objeto de fascinantes estudos e especulações, tanto em seu quadro político-sócio-econômico quanto no aspecto parasitológico e evolutivo do agente causador, o *T. cruzi*.

## DESDE CARLOS CHAGAS ATÉ HOJE

A infecção pelo *T. cruzi* em humanos é denominada Doença de Chagas em homenagem a Carlos Chagas, que isolou e caracterizou o parasita em meados de 1907 (Chagas, 1981).

É digno de ser lembrado os trabalhos feitos por Carlos Chagas, sob orientação de Oswaldo Cruz, quando foi convidado a verificar uma doença que atacava os trabalhadores e familiares responsáveis pela construção da Estrada de Ferro de Minas Gerais caracterizada por febre, anemia, edema e problemas cardíacos (Chagas, 1909). Essa doença, confundida com opilação endêmica durante tanto tempo, posteriormente recebeu o nome do pesquisador.

Ela é uma doença ainda sem cura, originalmente uma infecção de mamíferos selvagens do continente Americano, tornando-se uma zoonose quando o inseto vetor adaptou-se ao habitat humano devido à invasão pelo homem no processo de desmatamento e ocupação territorial. As residências sujas e pouco iluminadas, construídas de bambu e barro, com inúmeras frestas e rachaduras nas paredes, acúmulos de entulhos nos cantos são locais propícios para a instalação de triatomíneos do gênero *Triatoma* e *Panstrongylus* (Zeledón, 1974). Então não fica difícil responder o por quê dela ocorrer principalmente em área rural e estar estritamente relacionada às condições sócio-econômicas nas zonas endêmicas, sendo um reflexo muito nítido da diferenciação das classes sociais, seja pelo alcance educacional ou pela luta à sobrevivência.

As doenças parasitárias como a malária, a esquistossomose e a tripanossomíase estão entre as causas mais importantes de morbidade e mortalidade nos países em desenvolvimento (Zeledón, 1974). A infecção por *T. cruzi* estende-se pela América Central e América do Sul, do Texas até a Argentina (Zeledón, 1974), e é considerada um dos mais importantes problemas de saúde pública da América Latina sendo estimado cerca de 16-18 milhões de pessoas infectadas na América do Sul e Central, e outras 90 milhões em risco de infecção (Moncayo-Medina, 1987, citado por Powell e Wassom, 1993).

Essas doenças tropicais são um reflexo sócio-econômico por estarem centralizadas nos países em desenvolvimento não havendo a “disponibilidade” de capital necessário para se implantar programas adequados para erradicação dos vetores, que, no caso da Doença de Chagas, parece ser o passo crucial para o controle da doença.

Martins (1968) afirma que, “se, dada a sua grande disseminação na natureza, não é possível a erradicação do agente etiológico, ou dos vetores da doença de Chagas, a solução final do problema da endemia chagásica será, evidentemente, a erradicação da caçua. Ora, como a caçua, ou casa de pau-a-pique, é uma consequência das ‘vergonhosas condições de existência que leva uma grande parte da população rural dos países latino americanos’, o problema da doença de Chagas é muito mais social que médico, e só será resolvido em caráter definitivo através de uma reformulação adequada da estrutura rural obsoleta, ainda prevalente no Brasil e em outras regiões da América Latina” (citado por Pessôa, 1982).

Como parece não haver interesse suficiente para um programa de educação e controle sanitários, erradicação de vetores e controle biológico, devem ser feitos esforços na tentativa de compreender melhor a patologia das doenças parasitárias e direcionar os estudos para o seu tratamento.

## **AS PESQUISAS REFERENTES AO *T. cruzi***

A transmissão da Doença de Chagas para o homem é feita quando a contaminação fecal do barbeiro ocorre em picadas recentes (formando o chagoma), na membrana mucosa (formando o sinal de Romãna) ou na abrasão dérmica (Chagas, 1981). Além da vetorial existem outras formas de transmissão, como a transmissão transplacentária, a transmissão pelo leite materno, pelo coito, pela urina, por ingestão, por transplante de órgãos e a transmissão acidental do protozoário (Teixeira, 1987; Zéledon, 1974). São freqüentes a transmissão por transfusão de sangue, bem como por

acidentes laboratoriais (Hudson, 1983; Teixeira, 1987; Pessoa, 1982), demonstrando a necessidade de maiores cuidados na manipulação do material contaminado.

O inseto transmissor de hábito noturno é da subfamília *triatominae*, família *reduvidae*, em cujo intestino posterior o protozoário parasita se desenvolve e se torna infectante. São conhecidos 112 espécies e subespécies de triatomíneos, sendo que 64 espécies de triatomíneos têm sido achados infectados naturalmente com *T. cruzi*, porém não mais que vinte espécies são epidemiologicamente importantes na transmissão da doença para o homem (Zéledon, 1974). Seu principal transmissor no Brasil, em particular nas regiões centro oriental e sul, é o *Triatoma infestans* e o *Panstrongylus megistus* (Zeledón, 1974; Silva et al, 1979). Como hospedeiros temos marsupiais, edentados, carnívoros, lagomorfos, roedores e primatas, além dos animais domesticados (Teixeira, 1987).

Com relação ao ciclo do protozoário, o *T. cruzi* possui dois estágios distintos nos hospedeiros vertebrados: um extracelular e outro intracelular (Zéledon, 1974; Pessoa, 1982; Teixeira, 1987; Andrade, 1991). Uma vez transmitido, os parasitas, hemoflagelados fusiformes com uma membrana ondulante de 15 a 20 micras de comprimento (Pessoa, 1982), circulam mas não se multiplicam na corrente sangüínea, e sim penetram nas células apropriadas, como as células tissulares, incluindo macrófagos, músculo estriado e liso, células de Schwan, fibroblastos, células gliais, neurônios (Kipinis et al, 1979; Chagas, 1981; Hontebeyrie-Joskowicz e Minoprio, 1991). Nessas células eles irão reverter em amastigotas, e somente depois de 24h (Souza, 1979) se multiplicar progressivamente por fissão binária (Teixeira, 1987) dividindo-se em 2 a cada 14 horas aproximadamente (Souza, 1979), podendo reverter em tripomastigotas antes de romperem a célula hospedeira ou tornar latentes por longo tempo (Teixeira, 1987). As formas amastigotas passam então a se alongar, transformando-se em tripomastigotas, que destroem a célula e caem no espaço intercelular (Souza, 1979; Teixeira, 1987). A célula infectada por 1 parasita dará origem a cerca de 400 novos protozoários no final de 5 dias (Souza, 1979). O número de parasitas circulantes aumenta rapidamente, à custa desses vários focos de multiplicação que, contínua e ciclicamente, se formam e se rompem (Pessoa, 1982). A alimentação desse sangue contaminado pelo barbeiro fecha o ciclo (Chagas, 1981).

À medida que a doença progride no hospedeiro vertebrado, a parasitemia diminui, mas a forma tissular persiste, provocando uma infecção aguda progressiva, uma infecção latente de duração indefinida ou uma latência seguida de infecção crônica (Chagas, 1981).

Um fator intrigante na doença de Chagas é o período assintomático e a variação de seu tempo de duração. É muito importante ter em mente que o "fenômeno iceberg" se aplica à doença de Chagas, pois somente cerca de 1% dos infectados apresentam sintomas clínicos suficientes para atrair a atenção de médicos ( Zeledón, 1974). Qual seria a biologia do protozoário que permite que ele não seja eliminado, na maioria dos casos, e qual poderia ser o significado biológico desse período em que a doença parece latente?

Uma vez instalada no homem, a Doença de Chagas apresenta duas fases: fase aguda e fase crônica.

Na fase aguda da doença (1 a 6 meses de duração em humanos - Teixeira, 1987 e 1 a 2 meses no camundongo - Koberle, 1968), é encontrado casos com ou sem edema das pálpebras (sinal de Romãna); febre em geral constante nas primeiras semanas e, paralelamente ao estado febril, a presença de parasitas no sangue periférico (parasitemia). Ocorre sua proliferação em macrófagos, células endoteliais e do músculo liso dos vasos sanguíneos com posterior colônias de amastigotas intracelulares eventualmente nos músculos estriados, lisos e sistema reticuloendotelial; adenopatias das regiões pré-auricular e retro auricular, submaxilar, cervical e outras regiões; dacrioadenites; conjuntivite; dilatação do baço (esplenomegalia) e do fígado (hepatomegalia); adinamia e perturbações nervosas de natureza diversa; prostração acentuada; delírio e síndrome meníngeas; meningocéfalites; imunossupressão. O coração é atingido desde o início da moléstia surgindo taquicardia, diminuição da pressão arterial e abafamento das bulhas cardíacas. A doença aguda é freqüentemente fatal em recém-nascidos ou crianças, mas em adultos uma forma de doença crônica comumente segue à infecção inicial (Köberle, 1968; Zéledon, 1974; Chagas, 1981; Teixeira, 1987; Pessôa, 1989; Andrade, 1991). O convívio parasita-hospedeiro pode sofrer alguma perturbação ainda não esclarecida que causa a ruptura dessa homeostase desencadeando numa fase crônica da doença.

Nem todos casos evoluem para o estado crônico. Cerca de 5% dos casos sintomáticos morrem, sendo que apenas 25% dos casos da fase aguda são sintomáticos (Teixeira, 1987).

A fase crônica é caracterizada principalmente por perturbações cardíacas (cardiopatía chagásica). Traduz-se este fenômeno por miocardite crônica progressiva e fibrosante com focos de destruição de fibras cardíacas, taquicardia, hipotensão, arritmias extra-sistólicas, cardiomegalia, insuficiência cardíaca progressiva com dilatação de todas as câmaras cardíacas, formação de trombos e fenômenos embólicos. A insuficiência do ventrículo direito ocasiona os grandes edemas e derrames cavitários e congestão visceral, particularmente no fígado. Aparecem também nessa fase afecções do tubo digestivo, como megaesôfago e megacôlon. Ocorrem encefalomielite e presença do parasita no sistema nervoso central, sobretudo nas células microgliais e neuronais, diminuição das células ganglionares, principalmente do sistema nervoso autônomo do coração e plexo mioentérico. Na doença crônica, ninhos de parasitas podem ser encontrados, mas não é freqüente a parasitemia (Chagas, 1909; Köberle, 1968; Zéledon, 1974; Amorin, 1979; Teixeira, 1987; Andrade, 1991).

Pelo fato do período agudo poder ter um curso silencioso e os sintomas poderem aparecer somente após vários anos com uma duração em média de 26,7 anos antes do aparecimento da fase crônica (Teixeira, 1987), e sendo que somente 30-40% dos infectados desenvolvem a doença (Andrade, 1979), talvez seja um pouco mais compreensível o por quê da doença ainda ser subestimada e negligenciada como um problema de saúde pública.

A descoberta da Doença de Chagas foi facilitada por experimentos em animais desde 1909, como o macaco e cobaias (Chagas, 1981). A possibilidade de utilização de animais experimentais têm possibilitado um progresso mais rápido na ciência, inclusive na Doença de Chagas, e até hoje são utilizados por reproduzirem comparativamente a fisiologia do corpo humano.

Outro auxílio na pesquisa são as culturas celulares, que nos permitem estudar especificamente o comportamento de determinada população celular escolhida, além de servir como mimetizador fisiológico para manutenção de parasitas. Isso

possibilitou o desenvolvimento de meios específicos para manutenção do *T. cruzi* e o isolamento de suas várias cepas que diferem na virulência e patogenicidade (Brener e Chiari, 1963; Brener, 1967; Meyer, 1978). Muitas cepas de tripomastigotas têm sido mantidos em culturas de tecidos (Menezes, 1968; Basombrio e Bususchio, 1989) ou em camundongos (Krettli, 1979). Como exemplo das cepas mais estudadas temos a Berenice, Tulahuén e a Y, isoladas de humanos com doença crônica, e a cepa CL isolada de triatomíneos (Krettli, 1979).

A evidente ineficácia da resposta imune a muitos parasitas levam a pensarmos de imediato que os parasitas bem sucedidos são em geral pobres imunógenos. Entretanto os antígenos parasitários são excessivamente complexos e as respostas imunes contra eles formam complicados enigmas. O ciclo biológico dos protozoários pode ser constituído de várias formas, cada uma possuindo diferentes estruturas antigênicas que podem estar presentes simultaneamente dentro do hospedeiro.

Dentre os vários métodos que são empregados para obtenção de antígenos do *T. cruzi* com o intuito de detectar qual determinante antigênico poderia ativar os diversos mecanismos imunológicos destacamos o ciclo de congelamento e descongelamento para ruptura de membrana (Scharfstein et al, 1986; Cazzulo et al, 1989), além outros métodos de lise (Rangel et al, 1981; Fischer et al, 1988). Essas técnicas forneceram um repertório antigênico que vai desde frações de antígenos solúveis, flagelares e do extrato de protozoário, até constituintes polissacárides, lipopeptidofosfolipídios vesicular e glicoproteínas de membrana, sendo que cada fração é utilizada em animais experimentais para estudo de seu envolvimento com a resposta imune. Vários antígenos já foram isolados e caracterizados, porém a importância de cada um ainda é discutida.

## TENTATIVAS DE VACINAÇÃO E MECANISMO INDUTORES DE PROTEÇÃO

As vacinas são muito visadas na tentativa de controle de qualquer que seja a doença pela sua praticidade e eficiência, e o estudo da Doença de Chagas também têm levantado esse aspecto.

Várias tentativas de vacinação são realizadas, especialmente utilizando o *T. cruzi* morto ou suas frações, e também tripanossomas mantidos em cultura celular, que não têm capacidade de matar o animal de infecção (Teixeira, 1983).

Na tentativa de estudar possibilidades de produção de vacinas, foram feitas investigações experimentais da imunização e da atividade de exoantígenos do *T. cruzi* com inoculações de plasma coletado de camundongos em fase aguda. Esses exoantígenos presentes no plasma foram capazes de estimular o sistema imune constatado pela proteção contra mortalidade e redução na parasitemia (Araújo et al, 1978). Outros experimentos datados desde as décadas de 1950 (Teixeira, 1987) demonstraram que a administração de tripanossomas mantidos em cultura conferia proteção contra a forma virulenta obtida de sangue. A proteção foi constatada pela redução na parasitemia e redução da mortalidade.

Verificou-se, também, que a imunização com a cepa Corpus Christi protege contra a infecção da cepa Brasil em seis linhagens de camundongos, DBA/2J, C3H/HeJ, C57BR/cdJ, C57Bl/6J, LAF<sub>1</sub> e SWR/J, verificado pela parasitemia e taxa de mortalidade (Hunt, 1967). Utilizando a cepa Tulahuén, outra pesquisa mostrou que o inóculo prévio de 20 dias de tripanossomas de cultura em camundongos Swiss conferia proteção contra a dose letal de tripanossomas obtidos de sangue, prevenindo o desenvolvimento da patologia crônica, refletida em redução da mortalidade, aparecimento de pico de parasitemia mais tardio e diminuição da incidência de lesões no músculo esquelético (Basombrio e Bususchio, 1982). Experimentos com as cepas Y e F mostraram que em camundongos da linhagem C57Bl/10J, B10.A e Swiss ocorre uma redução da mortalidade, tanto na imunização com a cepa F e desafio com a cepa Y, como no inverso (Kloetzel e Lafaille, 1983). O fenômeno de proteção foi verificado também quando se fazia o tratamento prévio da linhagem de camundongos susceptível

ao *T. cruzi* C3H(He) com formas derivadas de cultura da cepa Corpus Christi duas semanas antes da inoculação da cepa virulenta Brasil (Rowland e Ritter 1984; Ritter e Rowland, 1984). Foi constatado que havia um decréscimo da parasitemia e aumento da longevidade.

Trabalhos de Camargo, et al (1989) mostram um fenômeno de resistência em relação à infecção por *T. cruzi* quando camundongos CBA/J são inoculados primeiramente com tripansomas originários de cultura celular (TC). Estes animais resistiam ao processo infeccioso quando desafiados depois de 24, 48 e 72 horas após com  $10^5$  formas do *T. cruzi* sangüícola correspondente a 2.000x LD<sub>50</sub>, sobrevivendo os 30 dias do período de observação. Quando esses animais foram inoculados com o mesmo número de tripomastigotas sangüícolas (TS) eles morreram em  $10 \pm 1$  dias. Portanto, a inoculação de TC conferiu uma resistência contra o inóculo de TS, refletido em aumento de sobrevivência ao desafio com dose letal de tripomastigotas sangüícolas. Nesse mesmo estudo, os autores verificaram, através da atividade de depuração de carbono, uma atividade fagocítica aumentada em camundongos inoculados com TC, contrariamente ao observado em relação ao inóculo de TS, que tiveram a atividade fagocítica diminuída, sugerindo que a resistência precoce poderia envolver fatores não específicos. Adicionalmente, Camargo et al (1991) demonstraram, utilizando epimastigotas, tripomastigotas sangüícolas, amastigota e extrato de parasitas (incluindo o obtido da TC da cepa Y) que somente o TC vivo induz o fenômeno de resistência precoce, verificando portanto que a resistência, especificamente induzida por epítomos de TC que podem estar mascarados, ausentes ou em baixas concentrações em outras formas de parasitas e seus extratos. Experimentos com estoques da cepa Y e a cepa CL em camundongos da linhagem CBA/J também induziram o fenômeno de resistência, entretanto a proteção foi parcial (Oliveira, tese de mestrado, 1995). Outro fato constatado pelos autores foi de que essas formas de cultura conferiam uma proteção apenas contra a infecção pelo *T. cruzi*, e não contra a infecção por outros parasitas intracelulares como a *Klebsiella sp.*, *Streptococcus pneumoniae* e *Toxoplasma gondii*.

Entretanto essas pesquisas mostram que resta um poder infectante nas formas mantidas em cultura e que inviabiliza o seu uso na proteção contra a infecção pelo protozoário. Mesmo assim, muitos estudos são feitos utilizando as formas de

cultura para proteção na tentativa de descobrir algum direcionamento na elaboração de vacinas e de terapias auxiliares da infecção chagásica. Portanto, faremos a seguir um relato dos estudos feitos sobre o comportamento da resposta imune frente ao *T. cruzi* que são úteis na compreensão dos mecanismos imunológicos que podem ser modulados quando pensamos em termos de vacinação.

## AS PESQUISAS IMUNOLÓGICAS DA DOENÇA DE CHAGAS EXPERIMENTAL

Os fenômenos imunológicos na patogênese da Doença de Chagas são resultados de estudos feitos em modelos experimentais, tanto *in vivo* como *in vitro*. Existem diferenças importantes a serem ressaltadas entre a doença em humanos e a infecção experimental por *T. cruzi*. Quando se faz a inoculação experimental provavelmente utiliza-se um número muito maior de parasitas/inóculo/animal; em contrapartida temos geralmente várias reinfestações em humanos (Silva et al, 1979), refletida em número de vezes de contaminação. Outro fator a ser destacado é a utilização de tripanossomas mantidos em camundongos isogênicos e em cultura celular que, de alguma forma, pode selecionar clones de parasitas para um determinado microambiente fisiológico (Teixeira, 1987).

A diferença é refletida também na evolução da patogenia, pois diferentemente de humanos, que apresentam uma fase latente assintomática podendo, ou não, desenvolver uma fase crônica, a maioria dos camundongos morrem na fase aguda no pico da parasitemia (Minoprio, 1989; Andrade, 1991).

Portanto, apesar do camundongo ou rato não serem modelos que consigam reproduzir o quadro da doença de humanos (Andrade, 1991), devemos tentar tirar o máximo de informações, tanto de experimentos *in vivo* quanto *in vitro*, para conseguir delinear os processos mais importantes da moléstia. Várias inferências, baseadas em sistemas de modelos animais, podem não ser aplicáveis ao homem, e,

portanto, a extrapolação dos resultados em animais experimentais para o ser humano deve ser feito com cautela.

Os fenômenos imunológicos que ocorrem quando o homem é infectado pelo *T. cruzi* refletem a complicada interação que resulta dos diferentes antígenos que entram em intervalos na circulação durante o curso da patogenia e causam o mais importante efeito a longo prazo da doença espelhado no seu efeito social: a debilitação produtiva. O que pôde ser observado na infecção experimental pelo protozoário é que na fase aguda existe uma importância maior dos mecanismos imunológicos mediado por células, os quais deixam de ter uma participação mais efetiva na fase crônica onde os mecanismos imunorreguladores são então mediados por anticorpos (Tarleton, 1991). Portanto, no contexto do parasitismo intracelular, o estudo imunológico básico da infecção por *T. cruzi* tem sido relacionada principalmente com os mecanismos de lise do parasita intracelular pelos macrófagos na fase aguda, e com a lise dependente de anticorpos dos parasitas extracelulares na fase pós aguda e crônica.

Na infecção murina parece haver duas fases no controle da parasitemia (Trischmann, 1983). A primeira fase ocorreria durante as primeiras poucas semanas após a infecção, tendo um mecanismo de controle independente de anticorpos. Nesse período, a grande quantidade de antígenos pode resultar na supressão a antígenos heterólogos, característica da fase aguda. A segunda fase começaria muitas semanas após a infecção com o aumento no título de anticorpos, sendo o controle mediado por anticorpos. É dessa forma que o *T. cruzi* se depara com uma resposta imune que é eficiente para a redução do parasitismo sanguíneo (Andrade, 1991).

A somatória da presença da grande variedade antigênica, produtos metabólicos, antígenos solúveis liberados (Teixeira, 1987), antígenos homólogos de reação cruzada com antígenos do hospedeiro (Levin, 1991; Petry e Voorhis, 1991; Arnholdt e Scharfstein, 1991), provavelmente acabam culminando na existência de uma resposta imune capaz de manter a infecção em níveis mínimos, no que se refere à parasitemia, embora incapaz de erradicar o parasita ou prevenir o aparecimento de lesões. Por outro lado parasitemia subpatente, que permanece por toda a vida do hospedeiro (Chagas, 1981), o fato que reinoculações do *T. cruzi* não induzem novas

fases agudas no decurso da infecção crônica (Krettli, 1979), a ausência de cura espontânea e persistência do parasitismo (Andrade, 1991) sugerem a presença de mecanismos de evasão do parasita que devem contribuir para a permanência do parasitismo.

A detecção de muitos antígenos de reação cruzada entre o parasita e o hospedeiro (Levin, 1991; Petry e Voorhis, 1991; Arnholdt e Scharfstein, 1991) tem levantado a possibilidade que o parasita utilize do mimetismo antigênico para se proteger do sistema imunológico do hospedeiro, cobrindo-se com antígenos similares ao hospedeiro e sendo pobremente reconhecido, como é o caso da adsorção de imunoglobulinas do hospedeiro na superfície do parasita (Krettli, 1983). Quando os animais respondem aos múltiplos determinantes antigênicos presentes nesses antígenos, é difícil distinguir os determinantes que induzem resposta humoral ou celular e que determinam a proteção, quais causam doença no hospedeiro, e aqueles que possuem pouco ou nenhum significado clínico, mas que são importantes no diagnóstico. Dessa maneira, muitos estudos têm visado o esclarecimento do envolvimento desses antígenos no curso da infecção chagásica.

Outros mecanismos de escape utilizado pelo *T. cruzi* que também foram sugeridos é a fabulação, o “capping” de complexos antígeno-anticorpo na superfície do parasita e posterior “shedding” (Krettli, 1983). Esse fenômeno conhecido como mimetismo molecular, pode desencadear um processo de autoimunidade, principalmente com a produção de autoanticorpo antineuronal e anticardíaco que provocam desordens nervosas e doenças cardíacas (Fischer et al, 1988).

Existem duas correntes que explicam o fenômeno da autoimunidade (Andrade, 1991), que podem não ser mutuamente excludentes. Uma delas aponta a presença de antígenos de reação cruzada entre o músculo cardíaco e o *T. cruzi* (Santos Buch e Teixeira, 1987; Ribeiro dos Santos et al, 1991). A outra sugere que a ativação policlonal durante a infecção aguda poderia liberar clones autorreativos (Minoprio et al, 1986). Isso quer dizer que a principal antigenicidade do *T. cruzi* poderia ser o resultado da perturbação do sistema imunológico do hospedeiro. Pode ser que o *T. cruzi* não utilize do mimetismo como mecanismo de escape do sistema imunológico do hospedeiro, e que a ativação policlonal que o parasita causa seja responsável pela quebra da autotolerância resultando em autoimunidade (Eisen e Kahn, 1991).

Adicionalmente, foi demonstrada uma analogia funcional entre proteínas estágio-específicas, liberadas pelo parasita, com proteínas do hospedeiro. Uma proteína denominada TC TOX possui atividade formadora de poros similar à C9 (componente do sistema complemento) (Andrews et al, 1990). Outra proteína, a CCT possui função análoga ao DAF (Decay Accelerator Factor) (componente do sistema complemento) (Joiner et al, 1987), e também a sialidase do parasita é homóloga à sialidase do hospedeiro mamífero, sugerindo que o parasita poderia utilizar também o mimetismo funcional, utilizando fatores 'host/like' e enzimas para próprio benefício (Eisen e Kahn, 1991).

Com relação aos mecanismos vinculados ao sistema complemento, sabe-se que nas aves, que não desenvolvem a infecção pelo parasita, a atividade lítica do complemento é intensa, sendo capaz de lisar tripomastigotas *in vivo* imediatamente após a sua inoculação, e *in vitro* na ausência de imunoglobulinas (Dias, 1944, citado por Krettli, 1979). Além disso, foi observado que a depleção do complemento com fator de veneno de cobra causa exacerbação da parasitemia em camundongos infectados por *T. cruzi* e mortalidade precoce em camundongos descomplementados. (Teixeira, 1987). Dessa forma, há evidências que sistema complemento têm participação efetiva na patologia chagásica.

Um interesse maior reside no papel desempenhado pelos macrófagos do sistema monocítico fagocitário. Essas células são consideradas como a primeira linha de defesa contra a infecção, uma vez que servem como hospedeira inicial do parasita intracelular, como célula central do hospedeiro na montagem da defesa imune específica sendo também responsável pelo reconhecimento e fagocitose de partículas e microorganismos. Além disso, possuem propriedade fisiológica de destruí-los pelos metabólitos  $O_2^-$ ,  $OH^-$  e  $H_2O_2$  (Nogueira et al, 1981) e por mecanismos dependentes de  $NO_2$  (Muñoz-Fernandes et al, 1992). Em adição, a resposta imune humoral é dependente da presença funcional dos macrófagos que cooperarão com linfócitos derivados do timo e da medula óssea (ou correspondente) na produção de anticorpos.

Considerando que os macrófagos tenham importante papel nos eventos cruciais e subsequentes à infecção levando a uma resposta imune, a sua capacidade funcional em camundongos infectados com tripanossomas foi estudada,

particularmente no que diz respeito à captura, metabolismo e antígenos ligado ao macrófago. Análises da atividade fagocítica reticuloendotelial utilizando a proporção entre inóculo e remoção de carbono coloidal do sangue revelam que a atividade fagocítica de animais infectados com o tripanossoma é maior que a de animais normais (Clinton et al, 1975).

Estudos *in vitro* mostram que a atividade macrofágica anti-tripanosossoma é relacionada com o aumento da capacidade de liberação de radicais de oxigênio, que por sua vez seria mediado por fatores solúveis liberados pelas células T ativadas, os quais estariam envolvidos no fenômeno de resistência de algumas linhagens de camundongos (C3H, BALB/c e C57Bl). Observações *in vivo* mostram que o *T. cruzi* se multiplica em macrófagos de animais não imunizados, ao passo que é intensamente destruído em macrófagos de animais imunizados (Russo e Starobinas, 1991). Foi demonstrado também que ocorre penetração ativa do tripomastigota em macrófagos e passiva do epimastigota (Kipnis et al, 1979).

A integração macrófago-linfócito tem sido documentada e antígenos ligados ao macrófago tem sido apresentados como bons desencadeadores dos mecanismos de células T e B (Janeway, 1993; Neetfjes e Momburg, 1993). Em infecções produzidas por protozoários, tem sido sugerido que a inabilidade de animais infectados montar uma resposta imune adequada é associado com alterações por parte dos macrófagos (Araujo-Jorge, 1989).

Os macrófagos também foram relacionados à imunossupressão da fase aguda, sendo sugerida a existência de uma população de macrófagos supressores no baço (Cerrone e Kuhn, 1991). Essa imunossupressão afeta também as atividades das células T auxiliares e a produção de citocinas e sua expressão, e, apesar da habilidade de camundongos infectados em gerar células T auxiliares específicas ao parasita e produzir níveis aparentemente normais de imunoglobulinas circulantes, a geração da resposta contra os antígenos do parasita e antígenos heterólogos (Cunningham et al, 1981), como eritrócitos de carneiro, é suprimida *in vitro* e *in vivo*, podendo essa supressão ser mediada por populações de macrófagos supressores (Cerrone e Kuhn, 1991; Cerrone et al, 1992).

Em estudos feitos em baço e linfonodos infectados, foi observada uma inibição da proliferação celular. Dessa forma, para verificar o mecanismo de supressão

da proliferação de células T, investigou-se a produção de IL-2, induzida por mitógenos, e constatou-se que ela também estava suprimida. Verificou-se também pela cocultura, que o linfonodo possui macrófagos supressores que inibem a proliferação das células de linfonodo normal, o mesmo não ocorrendo com o baço (Vandekerckhove et al, 1994).

Além dessas observações, foi verificado uma supressão na resposta quando estudaram o efeito da infecção pelo tripanossoma na resposta imune primária e secundária à antígenos heterólogos T-dependentes e T-independentes (Ramos et al, 1978). Também nesse aspecto, foi demonstrado que o soro de camundongos C57Bl/6J infectados até 120 dias com *T. cruzi* (cepa Brasil) suprimiu a resposta de anticorpos das células de cultura de baço e linfonodos. A supressão humoral tem sido atribuída a competição antigênica por sítios de superfície de macrófagos que previne interação normal de T e B, substâncias metabólicas liberadas por organismos proliferativos e deletério para linfócitos imunocompetentes, e IFN- $\gamma$  modulando atividade de linfócitos T e B (Cunningham e Kuhn, 1991).

Uma das citocinas mais envolvidas é a IL-2 que tem sua produção deprimida frente a mitógenos no curso de uma infecção, e isso é relevante pois a IL-2 é uma linfocina fundamental no fenômeno de cooperação celular no sistema imunológico, sendo responsável pela ativação de linfócitos B e T, macrófagos, células NK, além de estimular a secreção de outras citocinas (Janeway, 1993). Essa inibição é discutido ser resultado do estado de maturação das células T e não da perda de células produtoras de IL-2 ou da ausência de IL-1 (Tarleton 1988a). Também é proposto que a falha na produção de IL-2 em resposta à estimulação antigênica é devido à regulação da sua produção por células supressoras, que poderiam ser células T ou macrófagos (Tarleton, 1988b).

Experimentos *in vitro* mostram que a co-cultura de linfócitos de humanos com o parasita suprime algumas de suas funções, incluindo a capacidade de produzir e utilizar a IL-2, visto que a IL-2 exógena não se mostrou capaz de restaurar a sua capacidade linfoproliferativa (Beltz e Kierszenbaum, 1987; Vandekerckhove et al, 1994).

A produção mínima de IL-2 coincide com o elevado nível de IFN- $\gamma$  nos primeiros 18 dias de infecção, e talvez haja alguma relação entre essas citocinas

(Tarleton 1991). Baseado em estudos feitos por Mosmann et al (1986), Tarleton (1991) observa que tanto a IL-2 quanto o IFN-  $\gamma$  são produzidos pelas células T, porém somente a produção da IL-2 é afetada no processo de infecção por *T. cruzi*. O autor nos lembra, entretanto, que o IFN-  $\gamma$  pode ser produzido por outras populações de células T assim como pelas células NK e com estudos de depleção por anticorpos anti IFN- $\gamma$  pôde identificar que a maior fonte de IFN- $\gamma$  vem de células Thy-1 CD8<sup>+</sup> CD4<sup>-</sup>. Ainda com relação ao IFN-  $\gamma$ , foi observado um considerável aumento no número de parasitas circulantes através de um tratamento anti-IFN- $\gamma$  em camundongos C57Bl/6J infectados com tripomastigotas da cepa CL (Minoprio et al, 1989).

Experimentos utilizando camundongos BALB/cJ *Xid* imunodeficientes em IL-10 revelaram que havia uma produção elevada das linfocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e IL-4 durante a infecção pela cepa CL de *T. cruzi*. Esses animais apresentam uma resistência maior à infecção relacionada ao controle da parasitemia e ao desenvolvimento da fase aguda e crônica, que foi abolida com um tratamento anti-IFN- $\gamma$ , indicando um importante papel dessa linfocina (Minoprio et al, 1993).

Adicionalmente, a utilização de indutores sintéticos de IFN- $\gamma$ , como o tilerone hidrocloreto, resultou em aumento de resistência na fase aguda refletido na sobrevivência de 50% da população de camundongos C57Bl/6J infectados com uma dose letal da cepa Y de *T. cruzi* (James et al, 1982).

O papel do IFN- $\gamma$  ainda é muito discutido e estudado, algumas observações apontam para o seu papel diversificado, ora demonstrando um aumento, ora uma diminuição na produção frente a mitógenos (Vandekerckhove et al, 1994).

A participação das células NK na produção de IFN- $\gamma$  têm sido estudada em experimentos utilizando camundongos “beige” (deficientes em células NK) (James et al, 1982), e através de tratamento com anticorpos anti-NK (Cardillo et al, 1996), sugerindo uma importância dessas células na fase aguda da infecção experimental por *T. cruzi*.

Apesar da pronunciada supressão da IL-2, a produção de outros produtos pelas células T não parece ser afetada pela infecção pelo *T. cruzi*. A produção de IL-3 é suprimida, porém não na mesma magnitude da IL-2, e a produção de GM-CSF, IL-4, IL-5 e IL-6 parece não ser afetada (Grau e Modlan, 1991; Tarleton, 1991).

Com relação às imunoglobulinas, anticorpos anti-tripanosomas podem ser detectados após a primeira semana de infecção, dependendo da dose de inoculação, sendo detectados aderidos à superfície do parasita ou no soro, tanto na fase aguda como na crônica. A adesão é específica, no caso do *T. cruzi*, e pode causar a sua destruição através de lise mediada por complemento (Krettli, 1983).

A ação protetora dos anticorpos antiparasitas pode ocorrer, portanto, pela ativação do complemento através de complexos antígeno-anticorpo ou via Fc da imunoglobulina ligada à superfície do parasita, resultando na lise do protozoário; pela opsonização do parasita facilitando a fagocitose e destruição pelos macrófagos; degranulação dos mastócitos por anticorpos citofílicos; citotoxicidade através de granulócitos, neutrófilos e monócitos; inibição da penetração na célula hospedeira por bloqueio de antígenos necessários à interiorização (Krettli, 1983).

O interesse na participação das imunoglobulinas específicas na patologia chagásica reside no fato da Doença de Chagas ser considerada uma doença autoimune devido à presença de autoanticorpos que reagem principalmente com o músculo esquelético e cardíaco (Laguens et al, 1991). Esses autoanticorpos são resultados de epítomos da reação cruzada que existe entre o hospedeiro e o parasita, assim como da ativação policlonal que pode ativar clones autorreativos (Petry e Eisen, 1989).

Os anticorpos específicos na fase aguda da infecção em humanos são da classe IgM, podendo também ocorrer anticorpos da classe IgG e IgA (Teixeira, 1987). Na fase crônica, as imunoglobulinas mais freqüentes são da classe IgG. Aqui é importante salientar que enquanto os autoanticorpos naturais são da classe IgM, os anticorpos autorreativos encontrados na Doença de Chagas são da subclasse IgG2a, porém o significado desse 'switch' ainda não foi esclarecido (Hontebryrie-Joskowicz e Minoprio, 1991).

Experimentos de transferência de soro imune contendo diferentes classes de imunoglobulinas proveniente de soro de camundongos em fase crônica da infecção pelo *T. cruzi* (obtidas por fracionamento em coluna de Sepharose e Sephadex) em animais pré-infectados mostraram que os anticorpos mais eficientes na proteção

foram as IgG2 (mais especificamente IgG2a), sendo que as frações IgM e IgG1 não conferiram proteção (Takehara et al, 1981).

O tratamento com antissoro anti- $\mu$  em ratos neonatais, e que ficaram portanto incapazes de sintetizar IgM e IgG2a, tornou-os mais susceptíveis durante fase aguda da infecção, indicando um papel importante dos anticorpos (Rodrigues et al, 1981). A atividade lítica desses anticorpos está relacionado à fixação do complemento, apesar da lise mediada por complemento parece não exercer influência significativa (Teixeira, 1987).

A elevação do número de células B na fase aguda foi constatada por Kierszenbaum e Hayes (1980), que verificaram um aumento de 3x no número de células B, e por Hayes e Kierszenbaum (1981), em experimentos em baço de camundongos da linhagem CBA/J infectados com a cepa Tulahuén. Apesar de ter sido verificado um aumento nas células B, muitos trabalhos reportam uma resposta mitogênica reduzida (Kierszenbaum e Hayes, 1980; Vandekerckove et al, 1994).

Ortiz-Ortiz et al (1980) também detectaram uma ativação policlonal de células B de baço de camundongos A/J infectados com a cepa Cocula, à antígenos heterólogos (eritrócitos de carneiro, burro, camundongo e equino) verificado através da técnica de PFC, com pico no 5-6 dia, e que diminuiu antes da parasitemia aparecer. Os autores sugerem que a ativação policlonal pode sucumbir enquanto os parasitas são seqüestrados nos tecidos. Uma segunda ativação deveria ocorrer quando os parasitas replicassem no sangue, entretanto isso não ocorreria devido à presença de células supressoras.

A ativação policlonal de células formadoras de anticorpos contra antígenos não relacionados ao parasita foi constatada também por Cunningham et al (1981) pela técnica de PFC, nas infecções pela cepa Brasil, somente na linhagem de camundongos C57Bl/6J, e não em C3H/HeJ. Os autores sugerem um papel adjuvante do parasita que pode levar à síntese de imunoglobulinas com especificidade além dos antígenos parasitários, podendo originar uma doença autoimune.

O fato de estudos demonstrarem uma redução na resposta mitogênica de células B (Hayes e Kierszenbaum, 1981; Kierszenbaum e Hayes, 1980;

Vandekerckove et al, 1994) e ter sido constatado aumento do número de células B sugere a existência de células T supressoras (Nogueira et al, 1981; Ramos et al, 1979) ou fenômenos supressivos (Vandekerckove et al, 1994).

## **O PAPEL DOS LINFÓCITOS T**

Quanto à participação dos linfócitos nos processos imunes, vários trabalhos apontam o importante papel da imunidade mediada por células T na patogênese da Doença de Chagas (Trischmann, 1983; Trischmann, 1984; Tarleton, 1988-1991; Townsend, 1989; Hontebryrie-Joskowicz, 1991). Essas células podem atuar cooperando na produção de anticorpos antiparasita, na secreção de linfocinas acionando os mecanismos imunopatológicos, ou na função direta citotóxica, podendo ter participação tanto na fase aguda como na fase crônica.

Experimentos demonstrando a participação das células T foram feitos em animais timectomizados (timectomia neonatal), os quais mostraram uma mortalidade precoce e maior parasitemia que animais eutímicos (Schmunis et al, 1971). Em camundongos atímicos nude (BALB/cJ nu/nu) os resultados se mostram semelhante, sendo que o transplante de timo neonatal nessa linhagem restabeleceu a resistência para os níveis de animais normais (Kierszebaum e Pienkowski, 1979).

Adicionalmente, animais normalmente resistentes deficientes em células T por administração de anticorpos anti-timócitos (Roberson et al, 1973) tiveram o tempo de sobrevivência diminuída, o mesmo ocorrendo em outros experimentos feitos em camundongos 'nude' geneticamente atímicos (Kierszebaum et al, 1979; Trischmann e Pienkovski, 1979), evidenciando a importância do timo no controle da patogenia.

O envolvimento das células T no controle da infecção também foi demonstrada pela transferência de células T de camundongos cronicamente infectados

em camundongos recém-infectados, demonstrando uma transferência de proteção refletida em redução de parasitemia e taxa de mortalidade (Trischman, 1980).

Experimentos com suspensões celulares depletadas de células T, provenientes de animais infectados com *T. cruzi*, mostraram que estas foram mais efetivas em transferir a proteção quando administradas em camundongos recém-infectados, implicando um papel importante de outros tipos celulares presentes na suspensão depletada, como células B, NK e K (Trischman, 1980). A participação das células T pode mediar a proteção matando o parasita diretamente (ADCC), estimulando a produção de anticorpos e ativando macrófagos para aumento na destruição dos parasitas fagocitados. Observações de que os parasitas se mantêm vivos em câmaras de milipore implantadas em animais imunes, onde eles estão em contato com fatores humorais e não com células fagocíticas do hospedeiro, demonstram a existência da citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos (ADCC) (Logan e Hanson, 1962; Kipinis et al, 1981).

Estudos de proliferação celular de animais infectados com *T. cruzi* utilizando mitógenos de células T (fitohemaglutinina, concanavalina A) e de células B (lipopolissacarídeo) mostraram uma supressão na resposta de linfócitos B e T frente a esses mitógenos. Quando se fez a correlação com o número de células presentes no curso da infecção com essa supressão, as populações de células T e B se comportaram de maneira distinta. Houve uma queda do número de células T juntamente com uma queda na resposta a mitógenos, somado à uma depleção desse tipo celular nos compartimentos do baço. Já com relação às células B, apesar da resposta frente a mitógenos estar suprimida, houve um aumento no número de células do baço, coincidente com a esplenomegalia observada. Possivelmente essa resposta suprimida seja mediada por mecanismo supressor ou defeito nas células B (Hayes e Kierszebaum, 1981). Esses resultados mostram também que a imunossupressão é característica da fase aguda da doença, inclusive porque camundongos da fase crônica imunossuprimidos com ciclofosfamida apresentam um perfil de fase aguda; ao passo que na fase crônica, onde há um decréscimo da parasitemia, as respostas aos mitógenos se mostraram normais (Hayes e Kierszebaum, 1981).

A imunossupressão característica da fase aguda levaram inicialmente os estudiosos a pesquisarem o envolvimento dos linfócitos T CD8, uma vez que esses linfócitos são clássicas células citotóxicas/supressoras (Bloom et al, 1992; O'Rourke e Mescher, 1993). Outro fator que levou os pesquisadores ao estudo das células T CD8 foi que mecanismo básico de infecção é a interiorização uma vez estabelecido o contato tripomastigota-célula alvo, que geralmente é o macrófago. Analisando esse comportamento, a linha de raciocínio que se seguiu foi a questão de como ocorreria o processo de cooperação celular no contexto do CHP. Sabe-se que uma vez no interior da célula, os lisossomos fundem-se ao vacúolo contendo o parasita descarregando enzimas, porém o protozoário consegue escapar (Anselmi e Moleiro, 1974) e a multiplicação se dá intracelularmente. Como a célula alvo também é uma célula apresentadora de antígeno, e, sabendo que quando os antígenos possuem origem interna à célula a apresentação se dá no contexto de moléculas do CHP da classe I (Tarleton, 1991), as células que reconheceriam o antígeno e que seriam então ativadas seriam preferencialmente os linfócitos T CD8.

Uma demonstração do envolvimento das células T foram realizados com a depleção de células CD8<sup>+</sup> por anticorpos anti CD8 (Lyt-2) desde o início da infecção (Tarleton, 1990). A sua depleção *in vivo* tornou tanto a linhagem de camundongos normalmente resistentes C57Bl/6J, quanto a linhagem susceptível C3H, incapazes de controlar a infecção causada pela cepa Y de *T. cruzi*. Porém, a ausência de células CD8 não aboliu a imunossupressão observada na proliferação frente à mitógenos e antígenos parasitários, e não aumentou a produção de IL-2, sugerindo uma dependência de outros tipos celulares para essas atividades (Tarleton, 1990). Em outro trabalho (Tarleton 1991) é discutido que as células CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup> desempenhariam um papel mais importante do que as células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> na fase aguda da doença, pois ambas populações celulares podem ser depletadas após algumas semanas de infecção sem que haja aumento no processo infeccioso.

Outra linha de pesquisa foi conduzida por experimentos que demonstram que a disrupção do gene codificador para a  $\beta 2$ -microglobulina, por recombinação homóloga, faz com que os camundongos falhem em expressar os produtos do CHP da classe I (Complexo de Histocompatibilidade Principal). Esse é um sistema excelente na avaliação da importância do fenômeno de apresentação de

antígeno na resposta das células T CD8 na resistência a doenças infecciosas. Através desse ensaio foi demonstrado (Tarleton 1992) que esses camundongos não apresentam resposta inflamatória nos tecidos infectados pelo parasita, demonstrando a importância das células T CD8 na proteção imune contra a infecção pelo *T. cruzi* e inferindo uma importância maior dos produtos do CHP da classe I. Com relação a esse trabalho, Parnan (1992) ressalta que as glicoproteínas codificadas pelo CHP da classe I também afetam a especificidade e função das células NK (Natural Killer).

Em trabalho mais recente (Sun e Tarleton 1993) foi verificado, através do método avidina-biotina-peroxidase, a população de células T Thy-1, CD4+, CD8+, B e macrófagos do músculo esquelético e cardíaco de camundongos C57Bl/6J infectados com *T. cruzi* (cepa Brasil) na sua fase aguda, correspondente a 12-14 semanas. Os pesquisadores observaram que a maior população de linfócitos correspondiam a linfócitos T, sendo que a subpopulação de células CD8+ teve destaque sobre as CD4+ (3:1 no músculo esquelético e 8:1 no coração), sugerindo um importante papel das células T CD8+ na fase aguda da doença de Chagas murina.

O papel das células CD8, tanto em sua base citotóxica e supressora, quanto no seu perfil de secreção de linfocinas, é muito estudado, tendo sido atribuído uma importante contribuição a sua secreção de IFN- $\gamma$  pois sua quantidade sérica não é afetada na imunossupressão (Tarleton, 1990). Com relação à sua atividade citolítica, ela ainda é estudada, e algumas pesquisas demonstram a lise de células infectadas pelo parasita mediada por linfócitos T CD8+ (Nickell et al, 1993).

Adicionalmente, outras metodologias tem auxiliado o entendimento dos mecanismos efetores da resposta imune ao *T. cruzi*.

Pelo perfil de secreção de linfocinas foram recentemente classificadas duas subpopulações de células T CD4+, denominadas Th1 (secreção de IL-2, IFN  $\gamma$ , linfotoxina) envolvida principalmente na resposta imune mediada por células, e Th2 (secreção de IL-4, IL-5, IL-10) envolvidas na resposta imune humoral (Mosmann e Coffman, 1989).

Trabalhando com linhagens clonais de células T murina de C57Bl/6 que reconhecem especificamente antígenos expressos por tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y), Nickell et al (1993) caracterizaram, através de ensaios de transferência de proteção

adotiva, que o potencial imunoprotetor foram de células Th1, verificado pela sua secreção de linfocinas, também constatado por Reed et al (1994).

Com o auxílio de uma linhagem de células CD4 de linfonodo com características de células TH2, foi demonstrado que a sua transferência passiva para camundongos normais induziu uma ativação policlonal em células B e resposta policlonal IgG2a e IgG2b, que foi similar àquela observada em camundongos infectados cronicamente. Essa ativação foi possível também com o sobrenadante dessas células que continha principalmente IL-4, IL-5, IL-3 e IL-6, porém com níveis não significativos de IFN- $\gamma$  e IL-2 (Spinella et al, 1990). Outra conseqüência da infecção, como hipergamaglobulinemia, supõe-se resultar de células T tipo Th2 originalmente derivado de camundongo infectado por *T. cruzi* (Spinella et al, 1990), e pode ser responsável pelo fenômeno de autoimunidade já descrito (Ribeiro do Santos et al, 1991).

A participação da linfocina IFN- $\gamma$  também foi abordada conjuntamente com a IL-10 em experimentos mostrando que somente a depleção dessas duas linfocinas por tratamento com anticorpos monoclonais restauravam a resposta proliferativa inibida de timócitos à concanavalina A de camundongos C57Bl/6J infectados com a cepa CL de *T. cruzi* (Leite de Moraes et al, 1994). Uma vez que a depleção de IL-10 aumenta os níveis de IFN- $\gamma$  (Leite de Moraes et al, 1994), torna-se difícil estabelecer o controle preferencial, se existir, pelos linfócitos Th1 ou Th2.

De forma geral, através de todos esses trabalhos fica demonstrado claramente a participação da imunidade humoral e celular nos mecanismos de resistência ao *T. cruzi*, assim como a importância do sistema imunológico na patogenia da Doença de Chagas.

Entretanto, na pesquisa experimental utilizando modelos animais, fatores vinculados à genética dão continuidade à melhor compreensão da relação parasita-hospedeiro, e de como nela a patogenia se manifesta.

## OS ESTUDOS EM DIFERENTES MODELOS EXPERIMENTAIS

As observações tão diversificadas e até contraditórias relatadas por pesquisadores do mundo inteiro relacionadas à Doença de Chagas podem ser reflexos das condições experimentais que ainda não estão padronizadas. Essa padronização inicia-se na escolha de modelos de animais experimentais com flora conhecida (SPF) (FINEP). Outro ponto a ser padronizado é a cepa utilizada e as condições de sua manutenção, que vai desde a escolha do animal de repique, inclusive seu sexo, até o número de passagens do repique que será utilizado. Mais especificamente tem sido estudado a possibilidade de fazer a clonagem de protozoários no intuito de termos em mãos parasitas monoclonais resistentes ou susceptíveis (Teixeira, 1987).

O 'background' genético do hospedeiro e do parasita são importantes no desenvolvimento de várias doenças. As influências genéticas específicas são talvez de maior significância, ainda que os mecanismos não imunológicos de resistência aos protozoários possam não ser relacionados aos operantes na resposta imunológica específica. Além do mais, pode ser também que as diferenças das espécies de tripanossomas *Trypanosoma lewisi* (somente em rato) e o *Trypanosoma musculi* (em camundongo) (Teixeira, 1987) sejam de alguma forma desenvolvimentos sutis de influências genéticas.

Trischmann (1978) estudou as diferentes susceptibilidades à infecção pelo *T. cruzi* (cepa Brazil) de 9 linhagens de camundongos (C57Bl/10, DBA/1, SJL, BALB/c, CBA, AKR, C3H/He, DBA/2 e A) tentando verificar se existe relação entre o grau de resistência à cepa Brasil de *T. cruzi* e alguma população de células linfóides em particular. Foi verificado que a linhagem C3H, altamente susceptível, desenvolvia alta parasitemia e morria de infecção, enquanto que a C57Bl/10, resistente, desenvolvia baixa parasitemia e sobrevivia. A inabilidade do parasita penetrar na célula hospedeira ou se multiplicar intracelularmente foi descartada pois a linhagem C57Bl/10 desenvolvia parasitemia semelhante, tanto após depleção de macrófagos e linfócitos, como após a esplenectomia.

Adicionalmente foram conduzidos experimentos sobre genes Ir, do locus H2, nas 9 linhagens estudadas e nenhuma correlação e conclusão foi feita. Verificando

linhagens H-2 congênicas de camundongos (geneticamente idênticos, porém diferindo na região H-2) eles puderam constatar que a resistência era associada ao 'background' genético do camundongo ao invés de seu haplótipo H-2 (Trischman e Bloom, 1982).

Experimentos comparativos entre BALB/C (resistente) e BALB/C geneticamente atímico nu/nu (susceptível) mostraram que, ao passo que os BALB/C mostravam baixa parasitemia, os nu/nu tiveram uma alta parasitemia, sugerindo um importante papel da imunidade celular associada à células T no controle da parasitemia (Trischman e Bloom, 1982).

Estudos sobre a genética da resistência enfocaram a influência dos locus H-2 de haplótipo *k* na susceptibilidade da linhagem de camundongos C3H/An, e do haplótipo *b* na resistência da linhagem C57Bl/10 verificadas pela taxa de mortalidade na infecção pelo *T. cruzi* (Trischman e Bloom, 1982).

Outros experimentos comprovaram que linhagens de camundongos que expressam um "background" genético de C57Bl/10 e o haplótipo H-2 d, q ou y2 são resistentes à infecção pela cepa Brazil de *T. cruzi*, enquanto aqueles que expressam o haplótipo H-2<sup>k</sup> são susceptíveis (Powell e Wasson, 1993).

Em experimentos com híbridos F2 (C3H/AnxC57Bl/6) foi verificado que eles eram mais resistentes que os parentais, sendo que os animais de haplótipo H-2<sup>b</sup> e H-2<sup>k/b</sup> eram mais susceptíveis que aqueles de haplótipo H-2<sup>b</sup>. O cruzamento entre duas linhagens susceptíveis C3H/n e A/J originou a prole F1 mais resistentes que os parentais. Quando se cruzaram as duas linhagens resistentes DBA/J e C57Bl/6J foi observado 100% de sobrevivência em F1 e 99% em F2. Isso é muito curioso pois o estado heterozigoto do F1 não ocorre totalmente em F2, sugerindo que diferentes genes afetam a resistência nessas linhagens parentais (Trischman e Bloom, 1982).

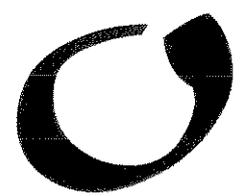
A resistência e susceptibilidade também foi estudada nas linhagens murinas C3H, C57Bl/10 e F1(C3HxC57Bl/10) infectados com *T. cruzi* com base na resposta frente a mitógenos Con-A e LPS. Não pôde ser correlacionada a resposta linhagem de camundongos com a resistência ao parasita pois foi observada uma redução na resposta proliferativa em ambas as linhagens, inclusive em F1. Quando se fez o teste da produção de anticorpos anti eritrócitos de carneiro, medida por PFC, as linhagens susceptíveis C3H, A/J e Balb/C mostraram uma inibição da reação, ao passo

que as linhagens resistentes B10Br, C57B/10, SJL e F1(C3hxC57Bl/6) não apresentaram inibição da reação, pelo contrário, até apresentaram um aumento na resposta do PFC, indicando que existe um grau genético diferencial nessas linhagens (Tanowitz et al, 1963).

Em experimentos relacionados à resistência foi verificado a habilidade de fatores liberados por células do baço de animais infectados com *T. cruzi* na ativação de macrófagos em estado tripanocida, visualizado em microscopia ótica pela interiorização do parasita por esse tipo celular. Os fatores liberados por esplenócitos das linhagens resistentes C57B/10 e Balb/C mostraram maior poder de ativação que as linhagens susceptíveis C3H/He e A/J. A mortalidade também foi monitorada frente a cepa Y e CL, sendo que as linhagens CBA/J, Balb/C, C3H/He tiveram 100% de mortalidade enquanto que a linhagem C57Bl/10 foi de 20% e 50% respectivamente para as cepas Y e CL (Nogueira et al, 1981).

Linhagens de camundongos foram divididas de acordo com a sua parasitemia. Desse modo, as linhagens susceptíveis C3H/HeJ, Balb/C e CBA/N foram as que apresentaram maior número de parasitas no sangue e foram denominadas linhagens de alta parasitemia. As linhagens de baixa parasitemia incluíram C57Bl/6 e DBA/2J. Experimentos com F1 híbridos provenientes do acasalamento de várias linhagens (C57Bl/6J, DBA/2J, BALB/cJ, C3H/HeJ e CBA/N) mostraram que a baixa parasitemia era hereditária, sugerindo que esse grau de resistência é dominante (Wrightsmann et al, 1982).

Portanto, pode ser verificado que estudos abordando o envolvimento dos genes do CHP, produção de anticorpos, fenômenos imunológicos celulares e outros, estão sendo relacionados com o grau de resistência/susceptibilidade observada em diferentes linhagens de camundongos, e estão merecendo estudos cada vez mais profundos. Provavelmente esses estudos terão importância crucial na padronização dos resultados dos experimentos de infecção pelo *T. cruzi*, que hoje se apresentam como uma grande heterogeneidade de resultados conflitantes.



bjetivo

## Objetivo

Nosso trabalho pretende dar continuidade aos estudos do Fenômeno da Resistência Precoce reportando por Camargo et al (1989). Baseado nas informações revistas, nossa proposta é estudar as infecções provocadas por estoques de *Trypanosoma cruzi* mantidos em camundongos (estoque TS) ou em cultura celular (estoque TC) com a finalidade de verificar possíveis mecanismos imunológicos diferenciais que culminam na indução da resistência precoce.

Esse estudo comparativo aborda a taxa de mortalidade e o curso parasitêmico decorrente da infecção pelos dois estoques do parasita. Os experimentos serão realizados paralelamente em diferentes linhagens de camundongos para verificar a influência da variabilidade genética e destacar a importância da escolha do modelo experimental. Analisamos também as subpopulações de células T CD4+ e T CD8+ do baço e linfonodo poplíteo de animais com 24, 48 e 72 hs de infecção pelos estoques TC e TS, correspondente ao período de indução do Fenômeno de Resistência Precoce, para verificar se os estoques TC e TS provocam supressão ou ativação diferencial que possa ser 1) relacionada com a resistência conferida pelo estoque TC, 2) e observada em animais imunizados com o estoque TC e desafiados com o estoques TS. Essa análise será feita com o auxílio da técnica de imunoperoxidase, e será quantitativa, através da contagem percentual das subpopulações de linfócitos T, e demonstrativa, através da revelação da localização das subpopulações em cortes de tecido criopreservados.



aterial e métodos

# Material e métodos

## 1. ANIMAIS

Em todos os experimentos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) isogênicos, fêmeas, com 2-3 meses de idade, SPF, obtidos do CEMIB/UNICAMP, sob a supervisão do Controle Sanitário do CEMIB/DMI-UNICAMP, e mantidos no Departamento de Imunologia em isoladores tipo Texler. A marcação individual dos animais mantidos na mesma caixa foi feita através do corte dos pêlos em diferentes regiões do corpo.

As linhagens de camundongos utilizadas foram C57Bl/6J, A/J, BALB/cJ e CBA/J.

## 2. *Trypanosoma cruzi*

### CEPA Y E ESTOQUES UTILIZADOS

A cepa de *T. cruzi* utilizada nos experimentos foi a Y (Pereira e Nusseberg, 1953), originário de humanos com doença crônica (Krettl, 1979). O estoque original Y foi obtido do Laboratório do Dr. Zigman Brener de Belo Horizonte em 1972 e foi mantida em repiques semanais em camundongos Swiss. O estoque denominado Y<sub>2</sub> foi cedido pela Dra. Tereza Kipnis da USP e mantido em repiques semanais em camundongos CBA/J e mantido por passagem seriada em camundongos

em isoladores no DMI-UNICAMP.

## MANUTENÇÃO DOS ESTOQUES

### ESTOQUE TC

Denominamos de estoque TC (tripanossoma de cultura) os tripomastigotas do estoque Y<sub>2</sub> mantido em cultura de células LLC-MK2 (Camargo et al, 1991).

Os protozoários do estoque TC foram mantidos *in vitro*, em cultura de células LLC-MK2, em meio RPMI com 10% de SBF, L-glutamina, antibióticos e hepes, em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37°C. A troca do meio de cultura (repique) foi feito a cada 7-14 dias.

Para obtenção do estoque TC, o sobrenadante dos frascos de cultura das células infectadas foram centrifugadas durante 20 minutos a 3.000 rpm a 4°C. O material foi ressuspenso e lavados 3 vezes em PBS-glicose, e a concentração, em tripomastigotas/ml, a contagem foi determinada em câmara de Neubauer.

### ESTOQUE TS

Denominamos de estoque TS (tripanossoma de sangue) os tripanossomas provenientes de sangue de CBA/J infectados com a cepa Y<sub>2</sub>.

Os protozoários do estoque TS foram mantidos *in vivo* através da transferência semanal do sangue infectado contendo 10<sup>5</sup> tripomastigotas em camundongos CBA/J, de ambos os sexos, 2-3 meses de idade. O sangue foi obtido pela sangria total pelo plexo axial e coletado em frasco contendo 200µl de solução anticoagulante citrato de sódio/animal sangrado.

A contagem dos parasitas foi feita através do depósito de 5µl de sangue em lâmina/lamínula, contando-se o número de parasitas em 20 campos e multiplicando o total por 3x10<sup>4</sup> tripomastigotas/ml (Brenner, 1962).

## INFECCÃO

Os animais foram infectados intramuscularmente (na coxa) com inóculo da quantidade de parasitas requerida, em 100µl de solução salina tamponada, obtidos de doador infectado (sangue contendo parasitas do estoque TS) ou da cultura celular (solução contendo parasitas do estoque TC), sendo os animais controles (C) inoculados com 100 µl de solução salina.

Quando coletamos linfonodos, denominamos de linfonodo homolateral aquele situado próximo da região onde foi inoculado parasitas ou solução salina. Quando inoculamos ambos estoques, denominamos de linfonodo homolateral aquele próximo ao local onde foi inoculado parasitas do estoque TS e de linfonodo contralateral o localizado próximo à inoculação do estoque TC.

### **3. INDUÇÃO DO FENÔMENO DE RESISTÊNCIA PRECOCE EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM CBA/J**

Com a finalidade de reproduzir os resultados obtidos por Camargo et al (1989) relacionados com a indução do Fenômeno de Resistência Precoce, camundongos fêmeas da linhagem CBA/J foram imunizadas com  $10^5$  formas do estoque TC, e desafiadas 72 hs após com  $10^5$  formas de TS,

### **4. DETERMINAÇÃO DA TAXA DE MORTALIDADE NAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS A/J, BALB/CJ E C57BL/6J INFECTADOS PELOS ESTOQUES TS OU TC**

INFECCÃO POR  $10^5$  FORMAS DE TRIPOMASTIGOTAS DOS ESTOQUES TC OU TS.

Com o intuito de determinar o efeito da administração de  $10^5$  tripomastigotas do estoque TC e do estoque TS no perfil de mortalidade, camundongos das linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J foram infectados e foi observada a taxa de mortalidade por 30 dias.

INFECCÃO COM OUTRAS DOSES DOS ESTOQUES DE TC OU TS

Camundongos da linhagem A/J foram infectados com as concentrações equivalentes a  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^4$  tripomastigotas/animal do estoque TC. A linhagem BALB/cJ foi inoculada com  $10^2$  e  $10^3$  tripomastigotas/animal do estoque TC.

A determinação da taxa de mortalidade provocada por diferentes doses do estoque TS também foi feita nas mesmas linhagens a fim de comparar o potencial letal dos dois estoques. Dessa maneira, na linhagem A/J foi inoculada a dose correspondente a  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  tripomastigotas/animal; e na linhagem BALB/cJ a dose de  $10^3$  e  $10^4$  tripomastigotas/animal. Os animais ficaram em observação por 30 dias e as mortes foram expressas em porcentagem.

##### **5. DETERMINAÇÃO DA CURVA PARASITÊMICA NAS LINHAGENS DE CAMUNDONGOS A/J, BALB/cJ E C57Bl/6J INOCULADOS COM $10^5$ PARASITAS DOS ESTOQUES TC E TS**

Camundongos das linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J foram inoculados com  $10^5$  formas dos estoques TC ou TS para determinação da curva parasitêmica.

A contagem diária e individual foi feita pelo método de Brenner (1980) no período de 30 dias, com a obtenção de  $5\mu\text{l}$  do sangue coletado do corte feito na

extremidade distal da cauda dos camundongos e depositado entre lâmina e lamínula. A contagem foi feita em 20 campos em M.O. comum.

## **6. DETERMINAÇÃO DO EFEITO DO INÓCULO DE 10<sup>5</sup> PARASITAS DO ESTOQUE TS EM CAMUNDONGOS DAS LINHAGENS A/J E BALB/cJ PREVIAMENTE IMUNIZADOS 10<sup>5</sup> PARASITAS DO ESTOQUE TC (TC+TS)**

Para verificar a interferência da estimulação com parasitas do estoque TC no perfil de mortalidade provocado pela infecção pelo estoque TS, camundongos das linhagens A/J e BALB/cJ foram inoculados com 10<sup>5</sup> formas do estoque TC e depois de 24h, 48 ou 72hs eles foram desafiados com 10<sup>5</sup> formas do estoque TS. Observamos a mortalidade por 30 dias.

## **7. IMUNOHISTOQUÍMICA**

### **DIVISÃO DOS GRUPOS DE INFECÇÃO EXPERIMENTAL PARA PREPARO DO ENSAIO IMUNOHISTOQUÍMICO**

Para o estudo das populações celulares de órgãos linfóides de camundongos das linhagens A/J e BALB/cJ durante a fase inicial da infecção por estoques TC e TS de *T. cruzi*, os camundongos foram infectados com 10<sup>5</sup> formas do parasita para retirada dos órgãos. Foram analisados três grupos experimentais: animais com 24h, com 48h e com 72h de infecção

Nesses três dias, foram retirados o baço e os linfonodos poplíteos, homolateral e contralateral, para preparo de suspensão celulares ou cortes histológicos de tecidos criopreservados, e a caracterização das subpopulações de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi feita através do método de imunoperoxidase.

## ANTICORPOS MONOCLONAIS E HIBRIDOMAS UTILIZADOS

Para identificação das populações de linfócitos do baço e dos linfonodos poplíteos com base nas glicoproteínas de superfície, foram utilizados os clones de hibridomas secretores de anticorpos contra os seguintes marcadores (ver apêndice 1).

### ANTICORPOS MONOCLONAIS ANTI-MARCADORES MURINOS (mAb)

mAb	origem	subclasse	especificidade	subpopulação de células T
GK 1.5	rato	IgG2b	L3T4a	CD4
YTS 169	rato		LyT2	CD8

### ASCITE

Utilizamos camundongos nude (C57Bl/6) de 2-3 meses de idade, para obtenção do ascite das linhagens de hibridomas produtoras de anticorpos monoclonais. O primeiro passo foi a inoculação de 0,5 ml de óleo mineral (NUJOL) intraperitonealmente e, após 1 semana, foi feita a inoculação de  $1 \times 10^7$  células do hibridoma a ser expandido. A coleta foi feita após 2 semanas com a formação do ascite, retirando os animais do isolador e introduzindo uma agulha na cavidade peritoneal do animal, deixando o fluido ascítico escorrer. Na coleta final, para total aproveitamento, fizemos a sangria total do animal e combinamos o soro com o ascite. A seguir foi feita a centrifugação por 10 minutos 3.000g.

O ascite do hibridoma GK 1.5 foi utilizado na diluição de 1:1000, e o ascite do hibridoma YTS 169 na diluição de 1:2000.

### PREPARO DOS ÓRGÃOS PARA SUSPENSÕES CELULARES E PARA CORTES HISTOLÓGICOS

## LÂMINAS

Foram utilizadas lâminas para microscopia não lapidadas, com a extremidade fosca, de 26x76 mm X 1,2 A 1,4mm (Perfecta Ind. e Com. de Lâminas de Vidro LTDA - SP).

As lâminas foram cobertas com uma película de gelatina através de banho em gelatina 1% 37°C e posterior secagem por 2h à temperatura de 70°C.

## PREPARO DAS SUSPENSÃO DE CÉLULAS

Os órgãos foram coletados em tubos de ensaio contendo 5 ml de solução salina glicosada FAZEKAS, pH7, contendo 10% de SBF, mantidos em banho de gelo, macerados e centrifugados a 1.200 rpm por 10 minutos.

As hemácias foram lisadas com 7 ml de HANKS hemolítico/animal por 10 minutos em banho maria 37°C. As células foram lavadas 3 vezes em PBS contendo 10% de SBF. A concentração foi acertada pela contagem em câmara de Newbauer para  $5 \times 10^4$  células/ml. Aliquotas de 100µl dessa solução foram depositadas na citocentrífuga perfazendo  $5 \times 10^3$  células totais distribuídas em cada na lâmina.

## CORTES DE TECIDOS CONGELADOS

Os órgãos foram coletados com as precauções necessárias para manutenção da sua integridade estrutural, colocados imediatamente em cápsula contendo 1ml de Tissue-tek, e foram colocados em recipiente contendo N-hexano. Esse por sua vez estava mergulhado em nitrogênio líquido ( $N_{2liq.}$ ). Esse procedimento foi utilizado para evitar o choque de temperatura dos órgãos diretamente com o  $N_{2liq.}$ . Seguiu-se o armazenamento em freezer -70 °C até o momento do processamento (Henderson et al, 1981).

Os órgãos foram então seccionados em criostato a -20 °C para obtenção de cortes de 5 a 7 micras de espessura (Henderson et al, 1981).

Foram utilizados 3 animais por grupo de infecção, e de cada órgão foram feitos 10 lâminas para obtenção de duplicatas das reações de imunoperoxidase correspondente a cada anticorpo monoclonal. Em cada lâmina foi coletado de 4 a 8 cortes de tecido.

## FIXAÇÃO E ESTOCAGEM

Primeiramente foi feita uma delimitação da área com uma caneta de silicone (PAP-PEN) para evitar que os reagentes escorressem pela lâmina e para garantir uma quantidade similar cobrindo os cortes ou células.

Tanto as lâminas com cortes de tecidos como aquelas com suspensão de células foram deixadas para secar por 1 hora à temperatura ambiente antes da fixação para evitar rachaduras nesse processo. A fixação foi feita por 10 minutos com acetona absoluta -20°C.

A estocagem do material foi feita em freezer -70°C baseados em estudos de Henderson et al (1981) que sugerem o tempo de estocagem por 7 a 14 dias (-70 °C) avaliado pelo acompanhamento das mudanças enzimáticas. Os autores complementam que a manutenção de secções congeladas no criostato por 24 horas não afeta a atividade enzimática.

## TÉCNICA DE IMUNOPEROXIDASE

O método utilizado denomina-se ABC ou avidina-biotina-peroxidase (imunoperoxidase). Essa técnica pode ser aplicada em amostras de células (Bergroth et al, 1980) ou secções de tecidos congelados (Henderson et al, 1981), e foi utilizada para a caracterização das populações de células T CD4 e T CD8 de órgãos linfóides de camundongos infectados com  $10^5$  formas dos estoques TC, TS ou TC+TS.

O método iniciou-se com o descongelamento do material em estudo (cortes de tecido ou célula em lâminas armazenadas em freezer) à temperatura

ambiente por 10-15 minutos. Seguiu-se a rehidratação com 100µl de PBS contendo 0,1% de tween 20 por 5 minutos.

Em seguida foi feito o bloqueio (PBS contendo 0,1% de tween 20, 5% de leite desnatado e 20% de SBF) por 30 minutos. A lâmina não foi lavada, apenas foi retirado o excesso. Em nosso trabalho foi utilizado 100µl/lâmina de solução bloqueio

Foi adicionado a seguir 100µl do Ac primário anti CD4 e anti CD8 provenientes de ascites ou soro de camundongo normal no caso do controle, seguindo-se a incubação "overnight" em câmara úmida a 4 °C.

Após esse procedimento foi feita a lavagem das lâminas, com os cortes ou células, por 5 minutos em cubeta com PBS contendo 0,1% de tween 20, lavados duas vezes com PBS contendo 0,1% de tween 20 e 5% de leite desnatado, seguido da adição de 100µl/lâmina de anti Ig de rato produzido em coelho, biotilado (kit DAKO), diluído em PBS contendo 1% de BSA na diluição de 1:500 e incubadas por 1 hora em câmara úmida em temperatura ambiente.

As lâminas foram novamente lavadas por três vezes seguidos da adição de estreptoavidina-peroxidase biotilada (kit DAKO) na diluição de 1:2000.

Após a incubação por 1 hora em câmara úmida à temperatura ambiente a revelação foi feita com solução tampão Tris-HCL pH 7,2, contendo 0,1% de 3-3 diaminobenzidina e 0,03% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. O final da revelação foi definido observando a intensidade da coloração marrom no microscópio ótico.

A contracoloração consistiu em mergulhar os cortes ou células por 1 minuto em hematoxilina, retirando o excesso com água.

## CÁLCULO DA PORCENTAGEM CELULAR

A porcentagem das subpopulações das suspensão celulares de baço e linfonodos poplíteos foram determinadas pela contagem de 7 campos aleatórios que continham de 300 a 500 células.

Para análise estatística dos resultados de subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 foi utilizado o teste t de Student, com n=3 e 0,  $\alpha=0.5$ , Tc=2.57 e  $0.01 < p < 0.02$ .

## MATERIAL FOTOGRÁFICO

Os cortes foram fotografados em M.O comum ZEISS acoplado com uma câmara fotográfica no DMI-UNICAMP.



resultados

# **R**esultados

## **1. INDUÇÃO DO FENÔMENO DE RESISTÊNCIA PRECOCE EM CAMUNDONGOS DA LINHAGEM CBA/J**

A fim de reproduzir o Fenômeno de Resistência Precoce em camundongos da linhagem CBA/J, inoculamos  $10^5$  formas do estoque TC e 72 hs depois desafiámos com  $10^5$  formas do estoque TS. Nesse experimento verificamos que os camundongos inoculados com o estoque TC tiveram uma sobrevida de 100%, enquanto que todos animais inoculados com o estoque TS morreram antes do 12º dia. Entretanto, os animais que receberam imunização prévia com o estoque TC foram protegidos contra o desafio com a dose letal do estoque TS.

## **2. Determinação da Taxa de Mortalidade na infecção por estoques sangüícolas (TS) e de cultura (TC) de *T. cruzi* nas linhagens de camundongos A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J**

Com o intuito de determinar o grau de virulência dos estoques TC e TS, inoculamos diferentes doses em camundongos das linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J, e acompanhamos a mortalidade durante 30 dias.

## RESULTADO DA TAXA MORTALIDADE DURANTE A INFECÇÃO PELO ESTOQUE TC

### LINHAGEM A/J

O Gráfico 2 apresenta a taxa de mortalidade da linhagem A/J inoculada com o estoque TC. Não foi observada mortalidade em camundongos da linhagem A/J nas infecções correspondentes à inoculação do estoque TC nas doses de  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  parasitas. Porém ocorreu uma mortalidade de 22% quando a dose de inoculação foi de  $10^5$  parasitas.

### LINHAGEM BALB/cJ

Não houve mortalidade em camundongos da linhagem BALB/cJ inoculados com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^5$  parasitas.

### LINHAGEM C57Bl/6J

Como os camundongos da linhagem C57Bl/6J são considerados resistentes à cepa Y do *T. cruzi*, inoculamos apenas  $10^5$  formas do estoque TC. Observamos 100% de sobrevivência com essa dose de inoculação.

## RESULTADO DA TAXA DE MORTALIDADE NA INFECÇÃO PELO ESTOQUE TS

### LINHAGEM A/J

O Gráfico 3 apresenta a porcentagem de sobrevivência da linhagem A/J com diferentes doses do estoque TS. Pode ser observado que a dose de  $10^5$  parasitas teve efeito letal, eliminando 100% da população de camundongos. As doses correspondentes a  $10^1$ ,  $10^2$  e  $10^3$  eliminaram 60-70% dos animais, porém diferiram no período no qual ocorreram as mortalidades.

### LINHAGEM BALB/cJ

O Gráfico 4 apresenta a porcentagem de sobrevivência da linhagem BALB/cJ com diferentes doses do estoque TS. Observamos que apenas a dose de  $10^5$  parasitas foi capaz de eliminar 100% da população. As doses correspondentes a  $10^3$  e  $10^4$  parasitas eliminaram 20%.

### LINHAGEM C57Bl/6J

Inoculamos as doses de  $10^4$  e  $10^5$  parasitas do estoque TS em camundongos da linhagem C57Bl/6J. O Gráfico 5 mostra que 100% dos camundongos inoculados com  $10^4$  e 70% inoculados com  $10^5$  sobreviveram mais que 30 dias. Entretanto não pudemos observar a letalidade desse estoque nessa linhagem pois o sangue obtido de camundongos CBA/J utilizados em repiques não fornecia uma quantidade maior que  $10^6$  parasitas/ml. Nesse caso poderíamos utilizar uma droga imunossupressora, como o ciclofosfamida, porém correríamos o risco de trabalhar com formas defeituosas de protozoários, como tem sido constatado por laboratórios que utilizam a imunossupressão em repiques.

### 3. EFEITO DO INÓCULO DE $10^5$ FORMAS DO ESTOQUE TS EM ANIMAIS DAS LINHAGENS A/J E BALB/cJ IMUNIZADOS COM $10^5$ FORMAS DO ESTOQUE TC

Com a finalidade de verificar a influência da imunização com o estoque TC no perfil de mortalidade de animais das linhagens A/J e Balb/C infectados pelo estoque TS conduzimos experimentos similares à indução fenômeno de resistência precoce em camundongos CBA/J, inoculando  $10^5$  formas do estoque TC e desafiando depois de 24, 48 e 72 horas com  $10^5$  formas do estoque TS.

#### LINHAGEM A/J

Pôde ser observado que, com relação à mortalidade da linhagem A/J provocada por  $10^5$  formas do estoque TS, a imunização conferida pelo estoque TC (Gráfico 6) provocou um aumento na sobrevivência, que passou de 45,3 para 100% no 9º dia e de 0% para 8% no 14º dia, até atingir 100% de mortalidade no 24º.

Observa-se também que a mortalidade de animais inoculados com o estoque TS que iniciava no 7º dia sofre um retardamento para começar apenas no 10º dia.

#### LINHAGEM BALB/cJ

Pode ser observado no Gráfico 7 que a imunização prévia com o estoque TC alterou a taxa de mortalidade provocada pelo estoque TS. A infecção provocada pela infecção por  $10^5$  formas do estoque TS matou 100% dos camundongos. Entretanto quando fizemos a imunização prévia com  $10^5$  formas do estoque TC (TC+TS) a mortalidade foi de 40%. O declínio de sobrevivência compreendido entre os 9º e o 23º dias em animais inoculados somente com o estoque TS desapareceu quando fizemos a imunização prévia com estoque TC, passando a apresentar um platô que se manteve constante, restando até o 30 dia ainda 57,4% da população viva.

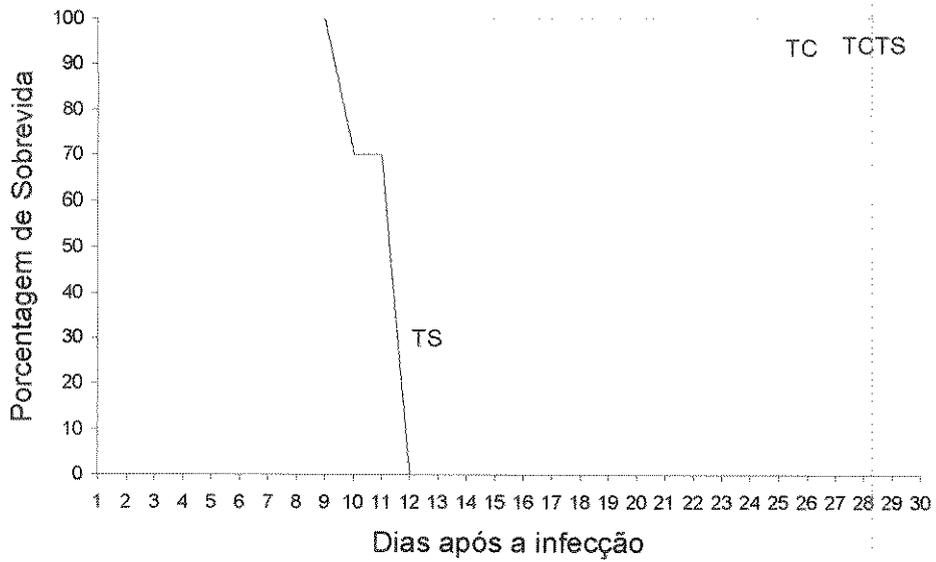


Gráfico 1 - Sobrevida de camundongos CBA/J inoculados com  $10^5$  formas do estoque TC, TS ou TC+TS.

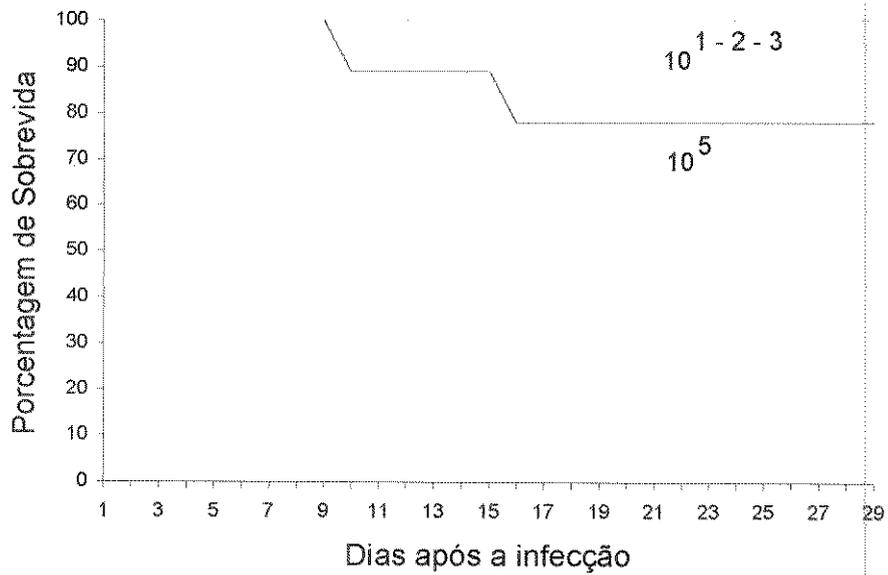


Gráfico 2 - Sobrevida de camundongos da linhagem A/J inoculados com  $10^1$ ,  $10^2$ ,  $10^3$  e  $10^5$  formas de TC

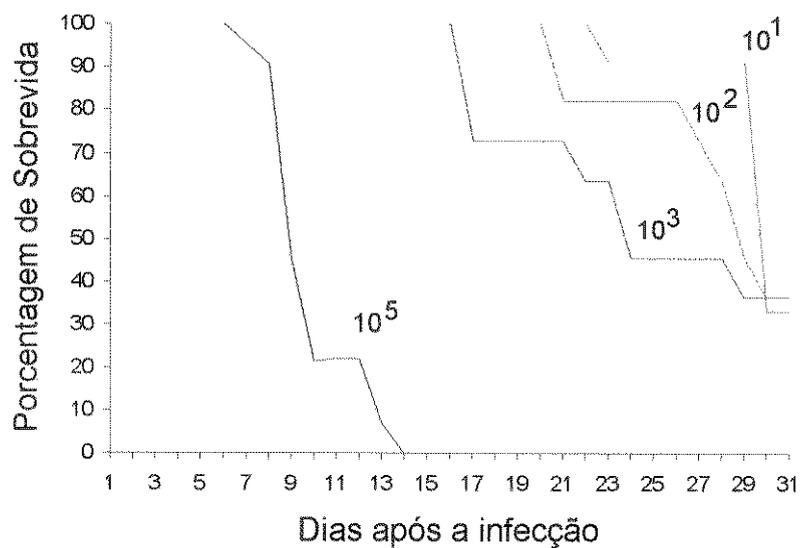


Gráfico 3 - Sobrevida de camundongos da linhagem A/J inoculados com diferentes doses de TS

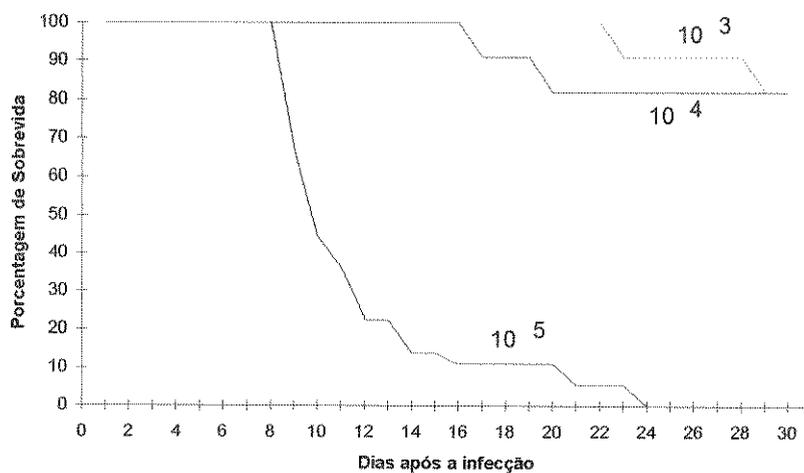


Gráfico 4 - Sobrevida de camundongos da linhagem BALB/cJ inoculados com diferentes doses de TS.

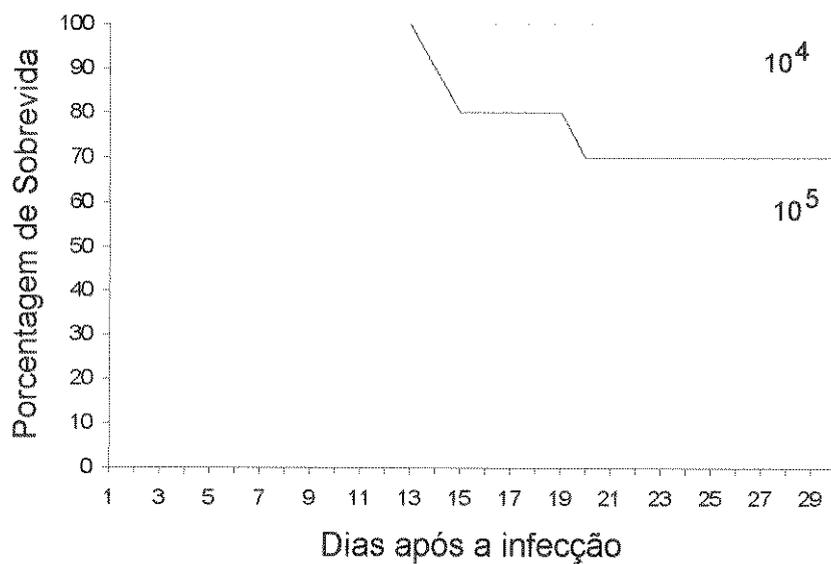


Gráfico 5 - Sobrevida de camundongos da linhagem C57Bl6/J inoculados com 10<sup>4</sup> e 10<sup>5</sup> formas de TS.

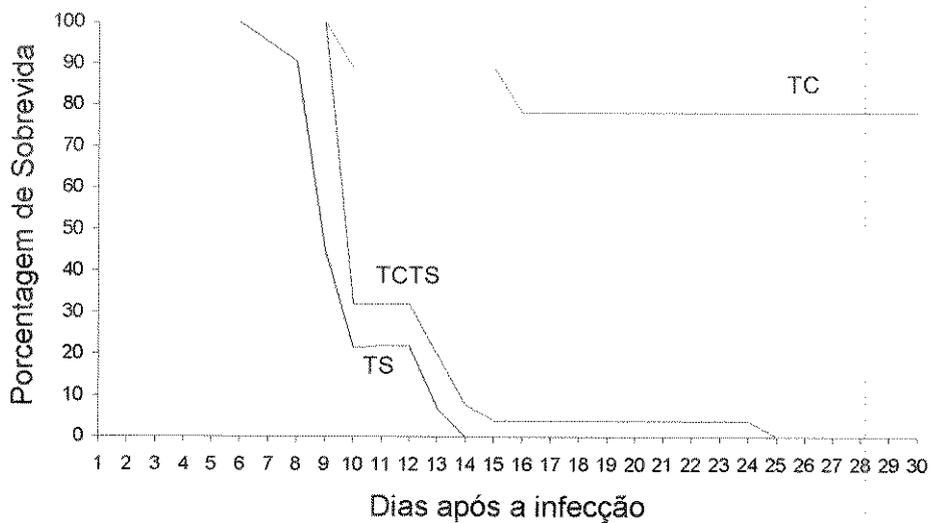


Gráfico 6 - Sobrevida de camundongos da linhagem A/J inoculados com  $10^5$  formas de TC e três dias depois inoculados com  $10^5$  formas de TS.

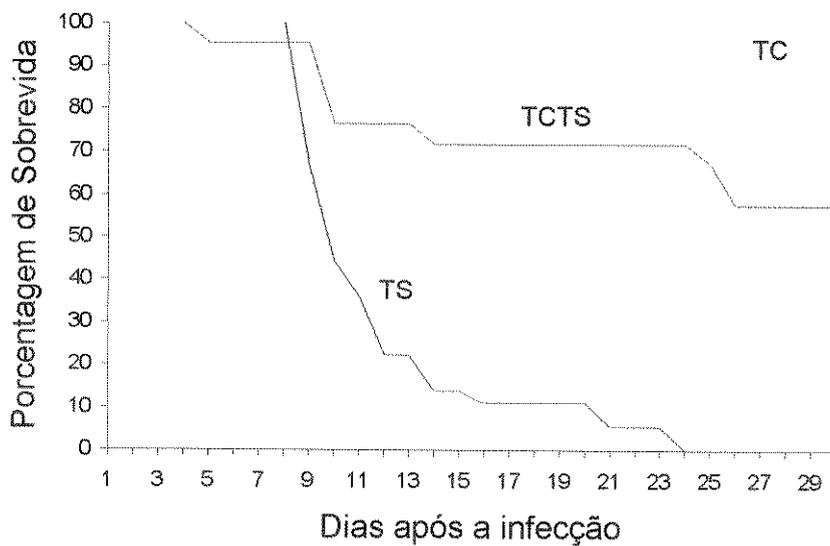


Gráfico 7 - Sobrevida de camundongos da linhagem BALB/cJ inoculados com  $10^5$  formas de TC e três dias depois inoculados com  $10^5$  formas de TS.

#### 4. PARASITEMIA DAS LINHAGENS A/J, BALB/cJ E C57Bl/6J INFECTADOS COM $10^5$ FORMAS DOS ESTOQUES TC OU TS

Os Gráficos 8 e 9 representam, respectivamente, os resultados da parasitemia em camundongos inoculados com  $10^5$  formas dos estoques TC ou TS, e mostram que esses estoques provocam diferentes resultados referentes ao dia do pico parasitêmico, quantidade de parasitas/ml de sangue e linhagem de camundongos utilizada como modelo experimental.

A análise da curva parasitêmica mostrou que de um modo geral a infecção pelo estoque TS provoca um pico de 4 a 5 vezes maior que o provocado pelo estoque TC nas linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J, respectivamente. Na linhagem de camundongos A/J o pico parasitêmico decorrente da infecção pelo estoque TC ocorreu no 9º dia ( $7,4 \times 10^4$  tripomastigotas/ml), na linhagem C57Bl/6J no 9º dia ( $1,7 \times 10^4$  tripomastigotas/ml) e na linhagem BALB/cJ o pico ocorreu no 7º dia ( $1,6 \times 10^5$  tripomastigotas/ml).

Os primeiros parasitas detectados no sangue de camundongos da linhagem A/J infectados com o estoque TS ocorreram no 6º dia, que também correspondeu ao pico parasitêmico equivalente a  $3,1 \times 10^5$  tripomastigotas/ml. Em camundongos da linhagem C57Bl/6J o pico parasitêmico durante a infecção pelo estoque TS também ocorreu no 6º dia e correspondeu a  $1,5 \times 10^5$  tripomastigotas/ml de sangue. Na linhagem BALB/cJ infectada com o estoque TS, os primeiros parasitas foram detectados a partir do 6º dia, e a infecção apresentou 3 picos: no 7º dia ( $1,3 \times 10^5$  tripomastigotas/ml), o no 12º dia ( $6,5 \times 10^5$  tripomastigotas/ml) e o maior pico no 17º dia ( $8,4 \times 10^5$  tripomastigotas/ml). Observamos que o pico parasitêmico na infecção pelo estoque TS ocorreu antes do pico observado na infecção pelo estoque TC, tanto na linhagem A/L como em BALB/cJ. Inversamente, na linhagem C57Bl/6J o pico parasitêmico na infecção pelo estoque TS ocorreu depois do pico na infecção pelo TC. Ao passo que o pico parasitêmico da infecção pelo estoque TS foi mais precoce (6º dia) do que o pico na infecção pelo estoque TC (9º dia) nas linhagens A/J e C57Bl/6J, a linhagem BALB/cJ infectada com o estoque TS apresentou um pico (18º dia) que foi tardio quando comparado à infecção pelo estoque TC (7º dia).

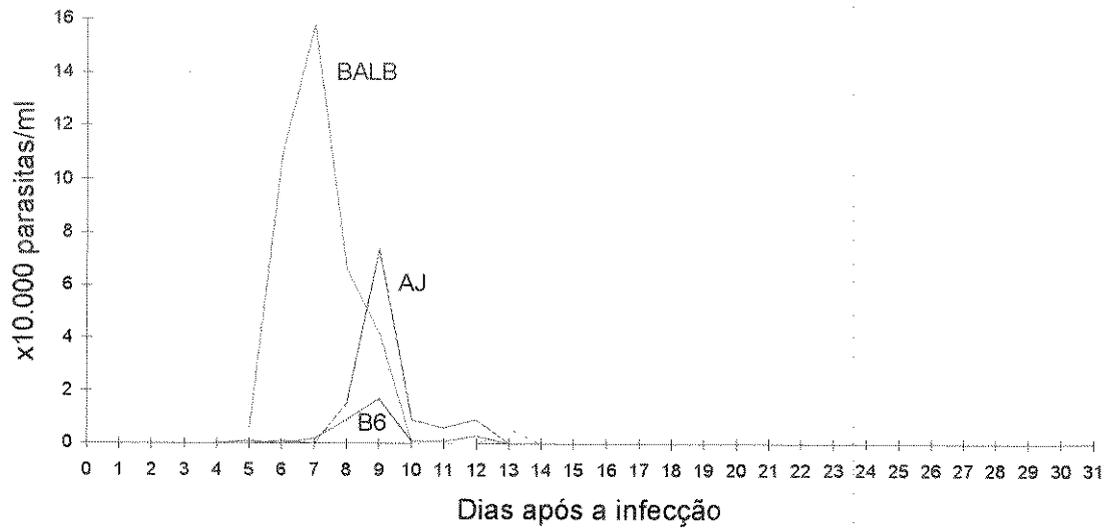


Gráfico 8 - Parasitemia de camundongos das linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J infectados com  $10^5$  tripomastigotas do estoque TC.

\*0% de mortalidade em todas as linhagens

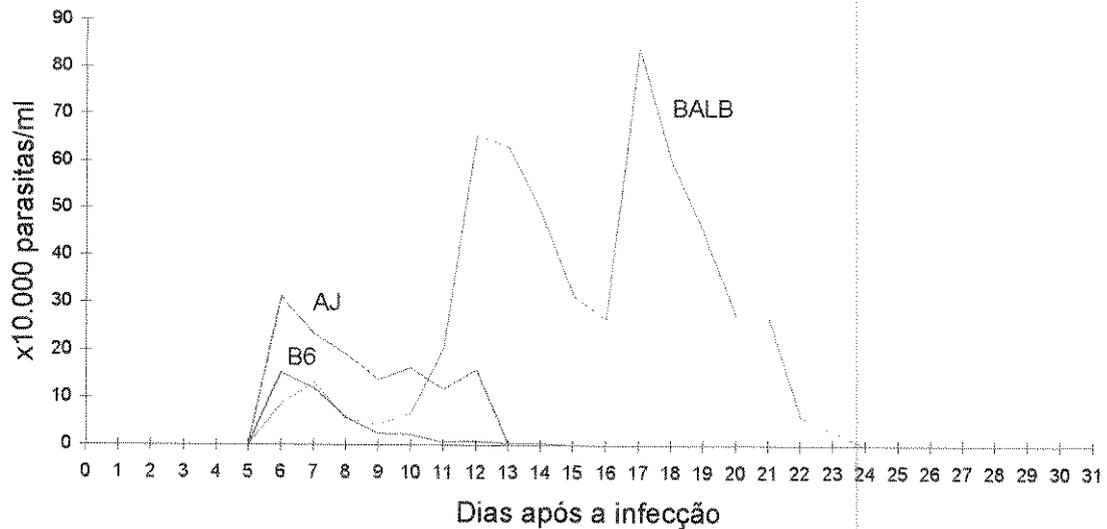


Gráfico 9 - Parasitemia de camundongos das linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J infectados com  $10^5$  tripomastigotas do estoque TS.

\*A/J = 100% mortalidade no 15º dia    \*\*BALB/cJ = 100% mortalidade no 24º dia

\*\*\*C57Bl/6J = 0% mortalidade

## 5. RESULTADOS DA PORCENTAGEM DE SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4 e T CD8 DE BAÇO E LINFONODO POPLÍTEO DE CAMUNDONGOS NORMAIS

As Fotografias 1a e 1b mostram o resultado da detecção de linfócitos T CD4 através da técnica imunoperoxidase.

### SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO BAÇO NORMAL

A Tabela 1 apresenta os valores percentuais de células positivas, com erro padrão médio, em relação às glicoproteínas CD4 e CD8, contadas em baço de camundongos das linhagens A/J e BALB/cJ normais.

Observamos que, enquanto a proporção de linfócitos T CD4/CD8 na linhagem BALB/cJ é equivalente a 1:1, a quantidade de linfócitos T CD4 na linhagem A/J é maior (1,5:1). Comparando entre linhagens, observamos que a porcentagem da população de linfócitos T CD4<sup>+</sup> é semelhante em relação a ambas linhagens, e a porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> é maior na linhagem BALB/cJ.

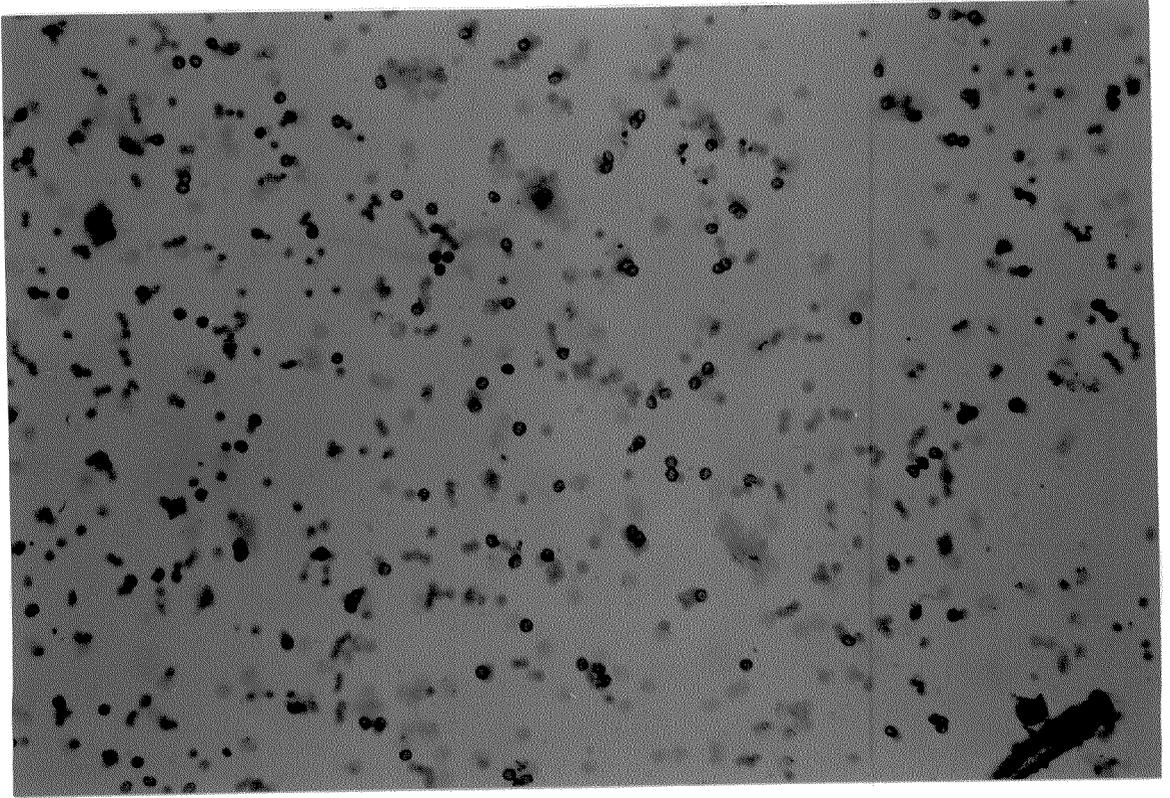
### SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO LINFONODO POPLÍTEO NORMAL

A Tabela 2 apresenta os valores percentuais com erro padrão médio de células positivas, em relação às glicoproteínas CD4 e CD8, observadas em linfonodos de camundongos das linhagens A/J e Balb/C normais.

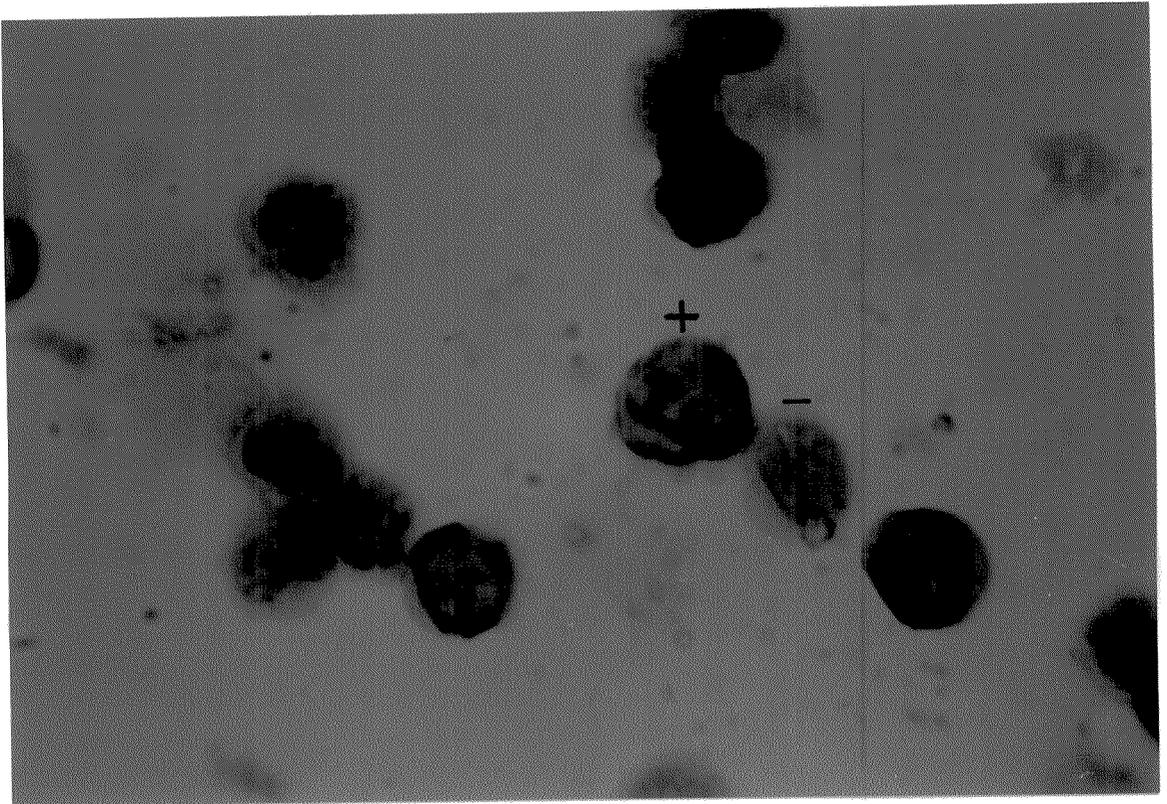
Observamos que a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> é mais elevada na linhagem A/J que na linhagem BALB/cJ.

Fotografia 1a. Reação de imunoperoxidase revelando linfócitos T CD4 em suspensão celular do baço de camundongos normais. x 20.

Fotografia 1b. Detalhe da Fotografia 1a mostrando 4 células reveladas pelo anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD4 (+) e 6 células de reação negativa (-).



FOTOGRAFIA 1a



FOTOGRAFIA 1b

TABELA 1

Linhagem	% T (CD4)	% T (CD8)
A/J	23,89 ± 1.69	15.89 ± 0.96
BALB/cJ	23.14 ± 1.05	25.06 ± 1.29

Porcentagens e erro padrão de linfócitos do baço de camundongos das linhagens A/J e BALB/cJ normais.

\* diferença estatisticamente significante,  $0.01 < p < 0.1$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $T_c = 2.57$  (teste *t*-student)

TABELA 2

Linhagem	% T (CD4)	% T (CD8)
A/J	44,53 ± 1.13	26.77 ± 2.59
BALB/cJ	38.47 ± 0.89	21.66 ± 1.97

Porcentagens e erro padrão de linfócitos do linfonodo poplíteo de camundongos das linhagens A/J e BALB/cJ normais.

\* diferença estatisticamente significante,  $0.01 < p < 0.1$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $T_c = 2.57$  (teste *t*-student)

Obs: Não houve a preocupação de separar os órgãos em homolateral e contralateral à inoculação do parasita pois testes prévios de inoculação de solução salina não demonstraram diferenças na porcentagem celular.

## 6. RESULTADOS DA PORCENTAGEM DE POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4 E T CD8 DO BAÇO E DO LINFONODO POPLÍTEO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM A/J INFECTADOS COM $10^5$ TRIPOMASTIGOTAS DOS ESTOQUES TC OU TS

\*Obs: O percentual e erro padrão estão apresentados em Tabelas no apêndice.

### SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS DO BAÇO INFECTADO (TC OU TS)

Observamos que, após 24, 48 e 72hs de infecção pelos estoques TC e TS (Figura a), os animais da linhagem A/J apresentam uma porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> sempre menor que os valores do controle. A infecção pelo estoque TS (Figura a) induziu em 72hs uma redução de até 10% (13.80%) do valor do percentual normal (23.89%).

As porcentagens das células T CD8 (Figura g) dos animais infectados com o estoque TC não se mostraram alteradas dos valores normais. Na infecção pelo estoque TS houve um aumento principalmente nos primeiros dias.

### SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS DO LINFONODO POPLÍTEO HOMOLATERAL INFECTADO (TC E TS)

Quando comparados ao controle (44,53%), a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> do linfonodo poplíteo homolateral (Figura c) à infecção pelo estoque TC mostrou uma elevação para 56,89% e, 48hs de infecção. A infecção pelo estoque TS (Figura c) provocou uma redução na porcentagem dos linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante todo o período experimental.

Com relação aos valores percentuais dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> podemos observar que o padrão percentual da subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não mostrou alterações na infecção por TC (Figura i). Na infecção pelo estoque TS observamos um valor elevado em 24hs, seguido de redução em 48hs e aumento em 72hs (Figura i).

## SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS DO LINFONODO POPLÍTEO CONTRALATERAL INFECTADO (TC E TS)

Com relação ao linfonodo contralateral de animais infectados com o estoque TC e TS, os valores percentuais de linfócitos T CD4 (Figura e) foram elevados na infecção pelo estoque TC e reduzidos na infecção pelo estoque TS. O percentual de linfócitos T CD8 somente reduziu na infecção pelo estoque TS (Figura k).

## **7. RESULTADOS DA PORCENTAGEM DE POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4 E T CD8 DO BAÇO E DO LINFONODO POPLÍTEO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM BALB/cJ INFECTADOS COM $10^5$ TRIPOMASTIGOTAS DOS ESTOQUES TC OU TS**

### SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS DO BAÇO INFECTADO (TC OU TS)

Pudemos notar que ocorreu uma redução nas porcentagens de linfócitos T CD4<sup>+</sup> apenas em animais infectados com o estoque TS (Figura b). Os valores percentuais durante a infecção pelo estoque TC (Figura b) se apresentaram iguais ao controle.

A subpopulação de linfócitos T CD8<sup>+</sup> do baço de animais após a infecção pelo estoque TC (Figura h) alterou na fase inicial apresentando um valor normal em 72hs. A infecção pelo estoque TS (Figura h) provocou uma redução acentuada no percentual dos linfócitos T CD8 (13.86%) comparado ao controle (25.06%).

## SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS DO LINFONODO POPLÍTEO HOMOLATERAL INFECTADO (TC OU TS)

Nessa linhagem, a subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> durante os dois primeiros dias da infecção pelo estoque TC (Figura d) tiveram os valores percentuais aumentados. Na infecção pelo estoque TS (Figura d), após uma elevação em 24hs, a porcentagem desse tipo celular apresentou redução gradativa.

Na porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup>, apenas os animais infectados com o estoque TC (Figura j) apresentaram um valor diferente, que foi maior que o controle em 72hs de infecção, todos os outros períodos experimentais apresentando um valor igual ao controle.

## SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO LINFONODO POPLÍTEO CONTRALATERAL INFECTADO (TC OU TS)

Observamos que a inoculação do estoque TC (Figura f) provocou uma elevação no percentual de linfócitos T CD4 nos primeiros dois dias. Com relação à inoculação do estoque TS (Figura f), houve uma elevação apenas no primeiro dia na população de linfócitos T CD4<sup>+</sup>.

Essa elevação na infecção pelo estoque TS também foi observada no percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura l), a infecção pelo estoque TC não causando alterações significativas.

## **8. RESULTADOS DA PORCENTAGEM DE POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4 E T CD8 DO BAÇO E DO LINFONODO POPLÍTEO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM A/J IMUNIZADOS COM 10<sup>5</sup> TRIPOMASTIGOTAS DOS ESTOQUES TC E DESAFIADOS COM 10<sup>5</sup> FORMAS DO ESTOQUE TS (TC+TS)**

## SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS DO BAÇO INFECTADO (TC+TS)

Comparado ao controle (TS), a imunização com o estoque TC (TC+TS) alterou apenas os percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (Figura m), apresentando um valor menor que animais infectados somente pelo estoque TS em 48hs, e maior em 72hs.

## SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO LINFONODO HOMOLATERAL INFECTADO (TC+TS)

Apenas a porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> apresentou valores diferentes que o controle TS, e, similarmente ao baço, os percentuais se mostraram menores em 24hs e maiores em 72hs (Figura o).

## SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO LINFONODO CONTRALATERAL INFECTADO (TC+TS)

Os valores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do linfonodo contralateral (Figura q) apresentou uma redução com relação ao seu controle (TS) em 48hs. O percentual de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não apresentou diferenças significativas.

## **9. RESULTADOS DA PORCENTAGEM DE POPULAÇÕES DE LINFÓCITOS T CD4 E T CD8 DO BAÇO E DO LINFONODO POPLÍTEO DE CAMUNDONGOS DA LINHAGEM BALB/cJ IMUNIZADOS COM 10<sup>5</sup> TRIPOMASTIGOTAS DOS ESTOQUES TC E DESAFIADOS COM 10<sup>5</sup> FORMAS DO ESTOQUE TS (TC+TS)**

## SUBPOPULAÇÃO DE LINFÓCITOS DO BAÇO INFECTADO (TC+TS)

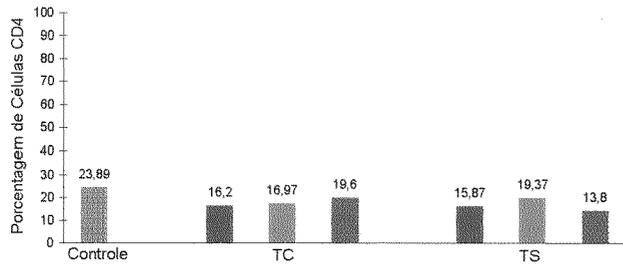
A porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> de animais infectados com os estoques TC+TS tiveram um valor mais elevado que o seu controle somente em 48hs da infecção (Figura n). Os valores percentuais de linfócitos T CD8<sup>+</sup> foram maiores que os controles durante os três dias experimentais, entretanto somente sendo significativo nos dois primeiros dias de infecção (Figura n).

## SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO LINFONODO HOMOLATERAL INFECTADO (TC+TS)

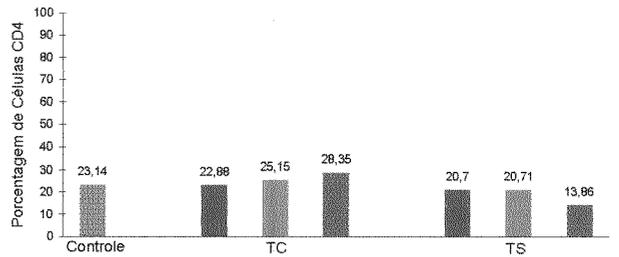
Observamos um valor reduzido de linfócitos T CD4<sup>+</sup> relativo ao controle TS. A porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não se mostrou diferente (Figura p).

## SUBPOPULAÇÕES DE LINFÓCITOS DO LINFONODO CONTRALATERAL INFECTADO (TC+TS)

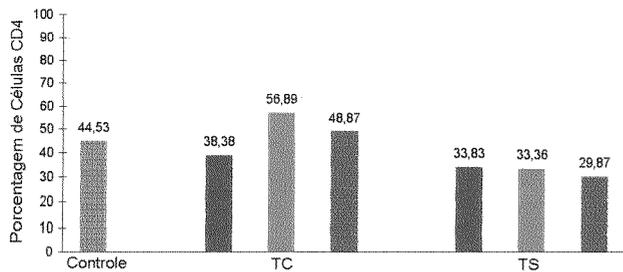
Com relação aos valores percentuais de linfócitos T CD4<sup>+</sup>, animais que receberam a imunização prévia pelo estoque TC apresentaram porcentagens menores (Figura r). A porcentagem de linfócitos T CD8<sup>+</sup> não diferiu significativamente dos valores normais.



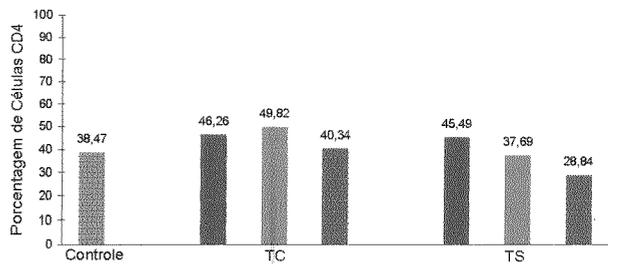
a) baço A/J - CD4



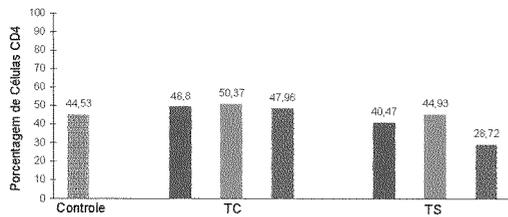
b) baço BALB/cJ - CD4



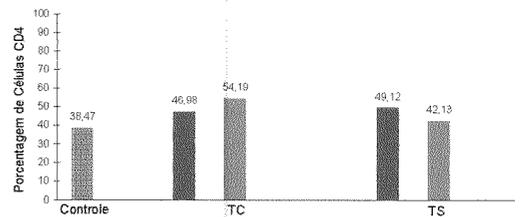
c) linfonodo H A/J - CD4



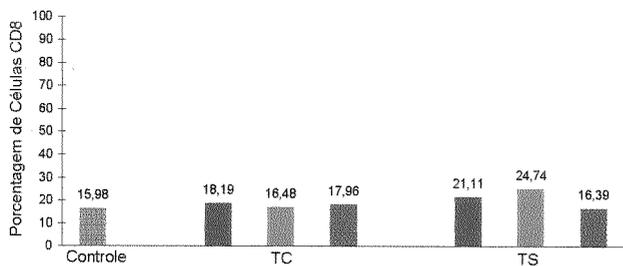
d) linfonodo H BALB/cJ - CD4



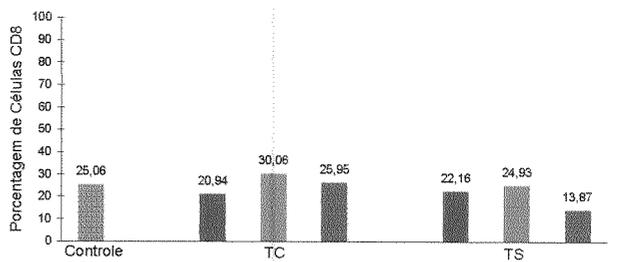
e) linfonodo CT A/J - CD4



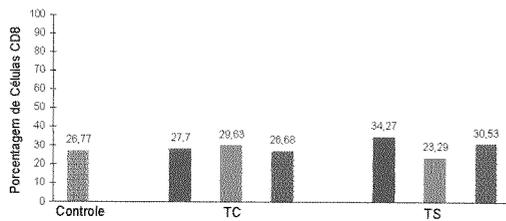
f) linfonodo CT BALB/cJ - CD4



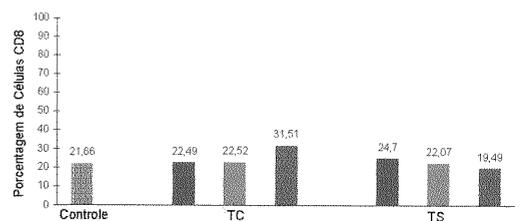
g) baço A/J - CD8



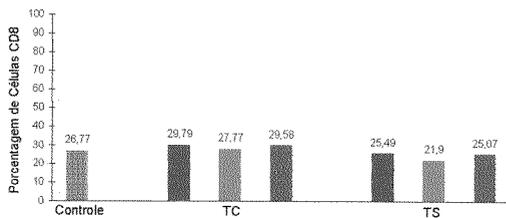
h) baço BALB/cJ - CD8



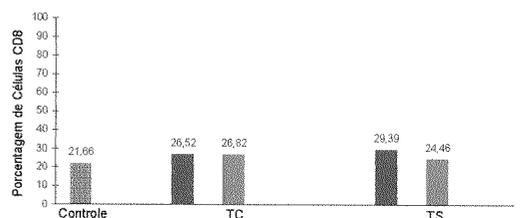
i) linfonodo H A/J - CD8



j) linfonodo H BALB/cJ - CD8



k) linfonodo CT A/J - CD8



l) linfonodo CT BALB/cJ - CD8

\* as colunas representam o percentual de células positivas obtidas no controle (azul), após 24 hs de infecção (rosa), após 48 hs de infecção (verde) e após 72 hs de infecção (laranja).

\*\* TC - infecção pelo estoque de *Trypanosoma cruzi* mantido *in vitro*

TS - infecção pelo estoque de *Trypanosoma cruzi* mantido *in vivo*

H - homolateral; CT - contralateral

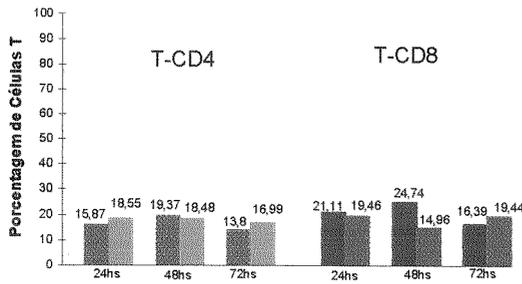
NR - não realizado

Figuras a, c, e - Porcentagens respectivas de linfócitos T CD4 do baço, linfonodo poplíteo homolateral e linfonodo poplíteo contralateral de camundongos da linhagem A/J.

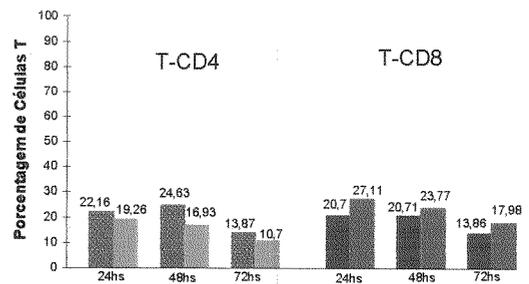
Figuras b, d, f - Porcentagens respectivas de linfócitos T CD4 do baço, linfonodo poplíteo homolateral e linfonodo poplíteo contralateral de camundongos da linhagem BALB/cJ.

Figuras g, i, k - Porcentagens respectivas de linfócitos T CD8 do baço, linfonodo poplíteo homolateral e linfonodo poplíteo contralateral de camundongos da linhagem A/J.

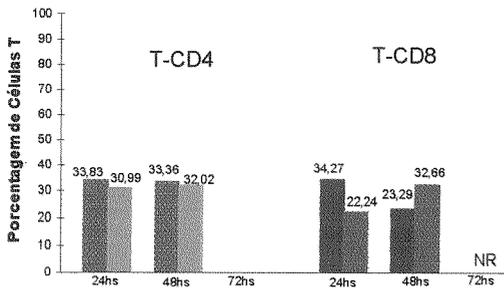
Figuras h, j, l - Porcentagens respectivas de linfócitos T CD4 do baço, linfonodo poplíteo homolateral e linfonodo poplíteo contralateral de camundongos da linhagem BALB/cJ.



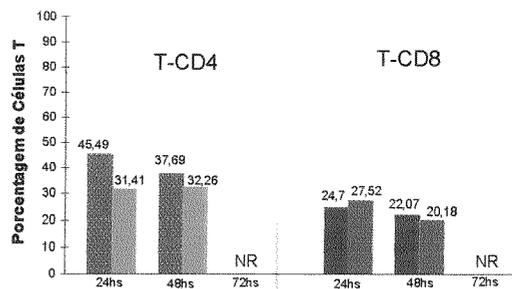
m) baço A/J



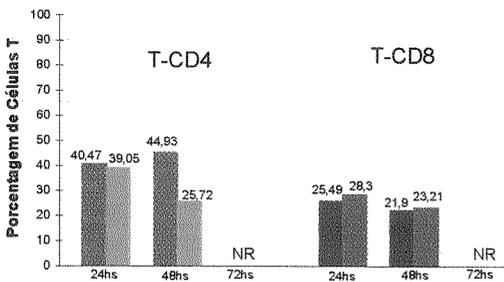
n) baço BALB/cJ



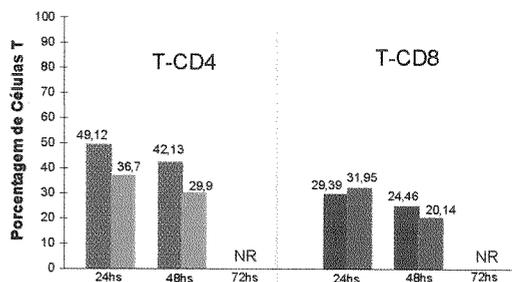
o) linfonodo H A/J



p) linfonodo H BALB/cJ



q) linfonodo CT A/J



r) linfonodo CT BALB/cJ

\* as colunas representam o percentual de células positivas obtidas no controle infectado somente com TS (azul ou vermelho) e durante a infecção TC+TS (azul claro ou laranja).

\*\* TS (controle) - infecção pelo estoque de *T. cruzi* mantido *in vivo*

TC+TS - imunização com TC e desafio após 72 hs com TS

H - homolateral; CT - contralateral

NR - não realizado

Figuras m, o, q - Porcentagens respectivas de linfócitos T CD4 e T CD8 do baço, linfonodo poplíteo homolateral e linfonodo poplíteo contralateral de animais da linhagem A/J infectados com TS (controle) ou imunizados com TC e desafiados 72hs após com TS (TC+TS).

Figuras n, p, r - Porcentagens respectivas de linfócitos T CD4 e T CD8 do baço, linfonodo poplíteo homolateral e linfonodo poplíteo contralateral de animais da linhagem BALB/cJ infectados com TS (controle) ou imunizados com TC e desafiados 72hs após com TS (TC+TS).

## 10. IMUNOHISTOQUÍMICA

DISTRIBUIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 E T CD8 NO BAÇO DE ANIMAIS DAS LINHAGENS A/J E BALB/cJ NORMAIS E INFETADOS PELOS ESTOQUES TC, TS E TC+TS.

As fotografias seguintes foram obtidas de cortes de tecidos criopreservados e caracterizam a localização de linfócitos T CD4 e T CD8, utilizando a técnica de imunoperoxidase no baço e de camundongos normais e infectados com  $10^5$  formas dos estoques TC e TS (Fotografias 2 - 6).

A detecção das subpopulações de linfócitos T auxiliares e dos clássicos citotóxicos/supressores no baço normal mostrou, tanto na linhagem A/J como na BALB/cJ, que essas células se concentram predominantemente na corona (C), bainha periarteriolar (BPA), sendo também encontradas dispersas pela polpa vermelha (PV) (Fotografias 2 - 6). Houve presença de linfócitos T CD4 no folículo linfóide do baço (F), mas de muitos poucos linfócitos T CD8 (mostrado nas Fotografias 2a e 2b). As subpopulações de linfócitos T CD4 e T CD8 tiveram localizações semelhantes, diferindo na intensidade de reação.

Em animais infectados, além de observarmos uma polpa branca maior do que o normal, os linfócitos se encontraram mais concentrados e constituindo uma grande região, correspondente à bainha periarteriolar (Fotografias 4 - 6).

Todas as reações positivas se apresentaram localizadas centralmente no órgão, acompanhando a bainha periarteriolar, sendo que a porção periférica não apresentou zonas positivamente coradas. Entretanto, animais previamente imunizados com o estoque TC e desafiados com o estoque TS (Fotografias 6a e 6b) apresentaram regiões de reação positiva na periferia do órgão e mais delimitada que os órgãos de animais infectados pelo estoque TC (Fotografias 4a e 4b) e pelo estoque TS (Fotografias 5a e 5b). Em adição, comparados com animais normais (Fotografias 2a, 2b e 3a) e infectados pelos estoques TC ou TS, poucos linfócitos foram encontrados dispersos pela polpa vermelha.

## DISTRIBUIÇÃO E LOCALIZAÇÃO DE LINFÓCITOS T CD4 E T CD8 NO LINFONODO POPLÍTEO DE ANIMAIS DA LINHAGEM A/J E BALB/cJ NORMAIS E INFETADOS PELOS ESTOQUES TC, TS E TC+TS.

As fotografias seguintes foram obtidas de cortes de tecidos criopreservados e caracterizam a localização de linfócitos T CD4 e T CD8, utilizando a técnica de imunoperoxidase no linfonodo poplíteo homolateral de camundongos normais e infectados com  $10^5$  formas dos estoques TC e TS (Fotografias 7 - 9).

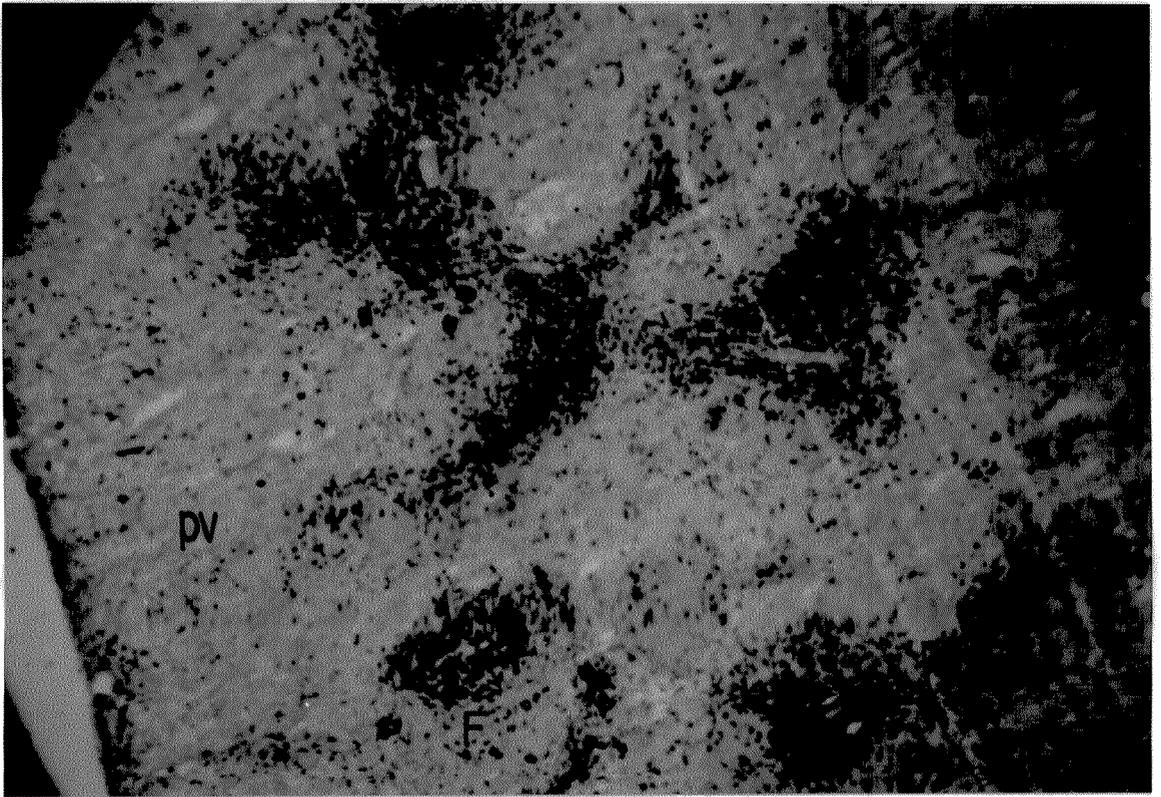
A localização dos linfócitos T CD4 e T CD8 foram sempre similares, compondo a região paracortical (PC) ao redor da área folicular de linfócitos B (F), e também a região cortical (C) (Fotografias 7 - 9).

Os linfonodos proveniente de animais infectados pelo estoque TC (Fotografia 8) foram sempre maiores que dos animais normais (Fotografias 7a e 7b) e infectados pelo estoque TS (Fotografias 9a e 9b).

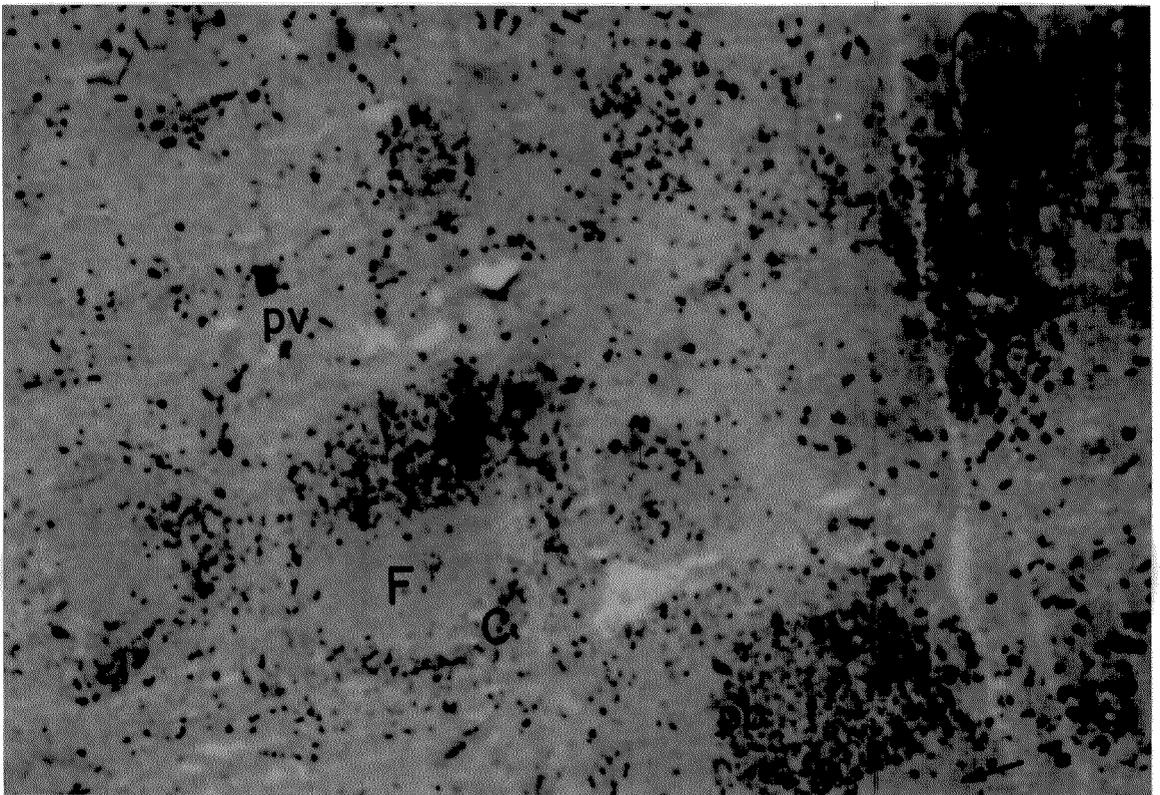
A localização das subpopulações de linfócitos não diferiram, não demonstrando que houve aumento preferencial ou migração diferencial de número de um dos tipos celulares.

Fotografia 2a. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do baço de camundongo da linhagem A/J normal. x 20. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD4. Notar a abundância de linfócitos T auxiliares na bainha periarteriolar (BPA) e corona (C) rodeando o foliculo (F) na região da polpa branca (PB). As células também foram detectadas dispersas na polpa vermelha (PV).

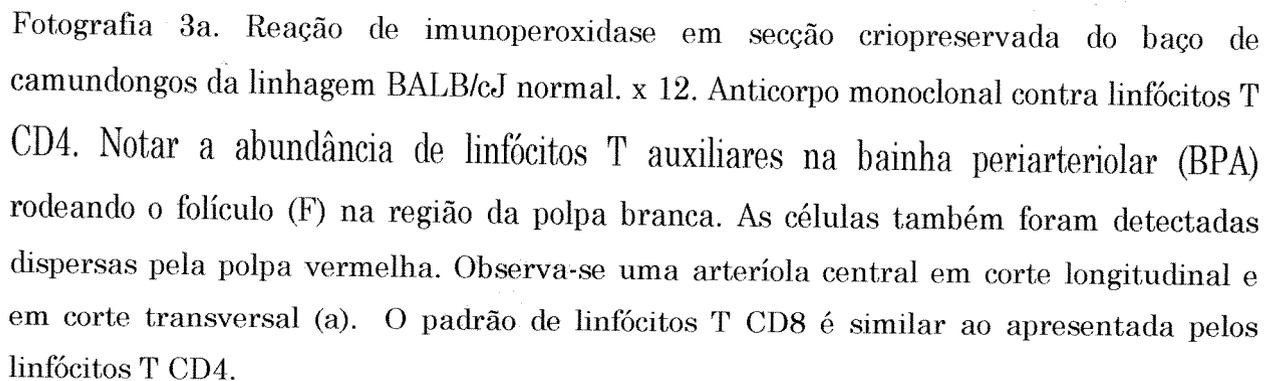
Fotografia 2b. Reação de imunoperoxidase em secção seriada do baço de camundongo da linhagem A/J normal. x 20. Anticorpo monoclonal anti linfócitos T CD8. O perfil de distribuição é similar aos linfócitos T CD4. Notar a baixa presença de linfócitos T citotóxico/supressor na área correspondente ao foliculo (seta).



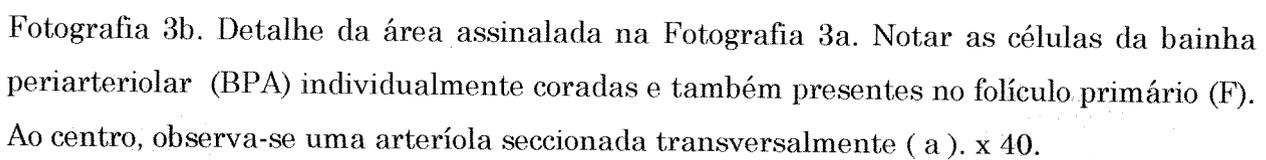
FOTOGRAFIA 2a



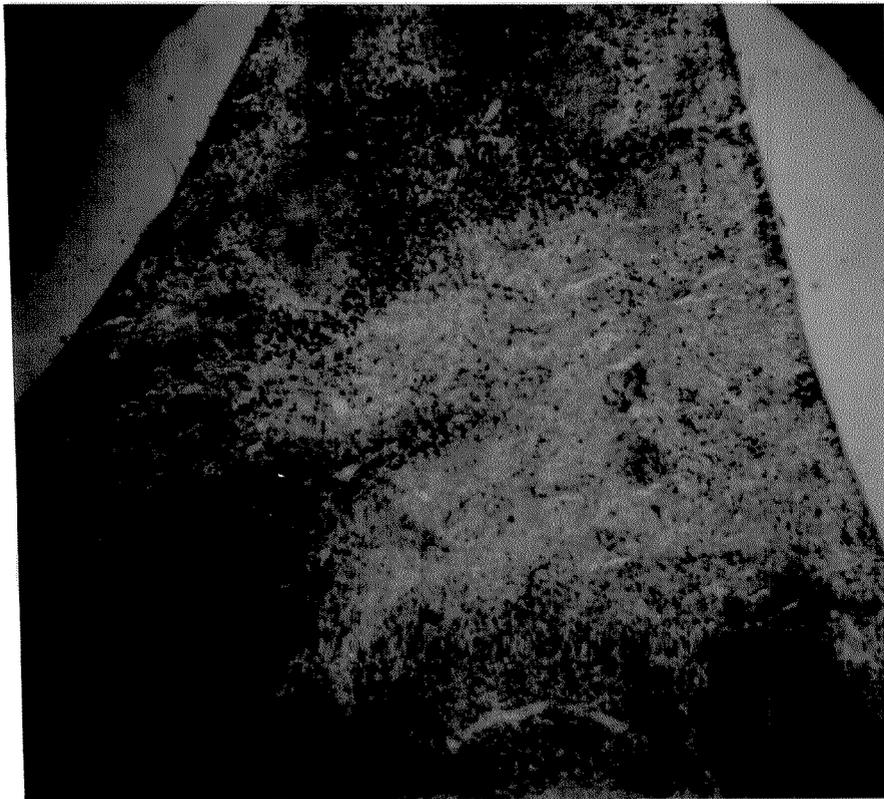
FOTOGRAFIA 2b



Fotografia 3a. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do baço de camundongos da linhagem BALB/cJ normal. x 12. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD4. Notar a abundância de linfócitos T auxiliares na bainha periarteriolar (BPA) rodeando o folículo (F) na região da polpa branca. As células também foram detectadas dispersas pela polpa vermelha. Observa-se uma arteríola central em corte longitudinal e em corte transversal (a). O padrão de linfócitos T CD8 é similar ao apresentada pelos linfócitos T CD4.



Fotografia 3b. Detalhe da área assinalada na Fotografia 3a. Notar as células da bainha periarteriolar (BPA) individualmente coradas e também presentes no folículo primário (F). Ao centro, observa-se uma arteríola seccionada transversalmente ( a ). x 40.



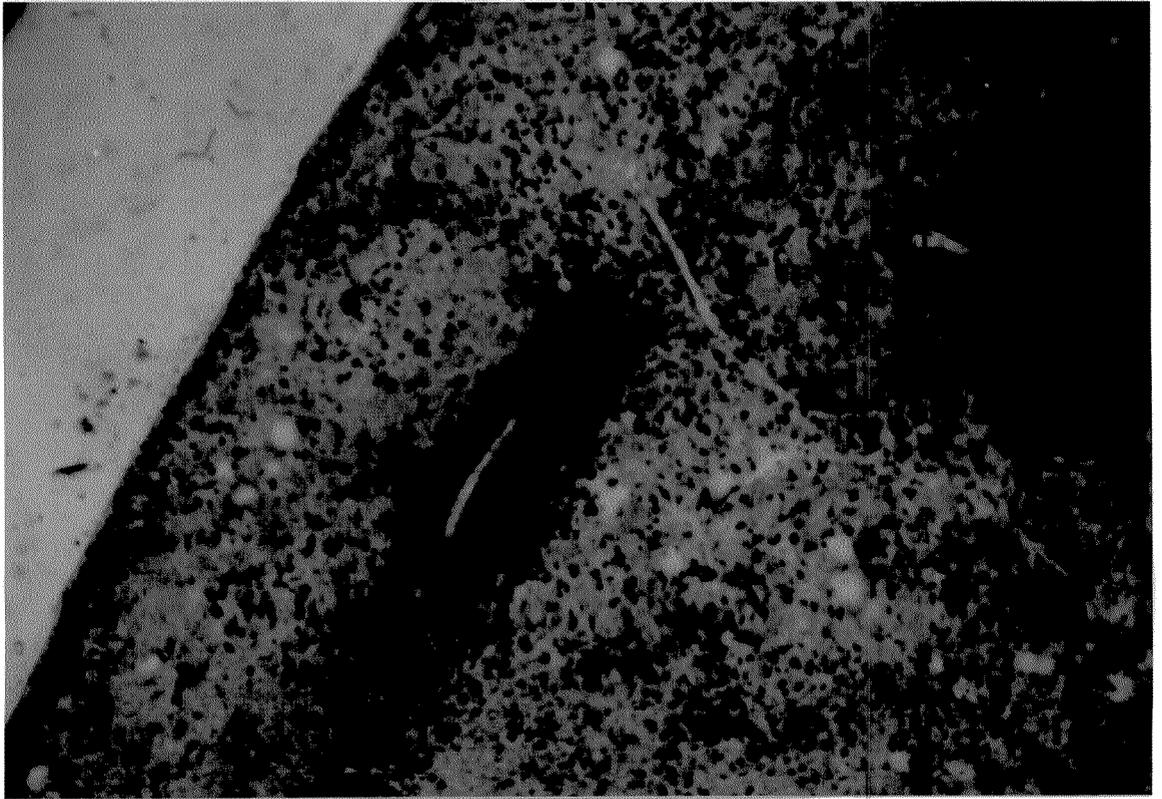
FOTOGRAFIA 3a



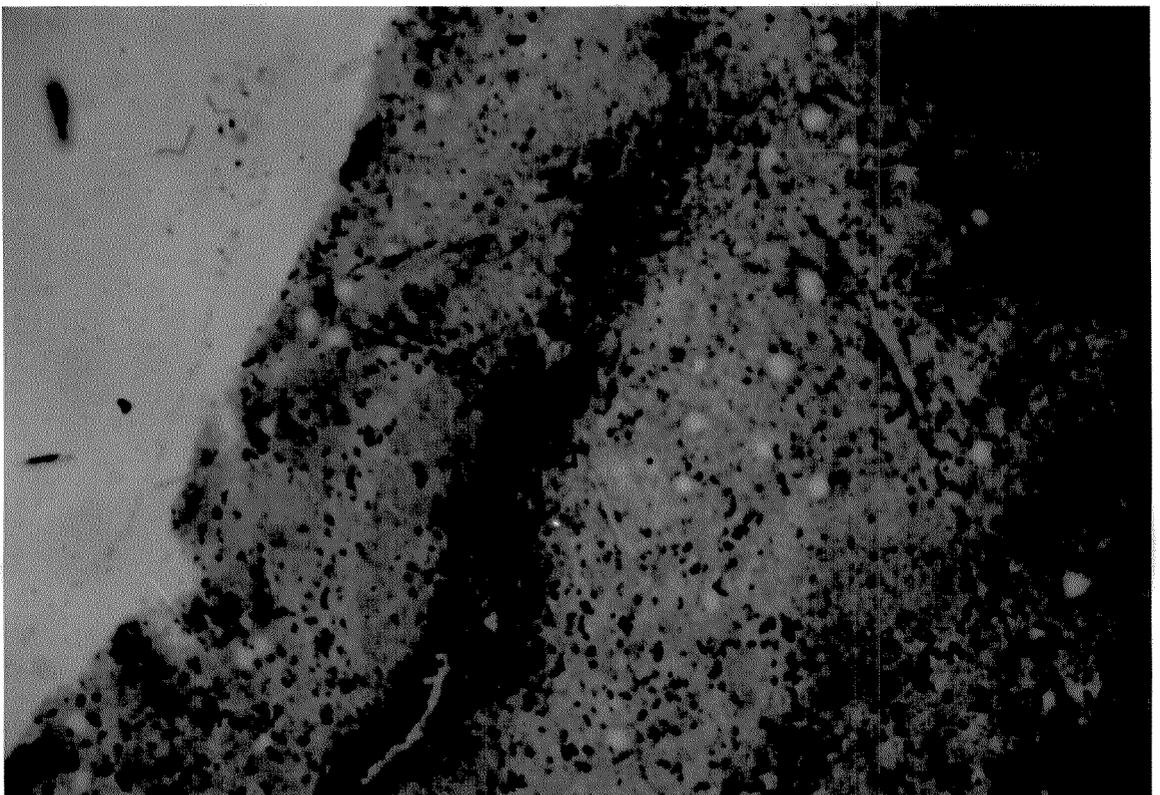
FOTOGRAFIA 3b

Fotografia 4a. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do baço de camundongo da linhagem A/J com 72 hs de infecção pelo estoque TC. x 24. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD4. Notar a bainha periarteriolar (BPA) com uma arteríola seccionada transversalmente e longitudinalmente (a). A distribuição é semelhante à de animais normais (Fotografia 2a).

Fotografia 4b. Reação de imunoperoxidase em secção seriada do baço de camundongo da linhagem A/J com 72 hs de infecção pelo estoque TC. x 24. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD8. A distribuição dos linfócitos T CD8 é semelhante aos animais normais (Fotografia 2b) e ocupa as mesmas regiões dos linfócitos T CD4 (Fotografia 4a).



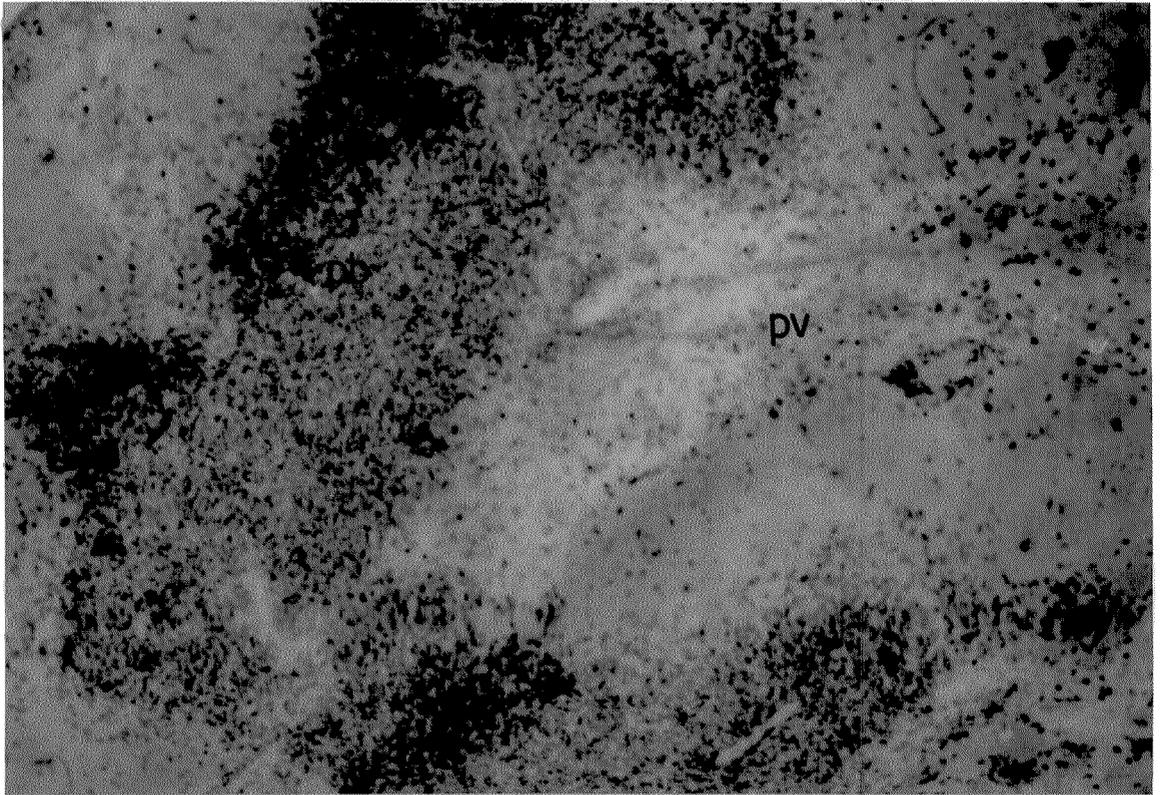
FOTOGRAFIA 4a



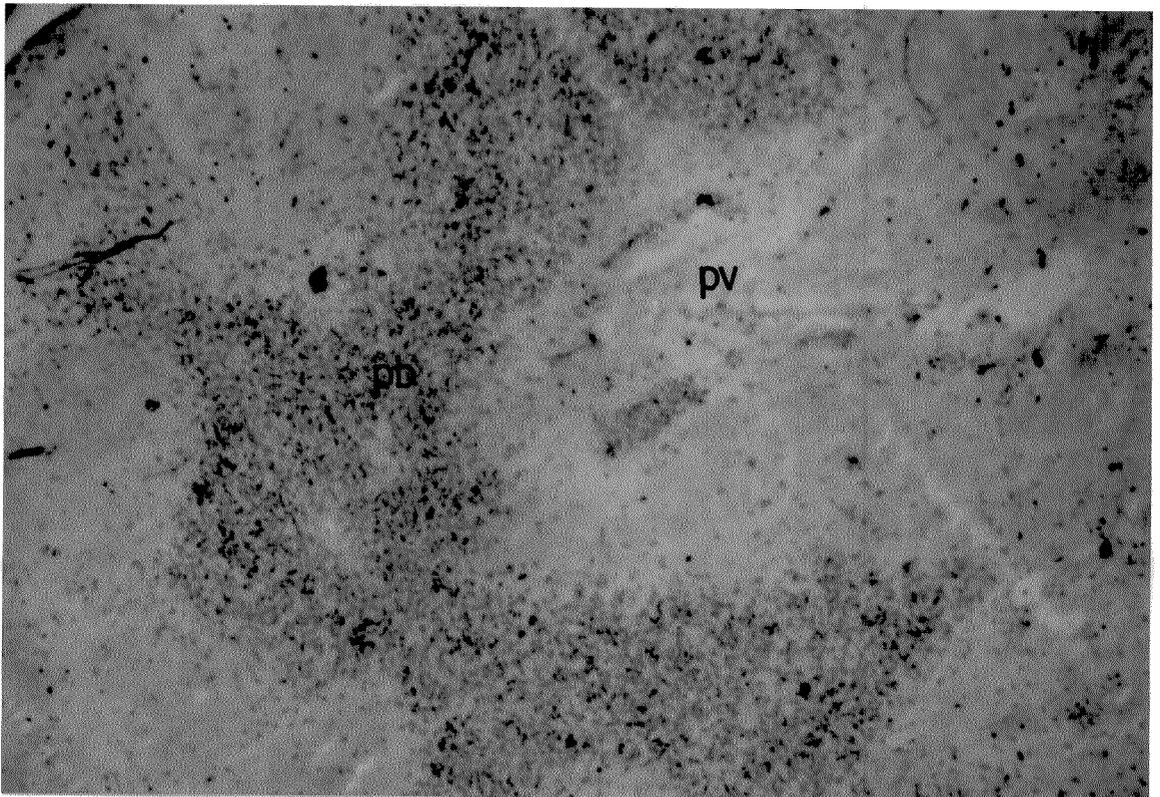
FOTOGRAFIA 4b

Fotografia 5a. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do baço de camundongo da linhagem BALB/cJ com 72 hs de infecção pelo estoque TS. x 24. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD4. A polpa branca (PB) é maior que dos animais normais e a bainha periarteriolar ocupa uma área mais extensa. Não se observam estruturas com características de folículo secundário.

Fotografia 5b. Reação de imunoperoxidase em secção seriada do baço de camundongo da linhagem BALB/cJ com 72 hs de infecção pelo estoque TS. x 24. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD8. O padrão de distribuição dos linfócitos T CD8 é similar aos linfócitos T CD4 (Fotografia 5a).



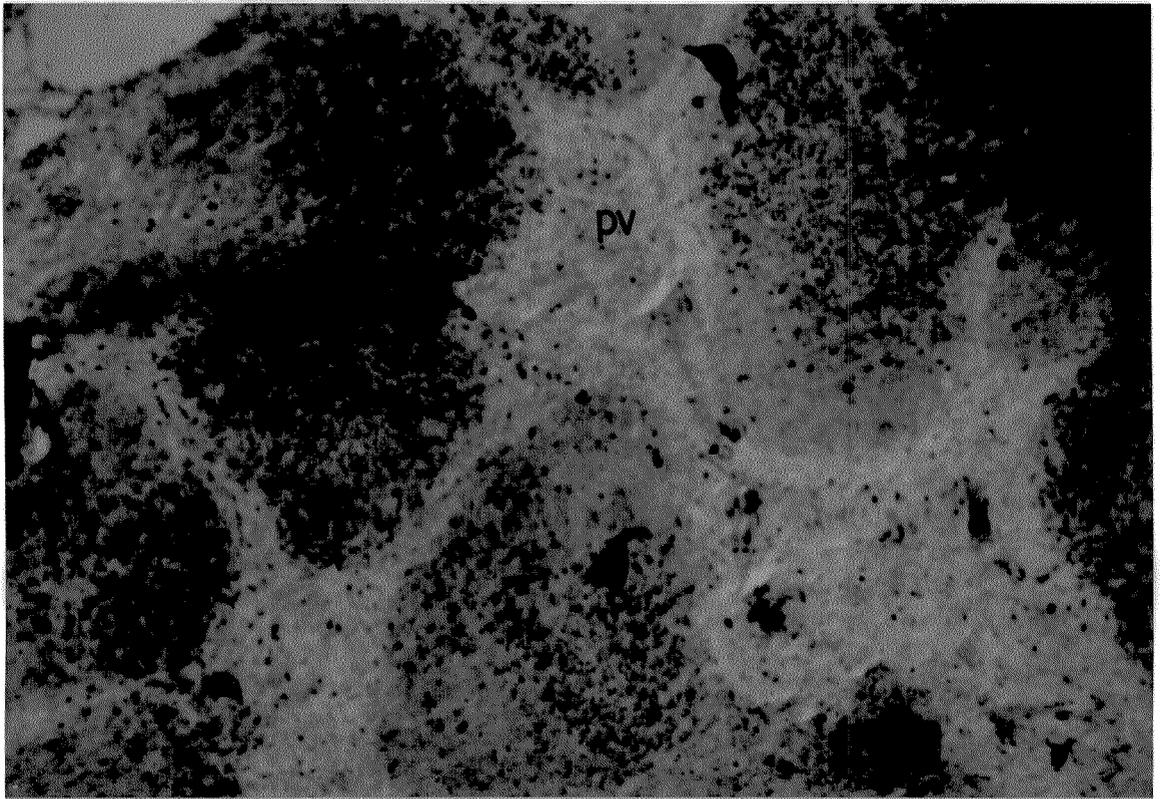
FOTOGRAFIA 5a



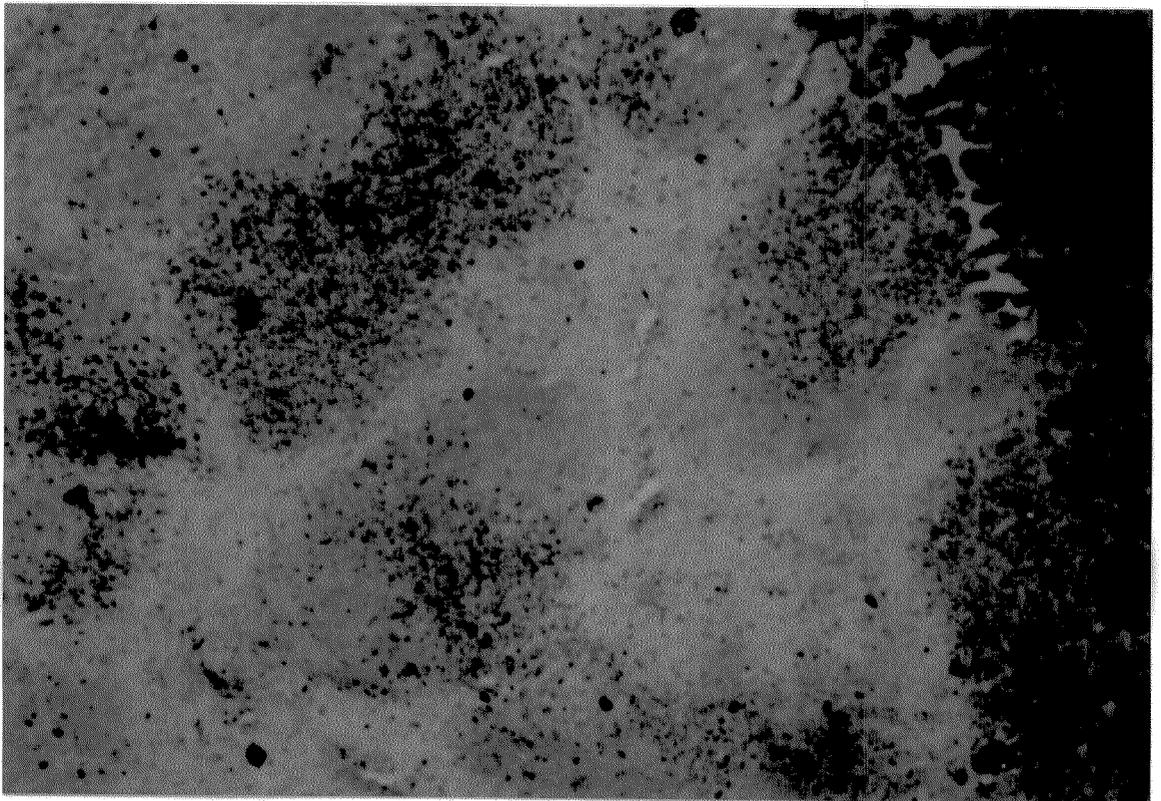
FOTOGRAFIA 5b

Fotografia 6a. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do baço de camundongo da linhagem BALB/cJ imunizadas pelo estoque TC de desafiados pelo estoque TS (72hs de infecção). x 30. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD4. Notar a polpa branca (PB) aumentada com relação ao controle (Fotografia 5). Não se observam folículos secundários.

Fotografia 6b. Reação de imunoperoxidase em secção seriada do baço de camundongo da linhagem Balb/cJ imunizadas pelo estoque TC de desafiados pelo estoque TS (72hs de infecção). x 30. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD8. Observa-se que a região ocupada pelos linfócitos T CD8 é menor que a região ocupada pelos linfócitos T CD4. Entretanto, os linfócitos T CD8 possuem a mesma localização dos linfócitos T CD4 (Fotografia 6a).



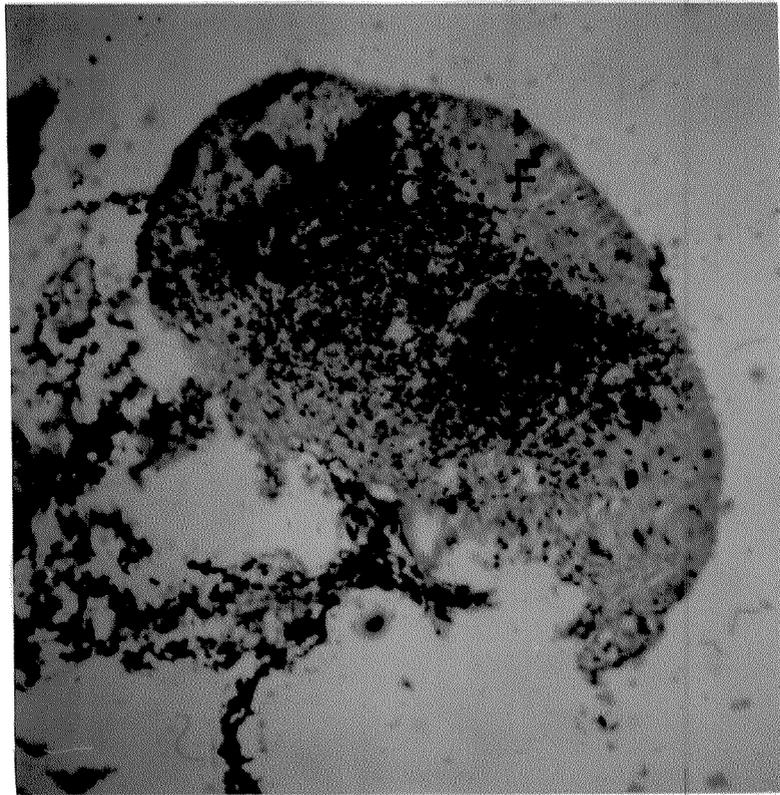
FOTOGRAFIA 6a



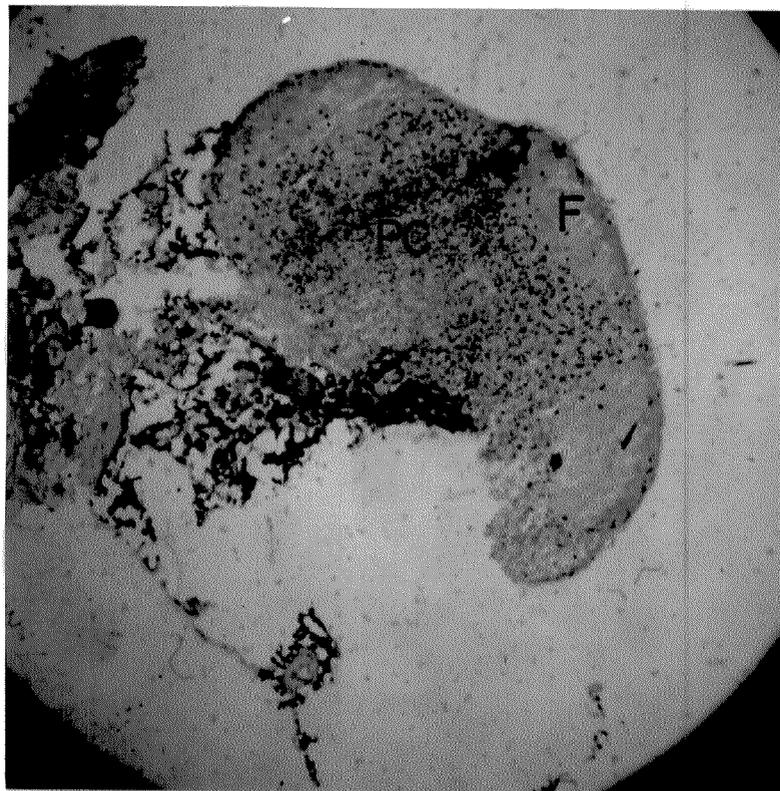
FOTOGRAFIA 6b

Fotografia 7a. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do linfonodo poplíteo de camundongo da linhagem BALB/cJ normal. x 24. Os anticorpos monoclonais contra linfócitos T CD4 definiu a região paracortical de células T (PC), inclusive revelando células T CD4 na área folicular de linfócitos B (F).

Fotografia 7b. Reação de imunoperoxidase em secção seriada do linfonodo poplíteo de camundongo da linhagem BALB/cJ normal. x 24. O padrão de distribuição dos linfócitos T CD8 é similar ao de linfócitos T CD4 (Fotografia 7a).



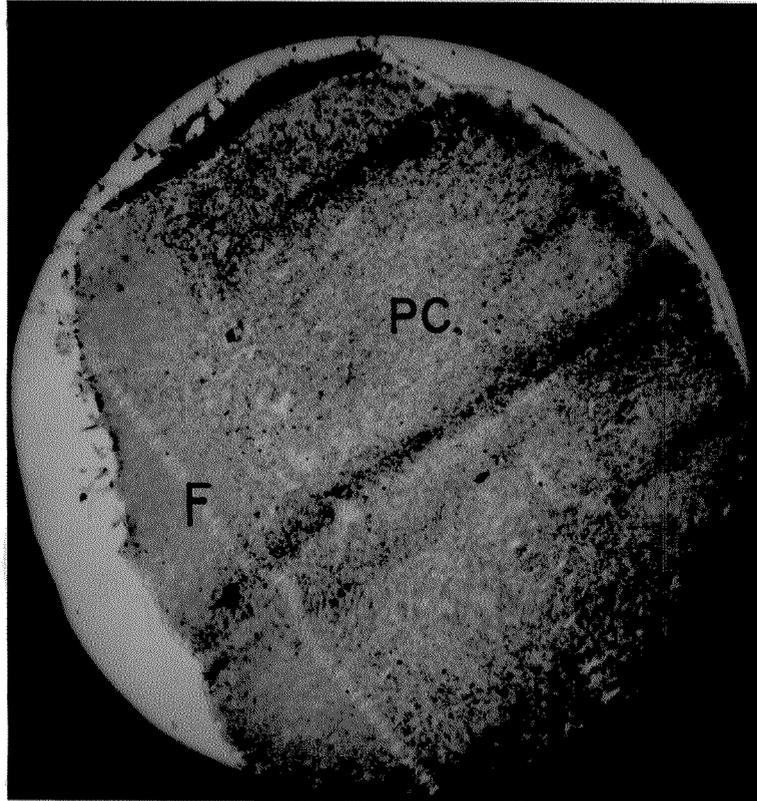
FOTOGRAFIA 7a



FOTOGRAFIA 7b



Fotografia 8. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do linfonodo poplíteo de camundongo da linhagem BALB/cJ com 72 hs de infecção pelo estoque TC. x 15. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD4. Notar o tamanho dobrado do órgão com relação ao normal (Fotografia 7a). O padrão de distribuição e localização dos linfócitos T CD4 e T CD8 (não mostrado) é similar ao normal.

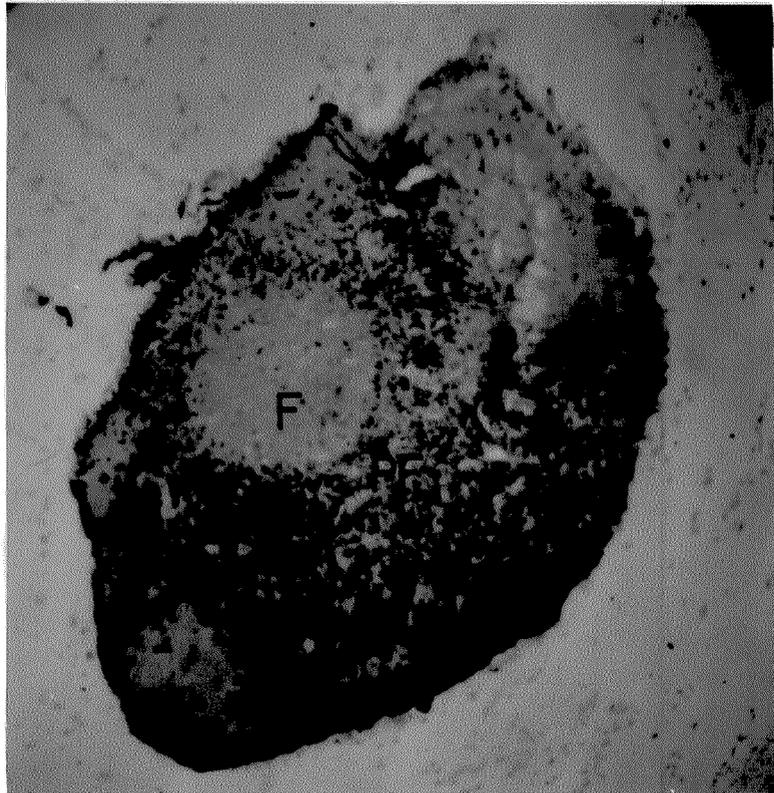


FOTOGRAFIA 8

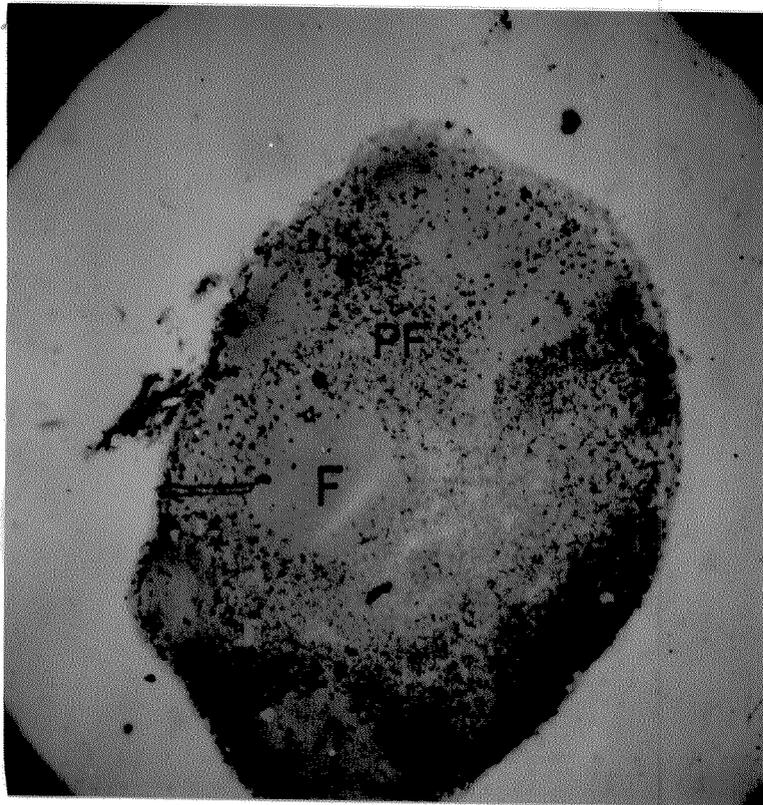
Fotografia 9a. Reação de imunoperoxidase em secção criopreservada do linfonodo poplíteo de camundongo da linhagem BALB/cJ com 72 hs de infecção pelo estoque TS. x 18. Anticorpo monoclonal anti linfócitos T CD4. A distribuição e localização dos linfócitos T CD4 é similar ao controle (Fotografia 7a). Nesse corte, observa-se a presença de linfócitos T CD4 na área parafolicular (PF) ao redor do foliculo (F).

Fotografia 9b. Reação de imunoperoxidase em secção seriada do linfonodo poplíteo de camundongo da linhagem BALB/cJ normal. x 18. Anticorpo monoclonal contra linfócitos T CD8. Notar que a quantidade de linfócitos T CD8 é menor que T CD4. A distribuição e localização se equiparam ao apresentados pelos linfócitos T CD4 (Fotografia 9a).

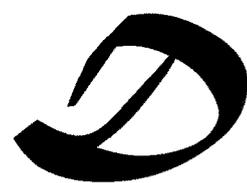
obs: O padrão de distribuição dos linfócitos T CD4 e T CD8 do linfonodo poplíteo de animais de ambas linhagens infectadas com os estoques TC+TS (não mostrado) é similar ao dos animais infectados com o estoque TS.



FOTOGRAFIA 9a



FOTOGRAFIA 9b



discussão

## Discussão

A patogenia da Doença de Chagas humana e experimental ainda contém muitas incógnitas que dificultam o direcionamento das pesquisas no desenvolvimento de remédios que visem a cura ou na elaboração de vacinas. Experimentos utilizando modelos experimentais vêm sempre apresentando novas descobertas que mostram acima de tudo a importância da padronização desses modelos experimentais. Fatores como o curso infeccioso das diferentes linhagens de camundongos (Albright e Albright, 1989; Wrightsman et al, 1982; Trischmann e Bloom, 1982), assim como o uso de diferentes sexo e idade do animal (Hauschka, 1947; Culberston e Kessler, 1942), diferenças entre as cepas e estoques do *T. cruzi* (Krettli, 1975) e diferenças entre resultados de experimentos conduzidos em humanos ou em camundongos (Beltz e Kierszenbaum, 1987; Tarleton e Kuhn, 1983) mostram nitidamente que existe singularidades no padrão experimental.

Outro fato conhecido, porém não muito explorado, é a existência de variação dentro da população de parasitas, seja ela mantida *in vivo* ou *in vitro*, verificado em resultados obtidos em experimentos de longa duração. Nos parasitas mantidos *in vitro*, a quantidade de repiques (passagens e trocas de meios) é um fator fundamental influenciando na virulência da população parasitária (Menezes, 1968; Camargo et al, 1989). Esses fatores já foram apontados por outros pesquisadores e também foram verificados durante nossos experimentos (resultados de mortalidade e parasitemia). Entretanto estudos mais detalhados sobre a influência nos mecanismos imunológicos decorrentes da infecção por formas de cultura ainda são escassos.

Na tentativa de melhorar as condições experimentais, refinou-se as

condições de manutenção de animais experimentais, que passaram a ser livre de contaminantes externos e de patógenos específicos, passando a ter uma flora conhecida (animais SPF). Mesmo assim, experimentos de Rangel et al (1994) revelaram a existência de um vírus contaminante presente no sangue de animais SPF infectados com a cepa Y que interferiam na resposta do hospedeiro ao parasita. Provavelmente muitos estoques ainda estejam contaminados, principalmente aqueles utilizando animais mantidos em biotérios convencionais comprometendo os resultados. Este certamente é um dos fatores que conduzem aos resultados heterogêneos reportados até o presente.

O presente estudo teve como principal objetivo ampliar os conhecimentos sobre os diferentes efeitos decorrentes da infecção com os estoques TC e TS de *T. cruzi*, e discutir os possíveis mecanismos desencadeados pelo estoque TC que conferem a resistência à infecção pelo estoque TS, relatado por Camargo et al (1989), assim como as condições experimentais neles utilizadas. Procuramos inicialmente reproduzir os resultados obtidos pelos pesquisadores para utilizarmos as condições experimentais similares e fazer um estudo extensivo. Assim, camundongos da linhagem CBA/J imunizados com o estoque TC reproduziram a indução do fenômeno de resistência precoce, resultando em 0% de mortalidade quando houve o desafio com o estoque TS, e garantimos com isso que os parasitas utilizados estivessem nas mesmas condições experimentais.

Com esses dados prosseguimos no estudo comparativo das infecções provocadas pelos estoques TC e TS quanto à taxa de mortalidade, parasitemia e subpopulações de células T de baço e linfonodos poplíteos.

Esse interesse pelas respostas dos estoques mantidos *in vivo* e *in vitro* se prende principalmente a dois pontos de vista: um se refere aos efeitos dos estoques sobre o funcionamento dos mecanismos imunológicos e comportamento do sistema imune durante uma infecção; outro puramente aplicado, diz respeito à utilização da forma atenuada em termos de vacinação, que é muito visada na tentativa de controle de qualquer doença pela sua praticidade e eficiência. Várias tentativas de vacinação foram realizadas, especialmente utilizando o *T. cruzi* morto ou suas frações (Kierszenbaum e Budzko, 1975; Leon et al, 1980; Teixeira, 1983). Estudos tem

levantado a possibilidade do uso de *T.cruzi* mantidos em cultura como vacinas, sendo verificada nas cepas Y (Menezes, 1968), Corpus Christi (Hunt, 1967; Rowland e Ritter, 1984), Brazil (Hunt, 1967; Rowland e Ritter, 1984; Tanowitz, 1981) e Tulahuén (Basombrio e Bususchio, 1981; Basombrio e Bususchio, 1982). Entretanto, as tentativas de vacinação com parasitas vivos apresentam um poder infectante inviabilizando a sua utilização.

Em nossos experimentos constatamos que a manutenção do parasita *in vitro* o torna menos virulento que a sua manutenção *in vivo*. Observamos que o estoque TC não foi capaz de matar a população de camundongos como o estoque TS. Ao diminuirmos a dose, tanto do estoque TC ou do TS, verificamos que a mortalidade decorrente da infecção é dose dependente, isto é, o inóculo de maior número de parasitas provoca maior mortalidade e maior parasitemia (dado não mostrado), fato também verificado por Trischmann et al (1978) utilizando a cepa Brazil.

Quando analisamos a parasitemia resultante da infecção pelos dois estoques observamos curvas parasitêmicas diferentes. A infecção causada pelo estoque TS, além apresentar maior número de parasitas em todo período experimental analisado, apresentou um pico parasitêmico 4x a 9x maior que a infecção pela mesma dose do estoque TC, sugerindo que se tratam de populações parasitárias diferentes. Essa diferença entre a infecção do estoque TC e do estoque TS, refletido na sua perda de virulência, é importante no sentido de apontar em qual parte dos mecanismos imunológicos eles atuam diferentemente. Se houvesse a possibilidade de detectarmos qual o mecanismo que causa do distúrbio da homeostase do sistema imune que determina a diferença da fatalidade entre a infecção pelo estoque TS e o TC poderíamos direcionar as pesquisas no sentido terapêutico, e, adicionalmente, compreender melhor o funcionamento da resposta imunológica ao parasita. Estudos abordando o grau de patogenicidade de formas de *T. cruzi* da cepa Tulahuén mantidos em cultura denominado de TCC (Basombrio e Bususchio, 1982) em camundongos das linhagens Swiss e BALB/cJ mostraram que 99% dos protozoários do TCC eram formas epimastigotas. Isso é relevante pois as condições ambientais do TCC proporcionaram uma fase estacionária em epimastigota e que não ocorreu no estoque por nós utilizado.

Podemos então propor que a diferença de ação se reflete na fisiologia de crescimento dos diferentes clones da população parasitária uma vez que o estoque TS

somente perde a virulência após 2-3 passagens em cultura (Camargo et al, 1989). Dessa forma, o fato da passagem em cultura diminuir a virulência pode nos levar a pensar que os clones virulentos poderiam ser mais eficientes em termos de metabolismo, ou motilidade, e com isso escaparem do sistema imune de forma mais eficaz que os indivíduos menos virulentos. Esse processo de seleção *in vivo* é ausente *in vitro*. Adicionalmente, estudos da composição antigênica do estoque TS e TC da cepa Y utilizando Western Blotting mostraram grande homologia em seus componentes (Silva et al, 1988), portanto sendo pouco provável que a diferença de poucos epítomos sejam responsáveis pelos graus de letalidade dos dois estoques.

Utilizamos também diferentes linhagens de camundongos para enfatizar os graus de variabilidade existentes nas linhagens e sua importância como modelo experimental na pesquisa científica. Constatamos que a linhagem de camundongos A/J é mais susceptível ao estoque TC da cepa Y, refletida numa taxa de mortalidade maior que os camundongos da linhagem BALB/cJ de C57Bl/6J. Essa susceptibilidade da linhagem A/J foi visível por apresentar um período de sobrevivência, até a mortalidade total, menor que as outras linhagens. Esses dados referentes à susceptibilidade de camundongos A/J e maior resistência de camundongos BALB/cJ e C57Bl/6J concordam com aqueles apresentados por outros autores (Corsini, 1980; Minoprio, 1989).

A parasitemia provocada pela infecção com os estoques TC ou TS também foi distinta nas linhagens estudadas. O pico na infecção pelo estoque TC foi 4x menor que o pico pela infecção com o estoque TS na linhagem A/J, 5x menor em BALB/cJ e 9x em C57Bl/6J, demonstrando que o processo infeccioso é dependente do hospedeiro.

Outro fato observado foi que, enquanto o curso parasitêmico das linhagens A/J e C57Bl/6J se mostraram semelhantes, apresentando o pico no mesmo dia e o número de parasitas decaindo no mesmo período, a parasitemia da linhagem BALB/cJ foi peculiar apresentando três picos, além de se estender por um período mais longo que as outras linhagens. Essa linhagem é moderadamente resistente, pois sua taxa de mortalidade foi intermediária àquelas apresentadas pelas linhagens A/J e C57Bl/6J.

Observamos também que a linhagem susceptível A/J teve um curso

parasitêmico sempre maior que a linhagem resistente C57Bl/6J, ao passo que a linhagem moderadamente resistente BALB/cJ apresentou uma parasitemia maior que as outras linhagens. Outra diferença apresentada pela linhagem BALB/cJ foi a inversão dos picos decorrentes das infecções pelos estoques de *T. cruzi*. Enquanto que, nas linhagens susceptível A/J e resistente C57Bl/6J o pico causado pela infecção pelo estoque TS foi mais precoce em relação ao pico causado pela infecção pelo estoque TC, na linhagem moderadamente resistente BALB/cJ a infecção pelo estoque TS causou um pico posterior ao pico causado pela infecção pelo estoque TC.

Verificamos que parasitemia pode não se correlacionar com taxa de mortalidade e com a resistência das linhagens de camundongos, pois a linhagem que apresentou maior parasitemia não foi a mais susceptível nem apresentou a maior taxa de mortalidade. Isso quer dizer que a alta parasitemia pode não ser obrigatoriamente relacionada à taxa de mortalidade das diferentes linhagens. Essa observação está de acordo com Minoprio et al (1989), mas contraria os resultados obtidos por Trischmann et al (1978) nos quais a parasitemia é proporcional à mortalidade das diferentes linhagens de camundongos infectados por formas sangüícolas. Outro fator apontado por Trischmann et al (1978) foi que as linhagens susceptíveis geralmente morrem no pico da parasitemia, o que não foi constatado em nossos experimentos e também não observado por Camargo, et al (1989) e Minoprio et al (1989). É importante salientar que Trischmann et al (1978) utilizaram a cepa Brazil de *T. cruzi* enquanto nós utilizamos a cepa Y, e, como se sabe, as linhagens de camundongos se comportam de maneira diferente frente à diferentes cepas (Kloetzel e Lafaille, 1983; Trischmann et al, 1978; Albright e Albright, 1989; Wrightsman et al, 1982).

Ao tentarmos induzir o fenômeno de resistência precoce nas linhagens A/J e BALB/cJ verificamos apenas uma proteção parcial, não reproduzindo a resistência refletida em indução de 100% de sobrevivência contra o inóculo da dose letal do estoque TS que ocorre na linhagem CBA/J.

A ausência do fenômeno de resistência precoce na linhagem A/J utilizando  $10^5$  formas dos estoques TC e TS pode ser explicado pelo fato de  $10^5$  formas do estoque TC por si já ser capaz de causar mortalidade. Nesse caso, a infecção pelas formas de cultura em uma dose supra-ótima seria efetivamente incapaz de acionar os

mecanismos responsáveis pela indução da resistência. Provavelmente por esse motivo, a linhagem BALB/cJ, que apresentou uma resistência igual/superior que a linhagem CBA/J no que diz respeito à mortalidade, não desenvolveu a resistência total, como em CBA/J infectados com os estoques TC+TS, sugerindo que cada linhagem tenha sua dose ótima de indução do fenômeno de resistência precoce.

Assim, quando inoculamos  $10^5$  formas do estoque TS em animais das linhagens A/J e BALB/cJ previamente imunizados com o estoque TC houve apenas prolongação no tempo de sobrevivência em ambas as linhagens, e que foi mais visível em camundongos BALB/cJ, demonstrando que a imunização prévia pelo estoque TC altera o perfil da infecção do estoque TS. Fica bem claro que, apesar de termos fixado a dose de indução de resistência em  $10^5$  formas dos estoques de *T. cruzi* e essa dose ser linhagem-específica, houve uma proteção, mesmo que parcial, vinculado a algum mecanismo diferencial e específico (Camargo et al, 1989) provocado pelo estoque TC.

Esse efeito da infecção por formas mantidas em cultura têm sido estudada principalmente no seu potencial indutor de proteção contra as formas sangüícolas e verificada através de taxa de mortalidade e parasitemia (Menezes, 1968; Hunt, 1967; Basombrio e Bususchio, 1982; Rowland e Ritter 1984). Todos esses trabalhos utilizaram protocolos de vacinação, pois a imunização foi feita em um período suficiente longo para a indução de produção de anticorpos. Mesmo assim, através desses trabalhos, podemos considerar que o inóculo prévio do estoque TC ative uma resposta imune que pode ser utilizada quando desafiamos com o estoque TS.

Em nosso trabalho, descartamos a ação de anticorpos específicos pois foi feita uma imunização prévia de um a três dias, período insuficiente para sua produção (Roitt, 1993).

Entretanto, a contribuição exata das células T na infecção inicial experimental pelo *T. cruzi* ainda não foi definida, mas trabalhos sugerem que seu efeito anti-parasita nas primeiras semanas precede a resposta mediada por anticorpos e é independente da sua produção (Trischmann, 1983; Trischmann, 1984). Assim, uma análise das subpopulações de células T poderia detectar alguma ativação diferencial que pudesse ser correlacionada com a proteção conferida pelo estoque TC.

Desse modo, conduzimos experimentos no sentido de caracterizar as subpopulações de células T auxiliares (CD4) e T citotóxicas/supressoras (CD8) a fim de

detectar diferenças nos seus percentuais e localização em órgãos linfóides em 24, 48 ou 72 hs (tempo estipulado para a indução do fenômeno de resistência precoce) provocada pela infecção com os estoques TC ou TS. Nesses experimentos utilizamos animais das linhagens A/J e BALB/cJ.

Como o parasita foi inoculado intramuscularmente, analisamos as subpopulações de linfócitos T do linfonodo poplíteo, que drena o local da infecção, e do baço, que é um órgão linfóide vinculado com a circulação sanguínea e representante da resposta imune sistêmica. Apesar da linhagem C57Bl/6J ser mais representativa do que a linhagem BALB/cJ, no que diz respeito à resistência à infecção pela cepa Y do *T. cruzi*, não pudemos continuar os estudos com camundongos dessa linhagem pela falta de disponibilidade.

Nossos resultados mostram que animais normais das linhagens A/J e BALB/cJ possuem porcentagens diferentes de linfócitos T. O baço da linhagem A/J possui maior número de células T CD4 que T CD8, enquanto que na linhagem BALB/cJ a proporção é igual. Minoprio et al (1989) também verificaram, através de separador de células (FACS), que a linhagem C57Bl/6J normal possui quantidade de linfócitos T CD4 de baço maior que de linfócitos T CD8. O linfonodo poplíteo de ambas linhagens também apresentaram maior número de linfócitos T CD4 que T CD8.

Este trabalho também revelou que a porcentagem dessas células em animais infectados com o inóculo dos estoques TC ou TS alteram quantitativamente as populações no baço e no linfonodo poplíteo nos três primeiros dias de infecção.

Constatamos que, nas linhagens A/J e BALB/cJ, o padrão do baço foi diferente do linfonodo poplíteo. Essa diferença pode ser explicada pela localização desses órgãos, uma vez que o linfonodo poplíteo recebeu uma carga antigênica maior e primeiramente que o baço, e também pelo papel diferente desses órgãos na infecção pelo *T. cruzi* (Curotto de Lafaille et al, 1990; Löwy et al, 1982).

Observamos que o baço de animais da linhagem A/J infectados com os estoques TC e TS apresentou uma redução no percentual de linfócitos T CD4. Por outro lado, o baço da linhagem BALB/cJ os linfonodos poplíteos de ambas linhagens apresentaram um aumento dessa população durante a infecção pelo estoque TC e uma redução durante a infecção pelo estoque TS. Nossos dados também apresentam valores

elevados de linfócitos T CD8 nas infecções pelos estoques TS na linhagem A/J, que somente ocorreram na linhagem BALB/cJ infectada com o estoque TC. sugerindo que os estoques provocam respostas imunológicas diferentes.

O fato dos resultados percentuais apresentados pela linhagem A/J serem diferentes dos apresentados pela linhagem BALB/cJ sugere que a resposta imune ao *T. cruzi* difere nas linhagens de camundongos, confirmando dados sobre susceptibilidade e resistência ao parasita (Trischmann, 1978; Nogueira et al, 1981; Trischman e Bloom, 1982;. Powell e Wasson, 1993).

Mesmo assim, as duas linhagens mostram redução das porcentagens de células T CD4 positivas no baço e linfonodos poplíteos durante a infecção pelo estoque TS e não pelo estoque TC. Uma vez que experimentos de infecção pelo *T. cruzi* utilizando camundongos nude ou depletados de linfócitos T CD4 mostram que essas células controlam a parasitemia (Minoprio et al, 1989; Russo e Satorbinas, 1991), essa redução pode contribuir para a maior parasitemia provocada pelo estoque TS comparado com o estoque TC.

A análise do curso da infecção provocada pelo estoque TS em animais da linhagem A/J que receberam imunização prévia do estoque TC (TC+TS) mostrou que não houve diferença entre as porcentagens de linfócitos T CD4 de animais imunizados e dos que receberam somente o estoque TS, tanto no baço como no linfonodo poplíteo. Entretanto a porcentagem de linfócitos T CD8 mostrou oscilações, sugerindo que a imunização pelo estoque TC pode influenciar essa subpopulação de células T.

Ao analisarmos animais da linhagem BALB/cJ que receberam os estoques TC+TS comparados àqueles que receberam apenas o estoque TS, observamos que a imunização prévia modifica a porcentagem de linfócitos T, reduzindo ainda mais a porcentagem de linfócitos T CD4 e elevando a porcentagem de linfócitos T CD8 apenas no baço, apontando para um importante papel dos linfócitos T CD8 na infecção pelo estoque TC.

Pelo fato da linhagem A/J ter se mostrado a mais susceptível, no que diz respeito à taxa de mortalidade, e praticamente não ter desenvolvido resistência com o inóculo dos estoques TC+TS, acreditamos que a carga antigênica administrada causou desequilíbrio no sistema imunológico que torna difícil a análise dos dados.

Já o fato da linhagem BALB/cJ ter desenvolvido certo grau de

resistência à infecção pelo estoque TS quando imunizamos previamente com o estoque TC, a análise do efeito do estoque TC pode fornecer dados que argumentem a resistência conferida por esse estoque. Observamos que, no baço e no linfonodo poplíteo, ele causa um efeito oposto ao estoque TS. Entretanto, quando inoculamos os estoques TC+TS, ocorre uma redução ainda maior da população de linfócitos T CD4, em ambos órgãos. Esse perfil de redução acompanha o padrão da infecção do estoque TS, sugerindo que a maior virulência desse estoque sobrepõe ao estoque TC. O mesmo é observado com os linfócitos T CD8.

A redução/aumento da porcentagem observada na população de células T CD4 e T CD8 do baço dos animais infectados, poderia ser explicada pela migração desse tipo celular para o sangue ou outros compartimentos do organismo. Entretanto a contagem diferencial de linfócitos/granulócitos de sangue periférico (Oliveira, tese de mestrado, 1995) mostraram que praticamente não há diferença na proporção dessas células entre animais normais e infectados pelos estoques TC e TS. Outra hipótese seria a migração dos linfócitos para a lesão tecidual muscular. Sun e Tarleton (1993) verificaram que a maior população celular do músculo esquelético de camundongos C57Bl/6J e C3H/HeJ infectados com a cepa Brazil era principalmente de linfócitos T CD8. Experimentos de Ribeiro dos Santos et al (1991) mostram que também há infiltração de linfócitos T CD4 e T CD8 na lesão do músculo cardíaco de animais infectados com o protozoário.

Nos experimentos de Verinaud (tese de doutorado, 1996) verificou-se a existência de muitas figuras mitóticas na medula óssea e o timo, também constatado por Minoprio et al (1989), o que sugere que essas células estão ativadas e produzindo linfocinas que podem agir na fase precoce da infecção, alterando o balanço do número de linfócitos.

Apesar da infecção pelo estoque TC não mostrar padrões de alterações celulares que pudessem inferir um sinergismo ou antagonismo com relação ao curso de infecção pelo estoque TC+TS, podemos sugerir que a infecção pelos estoques TC e TS causam uma cinética diferente na quantidade populacional dos linfócitos T CD4 e T CD8 do baço e linfonodos poplíteos, refletindo nos mecanismos que desencadeiam a ação dos linfócitos T citotóxicos/supressores, os quais estão comprometidos com a

resposta imune ao parasita na fase inicial da infecção, também sugerido por outros autores (Tarleton, 1990-1991-1992; Sun e Tarleton, 1993; Nickel et al, 1993).

Visto que o *T. cruzi* possui seu ciclo proliferativo intracitoplasmático, provavelmente ele induziria preferencialmente uma resposta imune mediada por células que expressem glicoproteínas codificadas pelo CHP da classe I (Tarleton, 1991), que é o caso dos linfócitos T CD8. Dessa forma, como os linfócitos T da linhagem BALB/cJ são aumentados pela infecção pelo estoque TC e reduzidas pela infecção pelo estoque TS (e aumentadas pela infecção pelos estoques TC+TS) podemos sugerir que a manutenção do tripanossoma em cultura de células possibilita o crescimento de clones com baixa virulência e que possuem um processamento vinculado ao CHP diferente do estoque TS. Esse fato poderia culminar na ativação preferencial de linfócitos T CD8 e que pode ser um dos mecanismos responsáveis pela resistência conferida pelo estoque TC.

Uma vez que o inóculo do estoque TC causa, opostamente do estoque TS, um aumento na porcentagem de linfócitos T CD4, pode ser proposto que a população parasitária decorrente da manutenção em cultura (TC) ative preferencialmente uma resposta imune mediada por células Th1, secretoras de IL-2 e IFN- $\gamma$  (Mosmann e Coffman, 1989), e os parasitas derivados de manutenção em camundongos (TS) desencadeie uma resposta mediada por linfócitos Th2, secretoras de IL-4, IL-5 e IL-10 (Mosmann e Coffman, 1989), como tem sido sugerido (Minoprio, 1991; Hontebeyrie-Joskowicz, 1991). Essa estimulação dos linfócitos Th1 causaria um direcionamento para uma resposta imune celular, refletida na ativação de linfócitos T CD8, conforme reportado anteriormente, culminando na proteção conferida por esse estoque frente ao inóculo da dose letal do estoque TS. Entretanto, como nossos experimentos não determinaram a dose ótima de indução do fenômeno da resistência precoce nas linhagens A/J e BALB/cJ, as nossas suposições aguardam confirmações.

Uma vez que o envolvimento dos linfócitos T CD8 no curso infeccioso provocado pelo *T. cruzi* tem sido muito estudado, principalmente no contexto do parasitismo intracelular e mecanismos efetores de resposta imune ligados aos componentes do CHP (Tarleton, 1991; Minoprio et al, 1989; Tarleton, 1992; Nickell et al, 1993; Vandekerckhove et al, 1994), e mesmo que trabalhos (Nickell et al, 1993) tenham relatado um potencial citotóxico das células T CD8, provavelmente essas

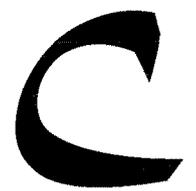
células possuam a ação refletida na produção de linfocinas, particularmente o IFN- $\gamma$ , como tem sido sugerido (Reed, 1988; Russo e Satorbinas, 1991; Vandekerckhove et al, 1994).

Nossos experimentos em análises imunohistoquímicas nos primeiros três dias de infecção não forneceram dados para que pudéssemos estabelecer correspondência com os resultados percentuais, uma vez que são dados qualitativos. Mesmo assim, na maioria dos cortes, a área ocupada por linfócitos T CD4 foi maior que a de linfócitos T CD8, similarmente aos resultados percentuais. Entretanto, não observamos uma distribuição diferencial ou particularizada dos tipos celulares de animais infectados em relação aos animais normais. Os linfócitos foram detectados, conforme reportado por Witmer e Steinman (1984), na corona, bainha periarteriolar e dispersas na polpa vermelha, havendo também a presença de linfócitos T CD4 na região folicular de linfócitos B em maior número que os linfócitos T CD8, como constatado por Nieuwenhuis e Opstelten (1984). É importante ser salientado que os órgãos de animais infectados foram do maiores que de animais normais, e, por esse motivo, as regiões de reações positivas podem parecer maiores.

Observamos adicionalmente que o linfonodo de animais de ambas linhagens infectadas pelo estoque TC apresentaram um considerável aumento do tamanho com relação aos normais e aos animais infectados pelos estoques TS ou TC+TS (como mostrado na Figura 7), sugerindo que esse estoque provocou um estímulo diferente ao estoque TS nesse órgão, e que pode ser devido à proliferação de linfócitos T CD4 e T CD8. Outro fator importante é que nos primeiros dias, o aumento é causado por edema e não por proliferação celular, como constatado por Szakal (1989) e Verinaud (tese de doutorado, 1996). Esses fatores podem contribuir para falta de correspondência dos resultados percentuais e análises histológicas.

O nosso conjunto de dados sugere que os dois estoques do parasita estimulam populações linfocitárias distintas. Visto que os linfonodos poplíteos de animais infectados pelo estoque TC se apresentaram maiores, devido ao aumento de células ou ao edema, acreditamos que as citocinas secretadas tenham um papel fundamental na diferenciação do processo infeccioso provocado pelos estoques TC e TS, refletido na taxa de mortalidade, parasitemia e porcentagem celular.

Esse resultado, somado à observação de que principalmente os linfócitos T CD8 sofrem ação diferenciada na infecção pelo estoque TC ou TS, certamente essas células desempenham um importante papel na indução do fenômeno de resistência precoce.

A large, bold, black letter 'C' with a slightly curved, modern font style.

onclusão

## Conclusões

1- A infecção causada pelo estoque TS causa maior mortalidade e parasitemia que a infecção pelo estoque TC.

2- As linhagens A/J, BALB/cJ e C57Bl/6J se comportam de modo distinto perante à infecção pelos estoques de *T. cruzi*, e, em nossas condições experimentais, as consideramos susceptíveis, moderadamente resistentes e resistentes, respectivamente.

3- A imunização prévia, com  $10^5$  formas de *T. cruzi* do estoque TC, induz o fenômeno de Resistência Precoce à infecção pelo estoque TS somente na linhagem CBA/J, mas confere certo grau de resistência nas linhagens A/J e BALB/cJ, alterando o perfil de mortalidade provocada pelo estoque TS.

5- A imunização com o estoque TC acentuou o perfil de redução/aumento observado no percentual de linfócitos T CD4 e T CD8 do baço e linfonodos poplíteos dos animais infectados com o estoque TS.

6- As linhagens apresentaram diferenças tanto na taxa de mortalidade, parasitemia e percentual de células T, demonstrando a diversidade entre as linhagens de camundongos, e enfatizando a importância desse conhecimento na elaboração de um

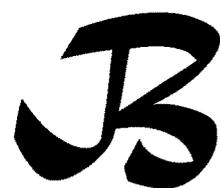
projeto experimental.

7- O estudo da população celular do baço e dos linfonodos poplíteos da fase inicial da fase aguda forneceu indicações de que já existe em 24hs uma ativação de fenômenos imunológicos que culminam em percentuais variados nos órgãos linfóides secundários, sendo essa ativação sistêmica.

8- Observações histológicas de órgãos linfóides de animais infectados revelaram um aumento na área ocupada pelos linfócitos T CD4 e T CD8, não sendo observadas diferenças histológicas entre linhagens ou devido à infecção pelos diferentes estoques TC e TS de *T. cruzi*, inclusive em animais que foram previamente imunizados com o estoque TC e desafiados com o estoque TS.

9- Somente os linfonodos poplíteos de animais infectados com o estoque TC apresentaram tamanho aumentado com relação ao controle, sugerindo uma estimulação antigênica diferenciada.

10 - O estudo da infecção pelo estoque TC ou TS em 24, 48 e 72 hs de infecção forneceu indicações que os mecanismos induzidos pelo estoque TC podem estar estimulando uma população linfocitária diferente daquela induzida pelo estoque TS.



ibliografia

## Bibliografia

- ALBRIGHT, J.W., ALBRIGHT, J.F. Immunological and Nonimmunological Control of Severity of *Trypanosoma musculi* Infections in C3H and C57Bl/6 Inbred Mice. **Infection and Immunity**, v.57, p.1647-1655, 1989.
- AMORIM, D.S. Cardiopatia Chagásica. **Ciência e Cultura** (Revista da Sociedade para o Progresso da Ciência), v.31, p.61-79, supl., 1979.
- ANDERSON, P.N., POTTER, M. Induction of Plasma Cell Tumor in BALB/C Mice with 2,6,10,14-Tetramethylpentadecane (Pristane). **Nature**, v.222, p.993-994, 1969.
- ANDRADE, Z.A. A Patogenia da Doença de Chagas. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, v.31, p.55-59, supl., 1979.
- ANDRADE, Z.A. Pathogenesis of Chagas' disease. **Research in Immunology**, v. 142, p. 125-181, 1991.
- ANSELMINI, A., MOLEIRO, F. Pathogenic Mechanisms in Chaga's Cardiomyopathy. In: **Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. Ciba Foundation Symposium. New York: Associated Scientific Publishers, 1974, p.124-136.

- ANDREWS, N.W., ABRAMS, C.K., SLATIA, S.L., GRIFFITHS, G. A *Trypanosoma cruzi* Secreted Protein Immunologically Related to the Complement C9: Evidence for Membrane Pore Forming Activity at Low pH. **Cell**, v.61, p.1277-1287, 1990.
- ARAÚJO, F.G., NASCIMENTO, E., MORATO, M.J.F. Immunization and Enhancement Properties of the Circulating Antigens of *Trypanosoma cruzi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.72, n.5, p.534-536, 1978.
- ARAÚJO-JORGE, T.C. The Biology of *Trypanosoma cruzi*-Macrophage Interaction. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, n. 4, p. 441-462, 1989.
- ARNHOLDT, A.C.V., SCHARFSTEIN, J. Immunogenicity of *Trypanosoma cruzi* Cysteine Proteinase. **Research in Immunology**, v. 142, p. 146-
- BASOMBRIÓ, M.A., BUSUSCHIO, S. *Trypanosoma cruzi* Culture Used as Vaccine to Prevent Chronic Chagas' Disease in Mice. **Infection and Immunity**, v.36, n.1, p.351-356, 1982.
- BASOMBRIÓ, M.A., BUSUSCHIO, S., COSSIO, P.M. Side Effects of Immunization with Live Attenuated *Trypanosoma cruzi* in Mice and Rabbits. **Infection and Immunity**, v.36, n.1, p.342-350, 1982.
- BELTZ, L.A, KIERSZENBAUM, F. Suppression of Human Lymphocyte Responses by *Trypanosoma cruzi*. **Immunology**, v. 60, p. 309-315, 1987.
- BERGROTH, V., REITAMO, S., KONTTINEN, Y.T., LALLA, M. Sensitivity and Nonspecific Staining of Various Immunoperoxidase Techniques. **Histochemistry**, v.68, p.170-172, 1980.

- BORGES, M.M., VASSAO, R., ANDRADE, S.G. Interferon-gamma Levels During the Course of *Trypanosoma cruzi* Infection of *Calomys callosus* (Rodentia-Cricetidae) and Swiss Mice. **Parasitology Research**, v.81, p.498-504, 1995.
- BRENER, Z. Alguns Aspectos da Imunidade Adquirida em Camundongos Experimentalmente Inoculados com *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.9, n.4, p.233-238, 1967.
- BRENER, Z. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Advanced Parasitology**, v.18, p.247-291, 1980.
- BRENER, Z., CHIARI, E. Susceptibilidade de Diferentes Amostras de *Trypanosoma cruzi* a Vários Agentes Quimioterápicos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.9, n.4, p.197-207, 1967.
- CAMARGO, I.J.B., SAKURADA, J.K., ZUCATO, M.R.L., ARAUJO, P.M.F., RANGEL, H.A. The Early Phase of the Immune Response of CBA Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Immunology Letters**, v.20, p.213-216, 1989.
- CAMARGO, I.J.B., ARAUJO, P.M.F., SAKURADA, J.K., STACH-MACHADO, D.R., RANGEL, H.A. *Trypanosoma cruzi*: Early Resistance Induced by Culture Derived Trypomastigotes. **Experimental Parasitology**, v. 73, p. 260-268, 1991.
- CARDILLO, F., VOLTARELLI, J.C., REED, S., SILVA, J.S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. **Infection and Immunity**, v.64, n.1, p.128-134, 1996.
- CAZZULO, J.J., COUSO, R., RAIMONDO, A., WERNSTEDT, C., HELLMAN, U. Further Characterization and Partial Amino Acid Sequence of a Cysteine Proteinase from *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.33, p.33-42, 1989.

- CERRONE, M.C., KUHN, R.E. Macrophage Regulation of Immune Response of Spleen Cells from Mice Infected with *Trypanosoma cruzi*. **Cellular Immunology**, v. 138, p. 423-436, 1991.
- CERRONE, M.C., RITTER, D.M., KUHN, R.E. 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. **Infection and Immunity**, v.60, n.4, p.1489-1498, 1992.
- CHAGAS, C. Carlos Chagas: In: **Coletânea de Trabalhos Científicos**. Brasília: Ed. Universidade de Brasília, 1981. p. 11-80.
- CLINTON, B.A., ORTIZ-ORTIZ, L., GARCIA, W., MARTINEZ, T., CAPIN, R. *Trypanosoma cruzi*: Early Immune Response in Infected Mice. **Experimental Parasitology**, v. 37, p. 417-425, 1975.
- CORSINI, A.C., COSTA, M.G., OLIVEIRA, O.L.P., CAMARGO, I.J.B., RANGEL, H.A. A Fraction (Fad) from *Trypanosoma cruzi* Epimastigotes Depresses the Immune Response in Mice. **Immunology**, v.40, p.505-511, 1980.
- CUNNINGHAM, D.S., KUHN, R.E. *Trypanosoma cruzi*-Induced Suppressor Substance. I. Cellular Involvement and Partial Characterization. **Journal of Immunology**, v.124, n.5, 1980.
- CUNNINGHAM, D.S., KUHN, R.E., TARLETON, R.L., DUNN, R.S. *Trypanosoma cruzi*: Effect on B-Cell-Responsive and Responding Clones. **Experimental Parasitology**, v.51, p.257-268, 1981.
- CULBERTSON, J.T., KESSLER, W.R. Age Resistance of Mice to *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology**, v.28, p.155-158, 1942.

- DIALINAS, D.P., QUAN, Z.S., WALL, K.A., PIERRES, A., QUINTÁNS, J., LOKEN, M.R., PIERRES, M., FITCH, F.W. Characterization of the Murine T Cell Surface Molecule Designated L3T4, Identified by Monoclonal Antibody GK1.5: Similarity of L3T4 to the Human LEU-/T4 Molecule. **Journal of Immunology**, v.131, n.5, p.2445-2451, 1983.
- EISEN, H., KAHN, S. Mimicry in *Trypanosoma cruzi*: Fantasy and reality. **Current Opinion in Immunology**, v.3, p.507-510, 1991.
- FISCHER, E., OUAISSI, M.A., VELGE, P., CORNETTE, J., KAZATCHKINE, M.D. gp58/68, a Parasite Component that Contributes to the Scape of the Tripomstigote Form of *T.cruzi* from Damage by the Human Alternative Complement Pathway. **Immunology**, v.65, p.299-303, 1988.
- GRAU, G.E., MODLIN, R.L. Immune Mechanisms in Bacterial and Parasitic Diseases: Protective Immunity Versus Pathology. **Current Oppinion in Immunology**, v.3, p.480-485, 1991.
- HANDA, K.R., SUZUKI, H., MATSUI, T., SHIMIZU, K., KUMAGAI. NK Cells as a Responder to IL-2. II. IL-2 Induced IFN- $\gamma$  Production. **Journal of Immunology**, v.130, p.988, 1983.
- HAUSCHKA, T.S. Sex of Host as a Factor in Chaga's Disease. **Journal of Parasitology**, v.33, p.399-404, 1947.
- HAYES, M.M., KIERSZEBAUM, F. Experimental Chagas' Disease: Kinects of Lymphocyte Responses and Immunological Control of The Transition from Acute to Cronic *Trypanosoma cruzi* Infection. **Infection and Immunity**, v.31, p.1117, 1981.

- HENDERSON, B., LOVERIDGE, N., ROBERTSON, W.R., SMITH, M.T. The Influence on Enzyme Activity of Storage of Tissue Blocks at -70°C. A Quantitative Cytochemical Study. **Histochemistry**, v.72, p.545-550, 1981.
- HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M., MINOPRIO, P. Chagas' disease: *Trypanosoma cruzi* vs. the Host Immune System. **Research in Immunology**, v. 142, p. 125-181, 1991.
- HOOGENBAAD, N.J., WRAIGHT, G.J. The Effect of Pristane on Ascites Tumor Formation and Monoclonal Antibody Production. **Methods in Enzymology**, v.121, p.375-381, 1986.
- HUDSON, L. Suggested Guildness for Work with live *Trypanosoma cruzi*. **Transation of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.77, n.3, p.416-419, 1983.
- HUNT, G.R. The Protection of Mice by "Corpus Christi" Strain of *Trypanosoma cruzi* When Challenged with "Brazil" Strain. **Journal of Parasitology**, v.53, n.3, p.657-659, 1967.
- JAMES, S.L., KIPINIS, T.L., SHER, A., HOFF, R. Enhanced Resistance to Acute Infection with *Trypanosoma cruzi* in Mice Treated with an Interferon Inducer. **Infection and Immunity**, v.35, n.2, p.588-593, 1982.
- JANEWAY, C.A.Jr. How the Immune System Recognizes Invaders. **Scientific American**, v.269, n.3, p.41-47, 1993.
- JOINER, K.A., DIAS DA SILVA, W., RIMOLDI, M.T., HAMMER, C.H., SHER, A. KIPINIS, T.L. Biochemical Characterization of a Factor Produced by Trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi* that Accelerates the Decay of Complement C3 Convertases. **Infection and Immunity**, n.23, p.11327-11335, 1988.

- KIERSZEBAUM, F., PEINKOWSKI, M. Thymus Dependent Control of Host Defense Mechanism Against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.24, p.117, 1979.
- KIERSZEBAUM, F., HAYES, M.M. Evaluation of Lymphocyte Responsiveness to Polyclonal Activators During Acute and Chronic Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v.29, p.708-710, 1980.
- KIERSZEBAUM, F., PEINKOWSKI, M. Thymus Dependent Control of Host Defense Mechanism Against *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.24, p.117, 1979.
- KIPNIS, T.L., CALICH, V.L.G., DIAS da SILVA, W. Active Entry of Bloodstream Forms of *Trypanosoma cruzi* into Macrophages. **Parasitology**, v.78, p.89-98, 1979.
- KLOETZEL, J.K., LAFAILLE, J.J. Strain Specific Protective Immunity Against *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Parasitology**, v.69, n.2, p.267-270, 1983.
- KOHLER, G., MILSTEIN, C. Continuous Cultures of Fused Cells Secreting Antibody of Predefined Specificity. **Nature**, v.256, p.495-497, 1975.
- KRETTLI, A.U. Aspectos Imunológicos da Doença de Chagas. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, Supl., v.31, p. 119-132, 1979.
- KRETTLI, A.U. Resposta Imune Humoral na Doença de Chagas. **Interciência**, v.8, n.6, p.374-383, 1983.
- KOBERLE, F. Chagas' Disease and Chagas' Syndromes: The Pathology of American Tripanosomiasis. **Advanced Parasitology**, v.6, p.63-116, 1968.

- LAGUENS, R.P., MECKET, P.C., CHAMBO, J. Origin and Significance of anti-Heart and anti-Skeletal Muscle Autoantibodies in Chagas' Disease. **Research in Immunology**, v. 142, p. 160163, 1991.
- LEITE DE MORAES, M.D.C., MINOPRIO, P., DARDENNE, M., SAVINO, W., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M. Endogenous IL-10 and IFN- $\gamma$  Production Controls Thymic Cell Proliferation in Mice Acutely Infected by *Trypanosoma cruzi*. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.39, p.51-58, 1994.
- LEVIN, M.J. Molecular Mimicry and Chagas' Heart Disease: High anti-R-13 Autoantibody Levels are Markers of Severe Chagas Heart Complaint. **Research in Immunology**, v. 142, p. 157-1159, 1991.
- MENEZES, H. Active Immunization of Dogs with a Non Virulent Strain of *Trypanosoma cruzi*. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v.11, n.4, p.258-263, 1969.
- MEYER, H. Cultura do *Trypanosoma cruzi* em Culturas de Tecidos. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, v.31, supl., p.49-54, 1978.
- MINOPRIO, P.M., EISEN, H., FORNI, L., D'IMPERIO-LIMA, M.R., JOSKOWICZ, M.S., COUTINHO, A. Polyclonal Lymphocyte Responses to Murine *Trypanosoma cruzi* Infection. Quantitation of Both T and B Cell Responses. **Scandinavian Journal of Immunology**, v.24, p.661-668, 1986.
- MINOPRIO, P.M., EISEN, H., JOSKOWICZ, Mireille, PEREIRA, Pablo, COUTINHO, Antonio. Suppression of Polyclonal Antibody Production in *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice by Treatment with Anti-L3T4 Antibodies. **Journal of Immunology**, v.139, n.2, p.545-550, 1987.

- MINOPRIO, P., ITOHARA, S., HEUSSER, C., TONEGEWA, S., COUTINHO, A. Immunobiology of Murine *T. cruzi* Infection: The Predominance of Parasite nonspecific Response and the Activation of TCRI T Cells. **Immunological Reviews**, v.112, p.183-207, 1989.
- MINOPRIO, P., CHEIKH, M.C.E., MURPHY, E., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ, M., COFFMAN, R., COUTINHO, A., O'GARRA, A. *Xid*-Associated Resistance to Experimental Chaga's Disease is IFN- $\gamma$  Dependent. **Journal of Immunology**, v.151, n.8, p.4200-4208, 1993.
- MOSMANN, T.R., CHERWINSKI, H., BOND, M.W., GIEDLIN, M.A., COFFMAN, R.L. Two Types of Murine Helper T Cell Clone. I. Definition According to Profiles of Lymphokine Activities and Secreted Proteins. **Journal of Immunology**, v. 136, p. 2348-2357, 1986.
- MUÑOZ-FERNÁNDEZ, M.A., FERNÁNDEZ, M.A., FRESNO, M. Synergism Between Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  and Interferon- $\gamma$  on Macrophage Activation for the Killing of Intracellular *Trypanosoma cruzi* Through a Nitric Oxide-Dependent Mechanism. **European Journal of Immunology**, v.22, p.301-307, 1992.
- NABORS, G.S., TARLETON, R.L. Differential Control of IFN- $\gamma$  and IL-2 Production During *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Immunology**, v.146, n.10, p.3591-3598, 1991.
- NEEFJES, J.J., MOMBURG, F. Cell Biology of Antigen Presentation. **Current Opinion in Immunology**, v.5, p.27-34, 1993.
- NICKELL, S.P., STRYKER, G., AREVALO, C. Isolation from *Trypanosoma cruzi*-Infected Mice of CD8+, MHC-Restricted Cytotoxic T Cells That Lyse Parasite-Infected Target Cells. **Journal of Immunology**, v.150, n.4, p.1446-1457, 1993.

- NOGUEIRA, N., ELLIS, J., CHAPLAN, S., COHN, Z. *Trypanosoma cruzi: In vivo and in vitro* Correlation Between T-Cell Activation and Susceptibility in Inbred Strains of Mice. **Experimental Parasitology**, v.51, p.325-334, 1981.
- ORTIZ-ORTIZ, L., PARKS, D.E., RODRIGUEZ, M., WEIGLE, W.O. Polyclonal B Lymphocyte Activation During *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Immunology**, v.124, n.1, p.121-124, 1980.
- PARNAM, P. Defense Cuts Begin to Bite. **Nature**, v. 356, n. 26, p. 291-292, March, 1992.
- PESSÔA, S.B.. Doença de Chagas. In: **Parasitologia Médica**, p.143-177. Rio de Janeiro. Guanabara Koogan S.A., 1982.
- PETRY, K., VOORHIS, W.C.Van. Antigens of *Trypanosoma cruzi* that Mimic Mammalian Nervous Tissues: Investigations of their Role in the Autoimmune Pathology of Chronic Chagas' Disease. **Research in Immunology**, v. 142, p. 151-156, 1991.
- PETRAY, P., ROTTEMBERG, M.E., GRINSTEIN, N.S., ORN, A. Release of Nitric Oxide During the Experimental Infections with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunology**, v.16, p.193-199, 1994.
- POWELL, M.R., WASSON, D.L. Host Genetics and Resistance to Acute *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **Parasite Immunology**, v.15, p.215-221, 1993.
- RAMOS, C., LAMOYI, E., FEOLI, M., RODRIGUES, M., PEREZ, M., ORTIZ-ORTIZ, L..*Trypanosoma cruzi*: Immunosuppressed Response to Different Antigens in the Infected Mouse. **Experimental Parasitology**, v.45, p.190-199, 1978.

- RANGEL, H.A., ARAÚJO, P.M.F., REPKA, D., COSTA, M.G. *Trypanosoma cruzi*: Isolation and Characterization of a Proteinase. **Experimental Parasitology**, v.52, p.199-209, 1981.
- REED, S.G. In vivo Administration of Recombinant IFN- $\gamma$  Induces Macrophage Activation and Prevents Acute Disease, Immunesuppression, and Death in Experimental *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Immunology**, v.140, n.12, p.4342-4347,1988.
- REED, S.G., BROWNELL, C.E., RUSSO, D.M., SILVA, J.S., GRABSTEIN, K.H., MORRISSEY, P.J. IL-10 Mediates Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Journal of Immunology**, v.153, p.3135-3140,1994.
- RIBEIRO-dos-SANTOS, R., PIRMEZ, C., SAVINO, W. Role of Autoreactive Immunological Mechanisms in Chagasic Carditis. **Research in Immunology**, v. 142, p. 134-137, 1991.
- RITTER, D.M., ROWLAND, E.C. Corpus Christi Strain-Induced Protection to *Trypanosoma cruzi* Infection in C3H(He) Mice: Effective Dose, Time, Route, and Number of Vaccinations. **Journal of Parasitology**, v.70, p.755-759, 1984.
- RODRIGUES, A.M., SANTORO, F., AFCHAIN, D., BAZIN, H., CAPRON, A. *Trypanosoma cruzi* Infection in B-Cell-Deficient Rats. **Infection and Immunity**, v.31, p.524-529, 1981.
- ROWLAND, E.C., RITTER, D.M. Corpus Christi Strain-Induced Protection to *Trypanosoma cruzi* Infection in C3H(He) Mice: Transfer of Resistance to Brasil Strain Challenge with Lymphocytes. **Journal of Parasitology**, v.?, p.?. April 1984.

- RUSSO, M., STAROBINAS, N. Macrophage Activation and Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Research in Immunology**, v. 142, p. 144-146, 1991.
- SANTOS BUCH, C.A., TEIXEIRA, A.R.L. The Immunology of Experimental Chagas Disease - III. Rejection of Allogeneic Heart Cells in vitro. **Journal of Experimental Medicine**, v.140, p.38-53, 1974.
- SCHMUNIS, G.A., GONZALES-CAPPA, S.M., TRAVERSA, O.C., YANOVSKY, J.F. The Effect of Immunodepression Due to Neonatal Thymectomy on Infections with *Trypanosoma cruzi*. **Transaction of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v.65, p.89. 1871.
- SCARFSTEIN, J., SCHECHTER, M., SENNA, M., PERALTA, J.M., MENDONÇA-PREVIATO, L., MILES, M.A. Trypanosma cruzi: Characterization and Isolation of a 57/51,000 m.w. Surface Glycoprotein (GP57/51) Expressed by Epimastigotes and Bloodstream Trypomastigotes. **Journal of Immunology**, v.137, n.4, p.1336-1341, 1986.
- SCOTT, M.T. The Nature of Immunity Against *Trypanosoma cruzi* in Mice Recovered from Acute Infection. **Parasite Immunology**, v.3, p.209-218, 1981.
- SILVA, G.R., LIVTOC, J., GOLDBAUM, M., DIAS, J.C.P. Aspectos da Epidemiologia da Doença de Chagas. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência, Ciência e Cultura, Supl.**, v.31, p. 81-103, 1979.
- SILVA, A.M.M., BRODSKYN, C.I., TAKEHARA, H.A., MOTA, I. Comparison Between the Antigenic Composition of Bloodstream and Cell Culture Derived Tripomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.21, p. 991-993, 1988.

- SOUZA, W. Ultra Estrutura do *Trypanosoma cruzi*. **Sociedade Brasileira para o Progresso da Ciência**, Ciência e Cultura, v.31, p.35-47, 1979.
- SOUZA, W., SOUTO-PADRÓN, T. *Trypanosoma cruzi*: Retrato de um Invasor. **Ciência Hoje**, n.4, p.42-49, 1983.
- SPINELLA, S., MILON, G., HONTEBEYRIE-JOSKOWICZ. A CD4+ Th2 Cell Line Isolated from Mice Chronically Infected with *Trypanosoma cruzi* Induces IgG<sub>2</sub> Polyclonal Response *in vivo*. **European Journal of Immunology**, v.20, p.1045-1051, 1990.
- SUN, J., TARLETON, R.L. Predominance of CD8+ T Lymphocyte in the Inflammatory Lesions of Mice with Acute *Trypanosoma cruzi* Infection. **American Journal of Medicine and Hygiene**, v.48, n.2, p.161-169, 1993.
- TAKEHARA, H.A., PERINI, A., SILVA, M.H., MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: Role of Different Antibody Classes in Protection Against Infection in the Mouse. **Experimental Parasitology**, v.52, p.137-146, 1981.
- TANOWITZ, H.B., MINATO, N., LALONDE, R., WITTNER, M.. *Trypanosoma cruzi*: Correlation of Resistance and Susceptibility in Infected Inbred mice with the *in vivo* Primary Antibody Response to Sheep Red Blood Cells. **Experimental Parasitology**, v.52, p.233-242, 1981.
- TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi* Induced Suppression of IL-2 Production. I.Evidence for the Presence of IL-2 Producing Cells. **Journal of Immunology**, v. 140, n. 8, p. 2763-2768, April 15, 1988.
- TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi* Induced Suppression of IL-2 Production. II.Evidence for a Role for Suppressor Cells. **Journal of Immunology**, v. 140, n. 8, p. 2768-2773, April 15, 1988.

- TARLETON, R.L. Depletion of CD8+ T Cells Increases Susceptibility and Reverses Vaccine-Induced Immunity in Mice Infected With *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Immunology**, v.144, n.2, p.717-724, 1990.
- TARLETON, R.L. The Role of T-Cell Subpopulations in Experimental Chagas' Disease. **Research in Immunology**, v. 142, p. 130-133, 1991.
- TARLETON, R.L. Regulation of Immunity in *Trypanosoma cruzi* Infection. **Experimental Parasitology**, v.73, p.106-109, 1991.
- TARLETON, R.L., KOLLER, B.H., LATOUR, A., POSTAN, M. Susceptibility of a  $\beta$ 2-Microglobulin Deficient Mice to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Nature**, v. 356, n. 26, p. 338-340, March, 1992.
- TEIXEIRA, A.R.L. In: **Imune Response in Parasitic Infections: Immunology, Immunopathology, and Immunoprophylaxis. VIII: Protozoa**. CRC Press. Inc. Florida, 1987, p.26-118.
- TOWNSEND, A., BODNER, H. Antigen Recognition by Class I Restricted T Lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 7, p. 601-624, 1989.
- TRISCHMANN, T., BLOMM, B.R. Genetics of Murine Resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**, v.35, n.2, p.546-551, 1982.
- TRISCHMANN, T. *Trypanosoma cruzi*: Ability of T Cell Enriched and -Depleted Lymphocyte Populations to Passively Protect Mice. **Experimental Parasitology**, v.49, p. 225, 1980.
- TRISCHMANN, T.M. Non-Antibody-Mediated Control of Parasitemia in Acute Experimental Chagas' Disease. **Journal of Immunology**, v.130, n.4, p.1953-1957, 1983.

- TRISCHMANN, T.M. Role of Cellular Immunity in Protection Against *Trypanosoma cruzi* in Mice. **Parasite Immunology**, v. 6, p. 561-570, 1984.
- TRISCHMANN, T.M., TANOWITZ, H., WITTNER, M., BLOOM, B.. *Trypanosoma cruzi*: Role of the Immune Response in the Natural Resistance of Inbred Strains of Mice. **Experimental Parasitology**, v.45, p.160-168, 1978.
- VANDEKERCKHOVE, F., DARJI, A., RIVERA, M., CARLIER, Y., VRAY, B., BILLIAY, A., de BAETSELIER, P. Modulation of T-Cell Responsiveness During *Trypanosoma cruzi* Infection: Analysis in Different Lymphoid Compartments. **Parasite Immunology**, v.16, p.77-85, 1994.
- WILLCHEK, M., BAYER, E. A. The Avidin Biotin Complex in Immunology . **Immunology Today**, v. 5, p. 39-43, 1984.
- WRIGHTSMAN, R., KRASSNER, S., WATSON, J. Genetic Control of Responses to *Trypanosoma cruzi* in Mice: Multiple Genes Influencing Parasitemia and Survival. **Infection and Immunity**, v.36, n.637-644, 1982.2, p
- ZELEDÓN, Rodrigo. Epidemiology, modes of transmission and reservoir hosts of Chaga's disease. In: **Trypanosomiasis and Leishmaniasis**. Ciba Foundation Symposium. New York: Associated Scientific Publishers, 1974, p. 51-85.



**A**

pêndice

# Apêndice

## **Isolador**

Apesar dos isoladores ainda não serem de uso (e acesso) comum nas universidades do Brasil, a tendência mundial é que todas as pesquisas que utilizem animais experimentais recorram a essa fonte, pois seriam diminuídas as dificuldades de produção-reprodução de resultados uma vez que a microfauna, ambiente e antígenos orais poderiam ser controlados.

Os isoladores são bolhas de plástico que impedem que o ambiente externo entre em contato com o ambiente interno. O ar passa por filtros que retêm partículas de até  $0,3\mu$ , fica estéril e é lançado por um motor de insuflamento de 2800rpm no interior da bolha, sendo então retirado por uma saída que também contém filtros para medida de segurança. O ar assim é renovado num ciclo de aproximadamente 18 vezes por hora, impedindo o acúmulo de amônia. A entrada e a saída do ar pode ser regulada de tal modo que haja uma pressão interna maior que a externa (pressão positiva) e no caso de haver algum dano no plástico, esse poderá ser reparado sem o comprometimento do ambiente interno uma vez que o ar tenderá a sair. Até o presente momento não há estudos enfocando uma possível influência dessa pressão na fisiologia dos animais mantidos no isolador.

Os isoladores servem portanto para a manutenção de animais gnotobióticos e SPF, protegendo-os de qualquer contaminação que possa vir do meio ambiente externo. Dessa maneira fica possibilitada a pesquisa onde a resposta a um determinado agente é singular, livre de respostas cruzadas ou sinérgicas.

Todos os experimentos foram feitos com animais mantidos no interior de isoladores tipo Texler produzidos no CEMIB/UNICAMP.

### **Acomodação**

Para a acomodação de animais de pequeno porte como camundongos, normalmente são utilizadas caixas de plástico forradas com palha de madeira. A finalidade da palha (maravalha) é possibilitar material para construção de ninhos, além de evitar que os animais se sujem com os detritos, também funcionando como isolante térmico. Esse material deve ser autoclavado e trocado pelo menos duas vezes por semana (conforme a necessidade), sendo então incinerado.

O material disponível no mercado, e por nós utilizado, consiste em caixas feitas de plástico polipropileno.

Quanto à população por caixa, esta deve obedecer à observação de domínios territoriais da espécie e contatos sociais pois uma superpopulação pode culminar em canibalismo, além do desconforto e estresse do animal. Adotaremos a quantidade de até 10 camundongos/caixa.

### **Alimentação**

A alimentação foi feita através do depósito de ração autoclavada na grade da tampa da caixa. O bebedouro, em forma de mamadeira com bico de inox, foi colocado na grade.

As indústrias disponíveis no mercado que podem fornecer as rações próprias para animais de laboratório. Nós utilizaremos a ração "NUVITAL CR-1 autoclavável", COD 6003, proveniente de Nuvital Nutrientes S/A.

### **Eutanásia**

Para o sacrifício dos animais utilizaremos a câmara de éter. A câmara de éter é o meio mais comum para sacrificar numerosos tipos de roedores mas apresenta muitas desvantagens. É irritante para a pele e mucosas, causando congestão e edema pulmonar, além de ter odor desagradável estressando o animal, e também pode causar alterações no hematócrito. Tem alto risco de explosão e isso é relevante quando se anestesia um número muito grande de animais fazendo

estocagem em freezer antes de sua incineração, pois os animais ficam impregnados de éter que pode explodir com uma simples faísca das conexões do refrigerador. As mucosas do trato respiratório são severamente afetadas dificultando análises histológicas dessas regiões.

Escolhemos o éter pois iremos trabalhar com os órgãos linfóides e, até o presente, não há recomendação bibliográfica contrária a esse procedimento. Outro motivo de seu uso foi a facilidade de manipulação e baixo custo/trabalho comparado aos outros procedimentos.

### **Anticorpos monoclonais e hibridomas**

Numerosos anticorpos monoclonais que definem diferenciações de leucócitos e moléculas de superfície celular tem sido desenvolvidos, sendo que uma série de anticorpos monoclonais para marcadores de membrana T são utilizados para delimitação de populações funcionais de células. Em 1989 o “International Workshop on Human Leukocyte Differentiation Antigens” identificou muitos grupos e subgrupos de CDs (cluster of differentiation) reconhecidos por vários anticorpos monoclonais. A invenção da técnica de produção de imunoglobulinas monoclonais por hibridização de células somáticas descrita por Köhler e Milstein, em 1975, revolucionou a imunologia. Em reconhecimento a isso, eles foram contemplados com o Prêmio Nobel de Medicina em 1984, juntamente com Niels Jerne.

As imunoglobulinas monoclonais são obtidas pela fusão de plasmócitos normais, produtores de imunoglobulinas, com células de plasmacitomas (células tumorais) que perderam esta capacidade, mas podem ser mantidas indefinidamente em cultura de tecidos. O resultado é um hibridoma secretor de imunoglobulinas. Ainda que a produção de hibridomas seja discutida mais amplamente em estágios de preparação de anticorpos monoclonais, a maioria dos passos foram analisados em detalhes que hoje já são rotinas. Um hibridoma pode ser formado então pela fusão de uma simples suspensão celular (de esplenócitos ou linfócitos de ratos ou camundongos imunizados) com células de tumor (mielomas ou linfomas). Um grande número de células são expandidas para a produção de anticorpo. Intensivos estudos imunoquímicos e sorológicos são também feitos para aumentar a especificidade do anticorpo.

As linhagens de hibridomas por nós utilizadas foram:

- a) GK1.5 - anti CD4+ de camundongo produzida pela linhagem de célula tumoral de rato GK1.5. Esse anticorpo reconhece molécula de superfície de linfócito T designada L3T4, de peso molecular de 52.000, que é expressa em aproximadamente 20% dos esplenócitos (Dialynas et al, 1983). Perfizemos todos os experimentos utilizando uma diluição de 1/1.000 em solução salina,
- b) Y2S - produz anti CD8 de camundongo produzido pela linhagem de célula tumoral de rato YTS 169 mantida em cultura. Utilizamos também a diluição de 1/1000 em solução salina.

Grandes quantidades de anticorpos podem ser produzidos em sobrenadantes de culturas de hibridomas ou por fluidos ascíticos em camundongos singeneicos ou não. Assim, duas diferentes metodologias são empregadas para melhorar a produção mais concentrada de anticorpos monoclonais para a obtenção de reagentes. Primeiramente, avanços da tecnologia de condições de cultura para células de hibridomas podem proporcionar altas produções de sobrenadantes de cultura. O sobrenadante pode ser concentrado cerca de 10 vezes por precipitação com sulfato de amônia. A concentração do anticorpo pode também ser aumentada pela liofilização após uma filtração parcial por gel-filtração, cromatografia de troca iônica ou cromatografia de afinidade.

A descoberta de camundongos mutantes nus (descrito brevemente por Isaacson e Cattanaach, 1962) foi descrito detalhadamente por Flanagan em 1966. A genética da mutação confirmou que a perda do pelo foi determinada por um gene recessivo autossômico o qual Flanagan denominou de nude e simbolizou como nu. A importância desse animal mutante na pesquisa biomédica foi reconhecida quando Panterlouris em 1968 reportou que, excepcionalmente por um resquíio rudimentar, não havia timo. Essa descoberta foi muito importante no estudo de dicotomia do sistema imune de mamíferos e das relações dos diferentes tipos de células T e B. Logo após a descoberta da aplasia tímica em camundongos nude, Rygaard e Povlsen (1969) reportaram sucesso no transplante de tumores malignos humanos nesses animais. Essa observações começaram uma nova era na pesquisa oncológica proporcionando um modelo natural vivo para o estudo de neoplasmas. O crescimento de espécies de hibridomas produtores de anticorpos em animais nude para o aumento da

concentração de anticorpos monoclonais pode ser considerado uma terceira aplicação importante dos animais nude. O nude é utilizado quando há a necessidade de se obter anticorpos monoclonais de uma linhagem celular de uma espécie diferente do receptor. Dessa maneira, o nude imunodeficiente não rejeitará as células do hibridoma de um animal de outra espécie no processo de formação do ascite. Como existe o problema de manutenção do nude (uso de isoladores e difícil criação pois não procriam), alguns métodos podem ser adaptados.

### **Imunoperoxidase**

O método que utilizaremos denomina-se ABC ou avidina-biotina-peroxidase (imunoperoxidase). Essa técnica pode ser aplicada a amostras de células (Bergroth et al, 1980) ou secções de tecidos congelados (Henderson et al, 1981).

A avidina é uma glicoproteína de peso molecular 68.000 com uma afinidade extraordinariamente alta ( $10^9$  M) pela vitamina biotina de baixo peso molecular (Wilchek, 1984). Pela sua afinidade ser acima de um milhão de vezes maior do que do Ac pela maioria dos antígenos, a ligação da avidina à biotina (similar à interação Ag-Ac) é essencialmente irreversível. Em adição à essa alta afinidade, o sistema avidina-biotina pode ser efetivamente explorado pelo fato da avidina ter quatro sítios de ligação pela biotina, e a maioria das proteínas (incluindo Ac e enzimas) pode ser combinada com muitas moléculas de biotina.

Os componentes dessa reação são:

1- Anticorpo Primário:

Fornecido de ascite de hibridoma de rato

2- Anticorpo Secundário:

anti IgG de rato biotinilada adsorvida em camundongo produzida em coelho

Vector Laboratories - USA / cat nº Ba-4001, Lot. nº D0113

3- Streptoavidina / 'Horseradish peroxidase' Biotinilada

DAKO Corporation - USA / code nº K377

4- DAB (solução de substrato para peroxidase)

A dinâmica da reação ocorre como se segue: quando os tecidos, ou semeadura celular, reagem primeiramente com esse Ac. primário (1) dirigido contra o antígeno celular. Sobre ele é colocado o Ac. secundário (2), que é uma imunoglobulina

anti-Ac.primário-biotinilada, e caso tenha havido o reconhecimento da proteína marcadora pelo Ac. primário, haverá a sucessiva ligação. O passo seguinte é adicionar a mistura de estreptoavidina-biotina-peroxidase (3), que vai se ligar à biotina do Ac. secundário. Por último adiciona-se o substrato da enzima peroxidase (4). Caso tenha havido reconhecimento do antígeno celular pelo anticorpo primário haverá ligação entre todas as etapas, visualizada pela degradação do substrato.

### **Reagentes**

a) Para inativação da peroxidase endógena:

Como existem riscos de interferência das peroxidases endógenas, no caso do método de imunoperoxidase, quando se utiliza órgãos ricos em peroxidase, como o baço, faremos um bloqueio com  $H_2O_2$  3% diretamente na lâmina. No caso de cortes de tecido congelado utilizamos o banho de metanol- $H_2O_2$  por 20 minutos.

b) Para lavagem dos cortes e células em lâminas:

PBS - tveem 20 (1%) - pH7,2

PBS - tween 20 (1%) - leite desnatado (5%) - pH7,2

c) Para o bloqueio:

PBS - tween 20 (1%) - leite desnatado (5%) - SBF(20%) - pH7,2

d) Para as diluições dos anticorpos primários e secundários:

PBS - BSA (1%) - pH7,2

e) Para diluição da avidina-biotina-peroxidase:

tampão Tris-HCl - pH7,2

f) Para diluição da substância reveladora 3-3-diamino benzidina:

tampão Tris-HCl - pH7,2

### **Tabelas**

As Tabelas seguintes apresentam os dados percentuais obtidos pela contagem das células T CD4 ou T CD8, reveladas através da técnica de imunoperoxidase, juntamente com o erro padrão médio e os valores que apresentaram diferença estatisticamente significantes..

Órgão	Infecção	% T (CD4)	% T (CD8)	
Baço	C (controle)	23.89 ± 1.69	15.98 ± 0.96	
	TC 24	16.20 ± 1.36*	18.19 ± 3.05	
	48	16.97 ± 2.24*	16.48 ± 3.30	
	72	19.60 ± 1.87*	17.96 ± 1.87	
	TS 24	15.87 ± 3.11*	21.11 ± 2.81*	
	48	19.37 ± 0.69*	24.74 ± 1.92*	
	72	13.80 ± 1.57*	16.39 ± 0.72	
	Linfonodo H	C (controle)	44.53 ± 1.13	26.77 ± 2.59
		TC 24	38.38 ± 3.39*	27.70 ± 1.66
48		56.89 ± 1.74*	29.63 ± 5.46	
72		48.87 ± 3.53	26.68 ± 2.48	
TS 24		33.83 ± 2.34*	34.27 ± 3.06*	
48		33.36 ± 3.42*	23.29 ± 4.24	
72		29.87 ± 2.57*	30.53 ± 1.72	
Linfonodo CT		C (controle)	44.53 ± 1.13	26.77 ± 2.59
		TC 24	48.80 ± 3.14	29.79 ± 8.73
	48	50.37 ± 3.95	27.77 ± 2.12	
	72	47.96 ± 4.24	29.58 ± 3.60	
	TS 24	40.47 ± 3.85	25.49 ± 1.89	
	48	44.93 ± 1.20	21.90 ± 3.92	
	72	28.72 ± 4.20*	25.07 ± 4.39	

Tabela 3 - Porcentagem de linfócitos T de baço e linfonodo poplíteo de camundongos da linhagem A/J.

\* diferença estatisticamente significante,  $0.01 < p < 0.1$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $T_c = 2.57$  (teste *t*-student)

Órgão	Infecção	% T (CD4)	% T (CD8)	
Baço	C (controle)	23.14 ± 1.05	25.06 ± 1.29	
	TC 24	22.88 ± 3.48	20.94 ± 0.55*	
	48	25.15 ± 3.04	30.06 ± 1.44*	
	72	28.35 ± 3.80	25.95 ± 1.99	
	TS 24	20.70 ± 2.18	22.16 ± 2.28	
	48	20.71 ± 1.12*	24.93 ± 2.01	
	72	13.86 ± 1.12*	13.87 ± 2.35*	
	Linfonodo H	C (controle)	38.47 ± 0.89	21.66 ± 1.97
		TC 24	46.26 ± 2.71*	22.49 ± 2.85
48		49.82 ± 1.53*	22.52 ± 1.84	
72		40.34 ± 2.21	31.51 ± 2.78*	
TS 24		45.49 ± 4.47*	24.70 ± 1.48	
48		37.69 ± 6.50	22.07 ± 2.29	
72		28.84 ± 3.19*	19.49 ± 2.46	
Linfonodo CT		C (controle)	38.47 ± 0.89	21.66 ± 1.97
		TC 24	46.98 ± 2.27*	26.52 ± 3.47
	48	54.19 ± 2.11*	26.82 ± 2.97	
	72	NR	NR	
	TS 24	49.12 ± 3.84*	29.39 ± 0.68*	
	48	42.13 ± 4.95	24.46 ± 2.94	
	72	NR	NR	

Tabela 4 - Porcentagem de linfócitos T de baço e linfonodo poplíteo de camundongos da linhagem BALB/cJ.

\* diferença estatisticamente significativa,  $0.01 < p < 0.1$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $T_c = 2.57$  (teste *t*-student)

\*\*NR = não realizado

Órgão	Horas	% CD4		% CD8	
		TS (controle)	TCTS	TS (controle)	TCTS
Baço	24	15.87 ± 3.11	18.55 ± 0.04x	21.11 ± 2.81	19.46 ± 0.86
	48	19.37 ± 0.69	18.48 ± 1.20	24.74 ± 1.80	14.96 ± 1.80*
	72	13.80 ± 1.57	16.99 ± 2.92	16.39 ± 0.72	19.44 ± 0.93*
Linfonodo H	24	33.83 ± 2.34	30.99 ± 2.25	34.27 ± 3.06	22.24 ± 1.93*
	48	33.36 ± 3.42	32.02 ± 2.31	23.29 ± 4.24	32.66 ± 2.72*
	72	29.87 ± 2.57	NR	30.53 ± 1.72	NR
Linfonodo CT	24	40.47 ± 3.85	39.05 ± 4.07	25.49 ± 1.89	28.30 ± 0.81
	48	44.93 ± 1.20	25.72 ± 1.39	21.90 ± 3.92	23.21 ± 3.47
	72	28.72 ± 4.20	NR	25.07 ± 4.39	NR

Tabela 5 - Comparação entre os percentuais de linfócitos T de camundongos da linhagem A/J infectados somente com o estoque TS e camundongos imunizados com o estoque TC e depois infectados com o estoque TS.

\* diferença estatisticamente significativa,  $0.01 < p < 0.1$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $T_c = 2.57$  (teste *t*-student)

\*\* NR = não realizado

Órgão	Horas	% CD4		% CD8	
		TS (controle)	TCTS	TS (controle)	TCTS
Baço	24	22.16 ± 2.28	19.26 ± 0.95	20.70 ± 2.18	27.11 ± 1.99*
	48	24.63 ± 2.01	16.93 ± 0.66*	20.71 ± 1.12	23.77 ± 1.04*
	72	13.87 ± 2.35	10.70 ± 0.99	13.86 ± 1.61	17.98 ± 2.60
Linfonodo H	24	45.49 ± 4.47	31.41 ± 1.20*	24.70 ± 1.48	27.52 ± 6.29
	48	37.69 ± 6.50	32.26 ± 1.70	22.07 ± 2.29	20.18 ± 2.25
	72	28.84 ± 3.19	NR	19.46 ± 2.46	NR
Linfonodo CT	24	49.12 ± 3.84	36.70 ± 3.41*	29.39 ± 0.68	31.95 ± 3.75
	48	42.13 ± 4.95	29.90 ± 1.33*	24.46 ± 2.94	20.14 ± 1.85
	72	NR	NR	NR	NR

Tabela 6 - Comparação entre os percentuais de linfócitos T de camundongos da linhagem BALB/cJ infectados somente com o estoque TS e camundongos imunizados com o estoque TC e depois infectados com o estoque TS.

\* diferença estatisticamente significativa,  $0.01 < p < 0.1$ ,  $\alpha = 0.05$ ,  $T_c = 2.57$  (teste *t*-student)

\*\* NR = não realizado