

DELMA PEGOLO ALVES

“ *Trypanosoma cruzi* : A influência dos linfócitos T
na regulação da infecção experimental em camundongo SCID.”

Este exemplar corresponde à redação final da tese defendida pelo(a) candidato(a) <i>Delma Pegolo Alves</i> e aprovada pela Comissão Julgadora. <i>29/12/98</i> <i>Julia Sakurada</i>

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

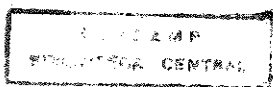
Orientadora : Profa. Dra. JÚLIA KEIKO SAKURADA

Campinas - Estado de São Paulo

1998

AL87t

37306/BC



9909019

UNIDADE	BC
N.º CHAMADA:	T 15 Am?
V.	A. 82
TOMBO BC/	37306
PROC.	229/99
C	☐
D	☒
PREÇO	R\$ 11,00
Data	16/04/99
N.º CDU	

CM-00122517-9

FICHA CATALOGRAFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DO INSTITUTO DE BIOLOGIA - UNICAMP

Alves, Delma Pegolo

A87t *Trypanosoma cruzi*: a influência dos linfócitos T na
regulação da infecção experimental em camundongo
SCID/Delma Pegolo Alves.-- Campinas, SP:[s.n.], 1998.
85f.:ilus.

Orientadora: Júlia Keiko Sakurada

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas.
Instituto de Biologia.

1. Linfócitos. 2. *Trypanosoma cruzi*. 3. Camundongo como animal
de laboratório. I. Sakurada, Júlia Keiko. II. Universidade Estadual de
Campinas. Instituto de Biologia. III. Título.

LOCAL E DATA: Campinas, 09 de Dezembro de 1998

Banca Examinadora:

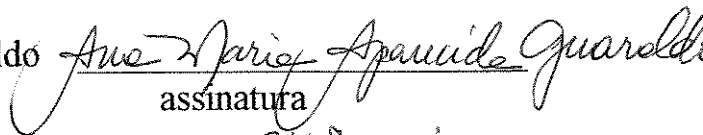
Titulares:

Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada



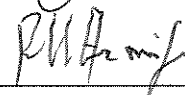
assinatura

Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo



assinatura

Prof. Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo



assinatura

Suplente:

Profa. Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado

assinatura

*A Deus
pelas infinitas bênçãos.*

*“Lâmpadas para os meus pés é tua
palavra, e luz para o meu caminho”.
Salmos 119:105*

*À Ana Carolina,
a benção mais alta que
Deus me concedeu*

*Ao meu marido, Adilson,
pelo carinho, incentivo e apoio*

*Aos meus pais Dirce e Antonio,
pela minha formação moral e espiritual*

Agradecimentos

À Profa. Dra. Júlia Keiko Sakurada, minha orientadora agradeço pela importante contribuição na minha vida profissional, pela orientação segura, e pelos conhecimentos transmitidos.

Aos Professores Dr. Paulo Maria Ferreira de Araújo, Dra. Dagmar Ruth Stach-Machado, Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, pelas valiosas críticas e sugestões na análise prévia deste trabalho.

À Coordenação da SCPG do Departamento de Imunologia pela atenção.

A todos os Professores do Departamento de Imunologia pelos ensinamentos.

Aos Colegas do curso de Pós-graduação pelo apoio.

À Profa. Dra. Ana Maria Aparecida Guaraldo, pela desprendimento em auxiliar o próximo, pelas palavras sábias, pelo apoio e incentivo na elaboração deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Humberto de Araújo Rangel, pelo pioneirismo na implantação de um Centro de Bioterismo.

Ao Prof. Dr. Jean Louis Guénet do Instituto Pasteur de Paris, pela colaboração com o bioterismo no Brasil, e doação das matrizes de camundongos C.B-17 scid/scid.

À Cristina, Dirce, Márcia e Rosimeire pela disposição e colaboração nas diversas etapas deste trabalho.

A todos os técnicos do Centro de Bioterismo - CEMIB sempre dispostos à novas conquistas.

Aos amigos mui especiais: Luiz Augusto, Rovilson, Lenira, Maria Inês, Sônia, Daniele e Armando que em diferentes momentos sempre me apoiaram.

Às Instituições financiadoras deste projeto: Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP e Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq.

Ao Centro de Bioterismo- CEMIB - UNICAMP.

Ao Departamento de Microbiologia e Imunologia do Instituto de Biologia da UNICAMP.

ÍNDICE DE GRÁFICOS

GRÁFICOS

Pag.

Fig.:1 (A) Perfil de Parasitemia em camundongos SCID e BALB/c/Uni infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* de cultura por animal. **(B)** Sobrevida de camundongos SCID e BALB/c/Uni infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal.

25

Fig.:2 Índice de Proliferação celular. As células esplênicas de camundongos SCID e BALB/c/Uni foram estimuladas “in vitro” em diferentes dias, com *Trypanosoma cruzi*.

26

Fig.:3 Produção de IFN- γ nos camundongos SCID **(A)** e BALB/c/Uni **(B)** infectados com 10^2 forma de *Trypanosoma cruzi*. Unidades de IFN- γ foram determinadas nos sobrenadantes de células esplênicas (5×10^6 células/ml) estimuladas com tripomastigotas de cultura celular (10^5 /ml).

27

Fig.:4 Produção de NO em sobrenadantes de culturas de células esplênicas “in vitro”. As células esplênicas de camundongos SCID e BALB/c/Uni foram estimuladas com *Trypanosoma cruzi*.

28

Fig.:5 (A) Influência dos linfócitos B no perfil de parasitemia em camundongos infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. BALB/c nu/nu e SCID (controles). SCID reconstituídos com 1×10^6 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(a) e 1×10^7 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(b). **(B)** Sobrevida de camundongos infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. BALB/c nu/nu e SCID (controles). SCID reconstituídos com 1×10^6 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(a) e 1×10^7 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(b).

32

Fig.:6 Influência da reconstituição celular, dois dias antes da infecção com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. (A) SCID reconstituídos com 5×10^6 células esplênicas/animal, enriquecida com linfócitos T $\Rightarrow$ SCID/enr.T. (B) SCID reconstituídos com linfócitos T, 2×10^6 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(a) e 8×10^5 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(b). (C) Efeito da reconstituição com 5×10^6 células esplênicas/animal enriquecida com linfócitos T no 5° e 10° dpi.

33

Fig.:7 Influência da reconstituição celular na sobrevida de camundongos, dois dias antes da infecção com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. (A) SCID reconstituídos com 5×10^6 células esplênicas/animal, enriquecida com linfócitos T $\Rightarrow$ SCID/enr.T. (B) SCID reconstituídos com linfócitos T, 2×10^6 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(a) e 8×10^5 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(b). (C) Efeito da reconstituição com 5×10^6 células esplênicas/animal enriquecida de linfócitos T no 5° e 10° dpi.

34

Fig.:8 Influência dos linfócitos T $CD4^+$ e T $CD8^+$ em camundongos SCID infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi*. (A) SCID (controle). SCID transplantados com 5×10^6 timócitos/animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (a) e repopulados no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (a)/ $CD8^+$. (B) SCID transplantados com 5×10^7 timócitos/animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (b) e repopulados no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (b)/ $CD8^+$. (C) SCID reconstituídos no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD8^+$. (D) SCID reconstituídos com 3×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD8^+$ e repopulados no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD4^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD8^+$ / $CD4^+$.

39

Fig.:9 Sobrevida de camundongos SCID infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi*. (A) SCID (controle). SCID transplantados com 5×10^6 timócitos/animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (a) e repopulados no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (a)/ $CD8^+$. (B) SCID transplantados com 5×10^7 timócitos/animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (b) e repopulados no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD4^+$ (b)/ $CD8^+$. (C) SCID reconstituídos no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD8^+$. (D) SCID reconstituídos com 3×10^6 linfócitos T $CD8^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD8^+$ e repopulados no 5° dpi com 1.5×10^6 linfócitos T $CD4^+$ /animal $\Rightarrow$ SCID/ $CD8^+$ / $CD4^+$.

40

ÍNDICE DE TABELAS

TABELAS

Pag.

Tabela I - Índice de Proliferação (IP) e Produção de IFN- γ (U/ml) pelas células esplênicas normais de camundongos SCID e BALB/c/Uni estimulados “in vitro” com diferentes concentrações de *Trypanosoma cruzi*.

23

Tabela II - Índice de Proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ em camundongos SCID implantados com subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e estimulados “in vitro” no 14º e 40º dia após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

41

Tabela III - Produção de IFN- γ pelas células esplênicas de camundongos SCID, implantados com linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e estimulados “in vitro” com *Trypanosoma cruzi*. no 14º e 40º dia após a infecção.

42

Tabela IV - Produção de NO em μ mol pelas células esplênicas de camundongos SCID, implantados com linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e estimulados “in vitro” com *Trypanosoma cruzi*. no 14º e 40º dia após a infecção.

43

Lista de Abreviaturas e Siglas

B7.2 - Molécula co-estimulatória

CD3⁺ - Marcador antigênico nas células T associado ao receptor de célula T

Con A - Concanavalina A

dpi - dia pós infecção

FasL -Ligante Fas

GM-CSF - Fator estimulador de colônia de granulócito e Monócito

H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio

HEPES - N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N-2[ethanesulfonic acid]

i.p. - via intraperitoneal

ICAM - Molécula de adesão intracelular

IFN- γ - Interferon-gama

IgG - Imunoglobulina G

IL - Interleucina

IP - Índice de proliferação

LAF-3 - Antígeno-3 de função associada a linfócitos

MHC - Complexo principal de histocompatibilidade

MTT - [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5diphenyltetrazolium bromide]

NK - Células natural killer

OPD - Ortho Phenyl Diamine

SDS - Sodium Lauryl Sulfate

SFB - Soro fetal bovino

T.cruzi- *Trypanosoma cruzi*

TC - Tripomastigota de cultura celular

TGF- β - Fator de transformação de crescimento beta

Th1 - Células T helper 1

Th2 - Células T helper 2

TNF- α - Fator de necrose tumoral alfa

U/ml - Unidades/ml

μ Mol - Micromol

β 2-microglobulina - Camundongos que não expressam moléculas de MHC de classe I. As células T CD8⁺ e a resposta de células T citotóxicas estão ausentes.

SUMÁRIO

	Pag.
Resumo.....	1
1 Introdução.....	3
2 Objetivos.....	12
3 Materiais e Métodos.....	13
3.1 Animais.....	13
3.2 Parasita.....	13
3.3 Infecção experimental com <i>Trypanosoma cruzi</i>	14
3.4 Preparação de células dos animais.....	14
3.5 Cultura de células esplênicas com mitógenos.....	15
3.6 Dosagem de IFN- γ	16
3.7 Dosagem de NO.....	17
3.8 Histoquímica.....	18
3.9 Depleção “in vivo” de linfócitos B e T CD4 ⁺ em camundongos BALB/c/Uni.....	19

3.10	Isolamento de linfócitos T através da coluna de lã de nylon.....	19
3.11	Transplante de linfócito T CD4 ⁺ em camundongo SCID.....	20
3.12	Reconstituição de camundongos SCID com linfócitos.....	21
4	Resultados.....	22
4.1	Evolução da infecção em camundongos SCID e BALB/c/Uni infectados com 10 ² formas de TC.....	22
4.2	Produção de IFN- γ pelas células esplênicas de SCID.....	22
4.3	Influência dos linfócitos na regulação da infecção pelo <i>Trypanosoma cruzi</i>	29
4.4	A influência das subpopulações de linfócitos T.....	35
4.5	Influência da estimulação inicial dos linfócitos T CD4 ⁺ sobre os linfócitos T CD8 ⁺	36
4.6	Influência da estimulação inicial dos linfócitos T CD8 ⁺ sobre os linfócitos T CD4 ⁺	37
5	Discussão.....	44
6	Conclusões.....	52
7	Referências Bibliográficas.....	53

RESUMO

Experimentos realizados por ASSIS (1997), com camundongos SCID mostraram que, a susceptibilidade desse animal ao *Trypanosoma cruzi*, era revertida através da repopulação com as células esplênicas da linhagem congênica BALB/c, e que os anticorpos anti-*T.cruzi* transferidos passivamente, controlavam apenas a parasitemia, demonstrando a importância desse modelo experimental, nos estudos das funções dos linfócitos isoladamente na infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

No presente trabalho procuramos investigar, nos camundongos SCID o mecanismo de indução da resistência ao parasita, utilizando-se o método de repopulação com os linfócitos T e de suas subpopulações, com o sentido de elucidar o papel dos linfócitos T e de ambas subpopulações, na regulação da infecção.

Os resultados revelaram que, a susceptibilidade dos camundongos SCID à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* não está correlacionada com a inibição da produção de IFN- γ e de NO, apontando a participação dos macrófagos e das células NK na fase inicial da infecção.

A análise do papel dos linfócitos B e T na fase aguda da infecção provaram que, apenas os linfócitos T foram efetivos, na indução da resistência à infecção. Os estudos realizados com as subpopulações de linfócitos T evidenciaram que, os linfócitos T CD4⁺ controlam a parasitemia com maior eficiência do que os linfócitos T CD8⁺. Quanto a evolução dos parasitas circulantes, as duas subpopulações apresentaram cinéticas e mecanismos distintos de controle intracelular do parasita. A eficiência no controle da infecção foi observada, quando as duas subpopulações foram associadas.

A estimulação “in vitro” das células esplênicas com o *Trypanosoma cruzi*, demonstrou que os linfócitos T CD4⁺ apresentaram resposta proliferativa, enquanto que os linfócitos T CD8⁺ não foram estimulados. No 14º dia após a infecção, houve inibição da resposta proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ e resposta proliferativa dos linfócitos T CD8⁺. Essas células estimuladas foram capazes de produzir IFN- γ . Esses resultados indicam que, os linfócitos T CD4⁺ foram ativados policlonalmente, enquanto os linfócitos T CD8⁺ foram ativados especificamente. As citocinas liberadas pelas células T CD4⁺ são importantes na regulação da função efetora dos linfócitos T CD8⁺ e dos macrófagos, sugerindo ainda que os linfócitos T CD8⁺ inibem a ativação policlonal dos linfócitos T CD4⁺.

1 . INTRODUÇÃO

O protozoário *Trypanosoma cruzi* é o agente etiológico da tripanosomíase americana, denominada doença de Chagas que representa um problema de saúde pública na América do Sul e Central, com uma estimativa de 18 milhões de pessoas infectadas. O agravamento das condições sócio-econômicas, transfusões sanguíneas e imigrações de pessoas infectadas para outros continentes, aumentam ainda mais o risco de infecções (WHO, 1991).

No homem, a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* apresenta uma fase aguda, com presença de parasitas no sangue periférico, seguida por uma fase crônica, que pode ser assintomática ou sintomática. Na fase crônica da doença, os indivíduos desenvolvem severos problemas cardíacos, com infiltrado inflamatório com células T (CUNHA-NETO *et al.*, 1995).

Os estudos de resistência e susceptibilidade à infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, utilizando diferentes linhagens de camundongos, demonstraram que o curso da infecção está na dependência do back ground genético do parasita e do hospedeiro. A utilização de cepas e de clones diferentes em termos de virulência, tem mostrado distribuição de parasitas em diferentes órgãos, e induzindo patologias diferentes. Estas variações refletem na susceptibilidade diferenciada do parasita, ao mecanismo imune efetor e na indução diferenciada de tais mecanismos. Os estudos sugerem que, os genes do hospedeiro influenciam o grau de susceptibilidade e resistência. No entanto, os mecanismos como esses genes influenciam a indução da resposta não estão elucidados.

Por outro lado, várias evidências foram acumuladas, e apontam que, a resistência à infecção está na dependência da imunidade mediada por linfócitos T CD4⁺ estimulando, a produção de anticorpos, a ativação de macrófagos e indução de morte dos parasitas intracelulares, por linfócitos T CD8⁺ e por citocinas sintetizadas no curso da resposta inflamatória e/ou imune, requeridas para o controle da infecção (Reed, 1998).

No estudo da relação parasita-hospedeiro, enfocando a participação da citocina na modulação da resposta imune em *Leishmania major* (Heinzel *et al.*, 1991), caracterizaram na linhagem resistente, a produção de citocinas como o IFN- γ e IL-2 associada a resposta Th1, e na linhagem susceptível a produção de IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10.

Os estudos da imunidade natural à *Leishmania major* e *Listeria monocitogenes*, em camundongos SCID, evidenciaram um mecanismo de ativação do macrófago independente de linfócitos T, e dependente de IFN- γ secretado por células NK. Neste mecanismo foram caracterizadas citocinas produzidas pelos macrófagos, a IL-12 com a função estimuladora de células NK, e Th 1 para a produção de IFN- γ , e a IL-10 com função inibidora da síntese de IL-12 e IFN- γ (TRINCHIERI, 1997).

A interação dos sistemas inato e adaptativo tem merecido atenção no estudo dos parasitas intracelulares, pelo fato das células de ambos os sistemas, produzirem citocinas que, definem os tipos celulares a serem ativadas, com funções moduladoras e/ou efectoras.

Na doença de Chagas experimental, os estudos realizados enfocando a ação reguladora das citocinas, na indução da resistência, tem atribuído ao IFN- γ a função protetora. Os estudos de REED *et al.*, (1988) demonstraram que, os animais susceptíveis infectados, e inoculados com IFN- γ recombinante, apresentaram diminuição da parasitemia, imunossupressão dos linfócitos e sobrevida. Em oposição o tratamento com o anticorpo neutralizante anti-IFN- γ nos animais resistentes levou à exacerbação da parasitemia e mortalidade (Torrico *et al.*, 1991).

O IFN- γ e a citocina reguladora IL-10, foram dosadas em animais susceptíveis e resistentes à infecção, com as cepas Tulahuén, CL e Brazil. Nestes três modelos, a produção de IFN- γ foi comparável à linhagens resistentes e susceptíveis. No entanto, a produção da IL-10 foi maior nos animais susceptíveis, infectados com as cepas Tulahuén e CL (REED *et al.*, 1994; MINOPRIO *et al.* 1993). Porém, os animais resistentes infectados com a cepa Brazil, produziram concentrações superiores de IL-10 (ZHANG & TARLETON, 1996).

Estes estudos mostraram que, nos animais infectados com o *Trypanosoma cruzi*, não ocorre a resposta polarizada, com padrão de produção de citocinas do tipo Th 1 ou Th 2 como desenvolvido por *Leishmania major*. Sugerindo um mecanismo alternativo de regulação, a IL-10 bloqueia a estimulação das células NK, e a diferenciação do Th0 para Th 1, ocorrendo a predominância da resposta Th 2.

O efeito regulatório da IL-12 produzida por macrófagos, estimulados com o parasita (ALIBERTI *et al.*, 1996; FROSCH *et al.*, 1996) na estimulação da células NK, com ação regulatória sobre a infecção, nos primeiros 10 dias após a infecção, (ALIBERTI *et al.*, 1996; CARDILLO *et al.*, 1996; HUNTER *et al.*, 1996) mostrou a estimulação dos linfócitos Th 1 (FROSCH *et al.*, 1996; HUNTER *et al.*, 1996).

A IL-10 bloqueia a síntese de IFN- γ , aumentando a susceptibilidade à infecção (SILVA *et al.*, 1992; REED *et al.*, 1994), e controle de regulação da IL-12, TNF- α e IFN- γ nos animais knock out em RAG^{-/-} e nos animais C57BL/10 knock out em IL-10 (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996).

O mecanismo de ativação do macrófago, com eficiência parasiticida foi determinado por diferentes autores. “In vitro” o IFN- γ como ativador TNF- α com ação sinérgica, na ativação de metabólitos intermediários de nitrogênio, principalmente óxido nítrico (NO), cuja produção é catalisada pela enzima óxido nítrico induzível (iNOS) e IL-10 e TGF- β como reguladora (DING *et al.*, 1988; MACCABE *et al.*, 1991; MUNHOZ-FERNANDEZ, 1992; SILVA *et al.*, 1995; GAZZINELLI *et al.*, 1992).

Os estudos “in vivo” com a cepa Y e a cepa Tulahuén mostraram que, ao longo da infecção, as células esplênicas ou macrófagos peritoneais, produziram altas concentrações de NO. A inoculação “in vivo” de inibidor da enzima NO sintase, resultou na exacerbação da infecção. Em vista deste fato, o NO foi relacionado com o mecanismo

de controle intracelular do parasita (VESPA *et al.*, 1994; PETRAY *et al.*, 1994).

Por outro lado, OLIVARES FONT & VRAY, (1995) relataram um mecanismo independente de NO, mas dependente de citocinas como o TNF, com ação citolítica sobre o parasita.

Posteriormente ROTTENBERG *et al.*, (1996), demonstraram em animais deficientes para receptor de IFN- γ (IFN- γ R-/-) aumento da susceptibilidade à infecção, devido a baixa secreção de NO, e sugerem dois mecanismos de ativação da enzima NO sintase induzível (iNOS -/-), um dependente de IFN- γ , e um segundo independente IFN- γ .

O estudo comparativo com animais deficientes em enzima iNOS-/- e IFN- γ R-/- (HOLSHER *et al.*, 1998) mostrou maior susceptibilidade a infecção, devido ao bloqueio da atividade tripanocida do macrófago.

A ação sinérgica do TNF- α na ativação do macrófago, e secreção de NO foi caracterizada em animais transgênicos, para receptores solúveis de TNF (sTNF-R) com a cepa CL (SANTOS LIMA *et al.*, 1997).

Posteriormente, CASTANOS VELEZ *et al.*, (1998) utilizando camundongos deficientes em receptor para TNF- α (TNFp55/-) com a cepa Tulahuén, demonstraram ausência de sinergismo com IFN- γ , visto que, tanto os animais deficientes e não deficientes, secretaram a mesma concentração de NO. Os autores sugerem que, para ativação do macrófago, o parasita induz o segundo sinal para secreção de NO.

No entanto, existem divergências com relação a capacidade funcional do macrófago infectado, comprometimento na capacidade fagocítica, no catabolismo do antígeno não correlacionado ao parasita (PLASMANN *et al.*, 1995), e defeito na interação celular (FLAMME *et al.*, 1997), mediante alterações nas glicoproteínas de superfície, induzidos pelo antígeno de superfície do parasita, ou excretado pelo parasita e transialidase (SCHENKMAN & EICHINGER, 1993; SCUDDER *et al.*, 1993). Por outro lado, FROSCH *et al.*, (1996) demonstraram que, as células infectadas eram capazes de estimular clones de linfócitos com função Th 1.

Até o momento, os mecanismos de apresentação dos antígenos do parasita não foram explorados completamente. No entanto, vários estudos têm abordado a presença dos linfócitos T, e ambas as subpopulações, como células essenciais na regulação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Os estudos com os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ foram realizados utilizando-se diferentes cepas virulentas de parasitas. As depleções de subpopulações específicas conduziram a uma exacerbação da infecção e mortalidade precoce, similar ao descrito para os animais atímicos ou animais submetidos a timectomia neonatal (SCHMUNIS *et al.*, 1971; KIERSZENBAUM & PIENHOWSHI, 1979).

Mediante este fato, os clones avirulentos como CA-I e clone M/78 tem sido utilizados em laboratórios para o estudo da fase crônica, em relação as cepas virulentas como CL, Brazil e Tulahuén.

Os animais utilizados para este estudo, são aqueles com os linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ depletados “in vivo ” por anticorpos monoclonais anti-CD4⁺ ou anti-CD8⁺ (MINOPRIO *et al.*, 1987; RUSSO *et al.*, 1988; ARAÚJO, 1989; TARLETON, 1990), animais deficientes na expressão gênica das moléculas de β 2-microglobulina, moléculas CD4⁺ ou CD8⁺, e moléculas do complexo principal de histocompatibilidade da classe I ou II (TARLETON *et al.*, 1992; ROTTENBERG *et al.*, 1993; ROTTENBERG *et al.*, 1995; TARLETON *et al.*, 1996).

Os resultados obtidos com as cepas virulentas mostraram que, a ausência dos linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ induziram um aumento na susceptibilidade, com aumento do número de parasitas circulantes, nos músculos cardíacos e esqueléticos com resposta inflamatória reduzida e secretora de IL-2 e IFN- γ ;e ainda apresentaram mortalidade precoce em relação aos animais não deficientes, mesmo com as cepas virulentas de *Trypanosoma cruzi* .

Com as cepas avirulentas de *Trypanosoma cruzi* (ROTTENBERG *et al.*, 1995; TARLETON *et al.*, 1996) demonstraram que, os linfócitos T CD4⁺ regulavam a parasitemia e mortalidade, porém com resposta inflamatória severa, em animais deficientes em expressão da molécula de CD8⁺ e MHC da classe I .

Paralelamente, com o sentido de elucidar o mecanismo de ação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺, foram realizados estudos “in vitro” com clone de linfócitos T CD4⁺ parasita específico isolado de animais infectados com a cepa Y de *Trypanosoma cruzi* (MUNHOZ-

FERNANDEZ *et al.*, 1992; NICKELL *et al.*, 1993). Estes clones foram capazes de secretar IFN- γ , IL-2 e TNF- α e ativar os macrófagos, induzindo morte de amastigotas.

NUNES *et al.*, (1998), no estudo do mecanismo de ação das subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ isolados de animais infectados, com as formas metacíclicas da cepa Y. Demonstraram que, os linfócitos T CD4⁺ cocultivados com macrófagos infectados “in vitro” induzia a proliferação do parasita, mesmo com a produção de IFN- γ . Este fenômeno foi correlacionado, com indução da ativação da morte das células T CD4⁺ com a expressão do ligante Fas. Os linfócitos T CD8⁺ induziram a inibição da proliferação parasita.

Os clones de linfócitos T CD8⁺ isolados da fase crônica específico, para epítópos antígeno de superfície da família de transialidase presentes nas formas tripomastigotas e amastigotas, secretores de IFN- γ e TNF- α com função citotóxica. A ação protetora destes clones, foram avaliadas através da transferência passiva em animais normais, com controle de parasitemia e mortalidade, frente ao desafio com a cepa Brazil (WIZEL *et al.*, 1997; PANG LAO *et al.*, 1998).

O conjunto de informações sobre a regulação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*, envolvendo mecanismos complexos de interações celulares, e de citocinas não está totalmente elucidado, devido a utilização de diferentes cepas de parasitas e hospedeiros, que modulam respostas imune e patologias.

Assis (1997), utilizando camundongos SCID derivado da linhagem C.B-17, com mutação pontual recessiva, no cromossomo 16, deficientes em células T e B funcionais com células granulocíticas e NK normais (BOSMA *et al.*, 1989) susceptíveis à infecção com os estoques virulentos (TS) e avirulentos (TC) da cepa Y de *Trypanosoma cruzi*, mostrou neste modelo que, os animais repopulados com células esplênicas controlavam a infecção. A indução da resistência mediada por linfócitos é dependente de número de células, tempo de repopulação e dose de parasita. Os anticorpos anti-*T.cruzi* transferidos passivamente, controlaram a parasitemia na fase inicial da infecção, sugerindo a importância dos linfócitos T na regulação da infecção.

Com base nestes resultados procuramos investigar, em camundongos SCID, o mecanismo de resistência induzido pelos linfócitos T e o papel dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na infecção experimental pelo *Trypanosoma cruzi*.

2.OBJETIVOS

Este trabalho teve como objetivos estudar:

- 1- ao longo da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* avaliar os produtos de secreção das células NK e sua ação sobre o macrófago.
- 2- a influência da concentração dos linfócitos T na indução da resistência a infecção.
- 3- o papel da resposta inflamatória inicial na estimulação dos linfócitos T.
- 4- a influência dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ na regulação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.
- 5- a função dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos animais infectados.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Animais.

Os camundongos das linhagens isogênicas (*)BALB/c/Uni, BALB/c nu/nu/, fêmeas, de 08 a 12 semanas de idade da colônia SPF (specific pathogen free), foram obtidos do CEMIB/UNICAMP.

Camundongos C.B-17 scid/scid (SCID) provenientes de matrizes de colônias importadas do Instituto Pasteur de Paris - França, foram mantidos em unidades isoladoras flexíveis, constituindo a Colônia de Fundação no Cemib/Unicamp. Foram utilizados nos experimentos, animais que apresentavam nível de imunoglobulina sérica inferior a 2,5 µg/ml dosados pelo método de Immunoblot segundo as indicações de GORDON *et al.*, 1991.

Todos os animais foram mantidos em unidade isoladora de pressão positiva (PASSOS & ALVES, 1996).

(*) Após a manutenção da linhagem por mais de 20 gerações na Instituição, considera-se uma sub-linhagem, acrescentando a sigla da Instituição no nome da linhagem.

3.2 Parasita.

A cepa Y de *Trypanosoma cruzi* foi mantida conforme as indicações de RANGEL *et al.*, 1994. O estoque tripomastigota de cultura denominado de TC, derivado da cepa Y foi mantido por passagens seriada em cultura de células LLM-MK2, em meio RPMI 1640 suplementado com 10% soro fetal bovino (SFB), 2 mM L-glutamina, 100 UI penicilina/ml, 100µg de estreptomicina/ml e 12,5mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N-2[ethanesulfonic acid]),(HEPES) incubados em estufa a 37°C.

O sobrenadante de culturas, entre 4 e 7 dias de infecção, foi centrifugado inicialmente durante 10 minutos a 1.000 rpm, para eliminar os

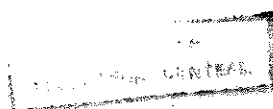
restos celulares, e a seguir por 15 minutos a 3.000 rpm a 4°C para a obtenção dos parasitas. Os parasitas foram ressuspensos em meio RPMI 1640 com 10% SFB. A concentração de parasitas foi determinada através de contagem em câmara de Newbauer. Este número foi expresso em tripomastigotas/ml.

3.3 Infecção Experimental com *Trypanosoma cruzi*.

Os camundongos foram infectados com TC do estoque de *Trypanosoma cruzi* por via intraperitoneal (i.p.), inoculando-se 10^2 formas de parasitas por animal. A determinação do número de parasitas circulantes, foi realizada a cada dois dias, segundo o método de BRENER (1980). A parasitemia foi expressa em $\log (N+1)$ parasitas/ml. A mortalidade dos animais foi observada por um período de 35 a 60 dias de infecção.

3.4 Preparação de Células dos animais.

As suspensões celulares foram preparadas a partir de células de timo e do baço de camundongos BALB/c/Uni e SCID em meio RPMI 1640 suplementado com 10% SFB. As hémacias foram lisadas a partir do tratamento das suspensões com Tampão Tris 0,17M, pH7,2 contendo NH_4Cl 0,16M, durante 5 minutos. Em seguida, as suspensões celulares restantes foram lavadas em meio RPMI com 10% SFB, 2mM L-glutamina, 100 UI de penicilina/ml, 100µg de estreptomicina/ml, 12,5mM (N-[2-Hydroxyethyl] piperazine-N-2[ethanesulfonic acid]),(HEPES), $5 \times 10^{-5}\text{M}$ 2- mercaptoetanol (RPMI completo). A viabilidade das células foi determinada pela exclusão de



células coradas por azul de Trypan em câmara de Newbauer. A concentração celular para o cultivo foi ajustada conforme a necessidade, em meio RPMI completo suplementado com 1% de aminoácidos não essenciais.

3.5 Cultura de células esplênicas com mitógenos.

As culturas de células esplênicas foram submetidas a mitógeno Concanavalina A (Con A) ou com as formas vivas de tripomastigota de cultura (TC). Para o estudo de produtos de secreções, 5×10^6 /ml de células esplênicas foram estimuladas com 2×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 /ml de parasitas TC vivos ou com Con A ($\mu\text{g/ml}$) cultivadas por 72 horas e centrifugadas a 2000 rpm por 15 minutos. Os sobrenadantes de culturas foram armazenados a -20°C . A análise da capacidade proliferativa foi realizada segundo adaptação do método colorimétrico de MOSMANN (1983). Foram distribuídos 50 μl das suspensões de células esplênicas por poço contendo 5×10^6 células/ml em meio RPMI completo suplementado com 1% de aminoácido não essenciais e 50 μl /poço de uma solução de Con A contendo $5 \mu\text{g/ml}$, TC na concentração de 1×10^5 /ml. O controle foi constituído por células esplênicas e meio RPMI, feito em triplicata em placas de 96 poços de fundo chato (Costar), cultivadas por 48 horas a 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 com 95% de umidade. Em seguida foram adicionados 50 μl de solução de 1mg/ml de [3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide], (MTT) em PBS. Após 4 horas de incubação adicionou-se 50 μl de uma solução de Sodium Lauryl Sulfate (SDS) 10% em HCL 0,01N. A leitura foi realizada após 24 horas a $\lambda=550 \text{ nm}$ em leitor de ELISA (Multiskan).

Os resultados da proliferação celular foram expressos como média entre as diferentes culturas utilizando a seguinte equação.

$$IP = \frac{D.O \text{ da amostra estimulada} - D.O \text{ célula sem o estímulo}}{D.O \text{ sem o estímulo}}$$

Os valores de desvio padrão igual ou inferior a 10% do valor da média não foram expressos nos resultados.

3.6 Dosagem de IFN- γ .

A dosagem de IFN- γ foi realizada utilizando-se o método descrito por HOFF *et al.*, (1993). As placas de 96 poços (Nunc-Immuno Plate MaxiSorp ref.439454) foram sensibilizadas com 50 μ l/poço do anticorpo anti-IFN- γ (clone R4-6A2) na concentração de 20 μ g/ml em tampão Carbonato de Sódio 0,1M pH 9,5, e incubadas por 90 minutos a 37°C. O bloqueio foi feito com PBS contendo 0,05% de Tween 20 e 1% gelatina, por duas horas, a 37°C. Nos poços foram acrescentados 50 μ l de diferentes concentrações de sobrenadantes de células estimuladas “in vitro”. Como controle utilizou-se IFN- γ com unidades conhecidas em diluição seriada, em PBS contendo 0,25% de gelatina e 0,1% azida sódica, incubados por 18 horas à 4°C. Foram adicionados, em cada poço, 50 μ l do anticorpo anti-INF- γ biotinilado (clone XMG 1.2) diluído 1:2500 em PBS contendo 1% gelatina , e incubados por 1 hora, a 37°C. Acrescentou-se 50 μ l do complexo ABC (Conjugado Streptoavidin-Biotin-Peroxidase, DAKO) diluído 1:250 em PBS, e incubado por 45 minutos a 37°C. Adicionou-se 100 μ l do substrato/poço de “Ortho Phenyl Diamine”(OPD) (Sigma), 0,5 mg/ml em Tampão fosfato citrato 0,1M

pH 5,0 e 0,015% de água oxigenada 30 volumes, e incubados por 30 minutos a temperatura ambiente em ausência de luz. A reação foi bloqueada com 50 μ l/poço com uma solução de HCl 3N. Após a reação em cada etapa as placas foram lavadas com PBS 0,05% Tween 20 contendo 0,25% de gelatina. A leitura foi realizada a $\lambda=492$ nm em leitor de ELISA (Multiskan). O resultado foi expresso em U/ml (unidades/ml).

3.7 Dosagem de NO.

A dosagem de nitrito (NO) foi realizada segundo o método de GREEN *et al.*, (1982). Utilizou-se placa de 96 poços fundo chato (Costar), com 50 μ l/poço do sobrenadante de cultura de células esplênicas previamente estimuladas com volume igual do Reagente de Griess,(1% de sulfanilamide, 0,1% N(1-Naphtyl) Ethyl-Enediamine (Sigma), 2,5% de ácido orto-fosfórico em água deionizada). A mistura de reação foi incubada por 10 minutos à temperatura ambiente. A absorbância foi determinada a $\lambda=555$ nm em leitor de ELISA (Multiskan). A concentração de nitrito das amostras foi determinada utilizando-se como padrão concentrações de 5 a 100 μ M de nitrato de sódio. Os resultados foram expressos em μ Mol (micromol) de NO.

3.8 Histoquímica.

A determinação fenotípica das subpopulações linfocitárias foi realizada utilizando-se o método descrito por BERGROTH *et al.*, (1980).

Lâminas gelatinizadas contendo 5×10^4 células foram preparadas em citocentrífuga, e fixadas em acetona -20° C durante dez minutos. As preparações foram bloqueadas com uma solução de PBS contendo 0,1% Tween 20, 5% de leite desnatado e 20% SFB. A peroxidase endógena foi inativada com uma solução contendo 1% de H_2O_2 0,1% de Tween 20 em PBS. Adicionou-se sobre estas monocamadas 100 μ l dos diferentes anticorpos monoclonais Anti-B (Clone RA 3682 marcador B220) diluído 1:2; Anti-T (proveniente de ascite com o marcador Thy 1.2) diluído 1:2500; Anti-CD4⁺ (clone GK 1.5) diluído 1:5000; Anti-CD8⁺ (clone YTS 169.4) diluído 1:5000. Todos os anticorpos foram diluídos em PBS contendo 1% BSA e 0,1% de azida sódica, e incubados durante 18 horas a 4°C. Após a incubação as preparações foram lavadas com PBS 0,1% Tween 20 contendo 5% de leite desnatado. Foram adicionados 100 μ l de IgG de coelho anti-IgG de rato biotinilado (Vector Laboratory) diluído a 1:500 em PBS contendo 1% de BSA, incubados por uma hora em temperatura ambiente. Após a lavagem foram adicionados 100 μ l do complexo Streptoavidina-peroxidase biotinilada (DAKO) diluído 50 vezes em PBS, e incubado durante uma hora em temperatura ambiente. Após a lavagem, a atividade enzimática foi revelada utilizando 5 mg de 3-3 Diaminobenzidina em 5ml de Tampão Tris HCl 0,1M pH 7,6 acrescentando 5 μ l de água oxigenada a 30 volumes. As preparações foram contracoradas com uma solução de hematoxilina de

Earlich por um minuto e lavadas com PBS, para observação imediata em microscópio óptico.

3.9 Depleção “in vivo” de linfócitos B e T CD4⁺ em camundongos BALB/c/Uni.

Grupos de camundongos BALB/c/Uni foram inoculados por via intra peritoneal com 0,1 ml do anticorpo anti-CD4⁺ com 2,0 mg de proteína (proveniente de ascite do clone GK 1.5) ou com 2,4 mg de proteína do anticorpo B-220 (sobrenadante de cultura precipitado com sulfato de amônia). Após cinco dias, as células esplênicas dos animais tratados com os anticorpos, foram analisados por método imunohistoquímico. As células esplênicas dos animais tratados com anti B-220 apresentavam 5% de linfócitos B, e esta suspensão foi denominada de células enriquecidas de linfócitos T (enr.T). Os animais tratados com o anticorpo anti-CD4⁺ apresentavam 95% de linfócitos T CD8⁺, analisados por método histoquímico, utilizando o anticorpo anti-CD8⁺ clone (YTS 169.4).

3.10 Isolamento de linfócitos T através da coluna de lã de nylon.

O isolamento de linfócitos T foi realizado utilizando-se o método descrito por JULIUS *et al.*, (1973). Foram utilizadas colunas, seringas de plástico com capacidade de 10 ml e 20 ml, contendo respectivamente 0,6g ou 1,2 g de lã de nylon, pré-ativadas com o meio RPMI completo, a 37°C em estufa. Após este período, o meio foi esgotado e foram adicionados 2 ou 4 ml de suspensões de células esplênicas de

camundongos BALB/c/Uni contendo 1×10^8 ou 2×10^8 células. Estas suspensões foram incubadas por uma hora a 37°C e as células não aderentes foram eluídas com 20 ml de meio, sob fluxo controlado. As células aderentes foram eluídas com PBS 4°C mediante, uma pressão mecânica do êmbolo da seringa sobre a camada de lã de nylon.

As duas populações celulares aderentes e não aderentes foram centrifugadas a 1.500 rpm durante 10 minutos. As células foram ressuspendas, e a concentração celular foi determinada em câmara de Newbawer. A análise por método imunohistoquímico mostrou que as células não aderentes eram constituídas de linfócitos T (LT) e de linfócitos T CD8⁺ (T CD8⁺).

3.11 Transplante de linfócitos T CD4⁺ em camundongos SCID.

Para a obtenção de camundongo SCID com subpopulação T CD4⁺ implantado nos órgãos linfóides, foi utilizado o método descrito por RUDOLPHI *et al.*, (1991(a)), e FREY *et al.*, (1992). Para tal finalidade, dois grupos de camundongos SCID de 04 semanas de idade, foram inoculados com 5×10^6 (grupo a) e 5×10^7 (grupo b) com células do timo de camundongos BALB/c/Uni por via retro-orbital. Após 40 dias, as células esplênicas dos animais do grupo a e do grupo b foram analisadas por método imunohistoquímico. Os animais do grupo (a) apresentaram concentração mínima de $1,6 \times 10^6$ e máxima de $5,8 \times 10^6$ linfócitos T CD4⁺ e os do grupo (b), concentração mínima de $5,2 \times 10^6$ e máxima de $7,2 \times 10^6$ linfócitos T CD4⁺

implantados. Esses animais foram denominados SCID/CD4⁺ (a) e SCID/CD4⁺ (b).

3.12 Reconstituição de camundongos SCID com linfócitos.

Os camundongos SCID entre 8 e 12 semanas de idade foram reconstituídos com diferentes preparações de linfócitos obtidas conforme as indicações fornecidas nos itens anteriores. As células foram inoculadas em um volume de 0,1 ml por via retro-orbital, dois dias antes da infecção, e/ou no 5° e 10° dias após a infecção com o *Trypanosoma cruzi*, e foram assim denominados:

(SCID/B) - Os camundongos SCID foram inoculados com 1×10^6 e 1×10^7 células esplênicas de camundongos BALB/c nu/nu dois dias antes da infecção.

(SCID/enr.T) - Os camundongos SCID foram inoculados com 5×10^6 com uma suspensão de células enriquecidas com linfócitos T, dois dias antes e no 5° e 10° dia após a infecção.

(SCID/LT) - Os camundongos SCID foram transferidos com 8×10^5 e 2×10^6 linfócitos T purificados em coluna de lã de nylon dois dias antes da infecção.

(SCID/CD8⁺) - Os camundongos SCID foram reconstituídos com 3×10^6 linfócitos T, dois dias antes da infecção, e com $1,5 \times 10^6$ células no 5° dia após a infecção.

4 .RESULTADOS

4.1 Evolução da infecção em camundongos SCID e BALB/c/Uni infectados com 10^2 formas de TC.

A evolução da infecção em camundongos SCID e BALB/c/Uni, foi estudada inoculando-se 10^2 formas de TC em grupos de animais de ambas as linhagens. Os resultados apresentados na Fig. 1 mostraram que, os camundongos SCID apresentaram altos níveis de parasitas circulantes, com 100 % de mortalidade e dia médio de mortalidade no $21^\circ \pm 2$ dias. Os camundongos BALB/c/Uni controlaram a parasitemia. Na fase precoce da infecção as duas linhagens apresentaram um período de pré-patência similar, sugerindo a existência de um mecanismo de controle do parasita.

4.2 Produção de IFN- γ pelas células esplênicas de SCID.

Com a finalidade, de analisar a produção de IFN- γ em camundongos SCID comparativamente aos animais imunocompetentes, e a concentração ideal de parasita, utilizamos o cultivo “in vitro” com formas vivas de *Trypanosoma cruzi* derivado de cultivo celular (TC). Para tal 5×10^6 células esplênicas foram cultivadas por 72 horas utilizando-se diferentes concentrações de parasitas 2×10^4 , 1×10^5 e 5×10^5 /ml correspondendo às seguintes relações células/parasitas 250:1, 50:1 e 10:1.

Os resultados da ativação celular representados como IP (Índice de Proliferação) mostram que, independentemente da relação célula parasita, o *Trypanosoma cruzi* foi capaz de induzir proliferação celular e produção de IFN- γ (Tabela I), sendo que, nestas condições de ensaio o NO não foi detectado. Foi observado que, dentre as concentrações de *Trypanosoma*

cruzi de cultura utilizadas, 1×10^5 /ml foi a concentração ideal, em relação a estimulação celular.

Tabela I - Índice de Proliferação (IP) e Produção de IFN- γ (U/ml) pelas células esplênicas normais de camundongos SCID e BALB/c/Uni estimulados “in vitro” com diferentes concentrações de *Trypanosoma cruzi*.

Animais	Concentração de <i>Trypanosoma cruzi</i> de cultura					
	2×10^4 /ml		1×10^5 /ml		5×10^5 /ml	
	IP	IFN- γ U/ml	IP	IFN- γ U/ml	IP	IFN- γ U/ml
SCID	2,3	2200	2,4	2000	2,4	2000
BALB/c/Uni	2,9	1500	3,5	2000	1,6	2000

IP- Índice de Proliferação.

Os valores foram expressos como média.

A indução da resposta imune inespecífica ao longo da infecção pelo *Trypanosoma cruzi* em camundongos SCID e BALB/c/Uni foi estudada analisando-se as células esplênicas, quanto a sua funcionalidade nos dias 3, 7, 10, 15 e 18 após a infecção, através da resposta proliferativa, produção de interferon- γ (IFN- γ), e secreção de nitrito (NO) com o cultivo “in vitro”.

Os resultados da proliferação celular demonstraram que, ao longo da infecção as células de animais infectados, quando estimulados com o TC, apresentavam uma perda gradual da capacidade de proliferação em ambas as linhagens (Fig. 2).

A dosagem de IFN- γ nas células esplênicas mostrou um aumento gradual, à partir do 7º dia após a infecção, atingindo níveis máximos no 15º dia após à infecção. À partir deste dia, a produção de IFN- γ caiu até o 18º dia após a infecção. Tanto nos camundongos imunodeficientes, susceptíveis à infecção, como nos animais resistentes, observou-se a presença de parasitas livres nas suspensões celulares, e a influência desses parasitos como estimuladores (Fig. 3).

Os resultados da dosagem de NO mostraram que, tanto as células esplênicas dos camundongos SCID como as de BALB/c/Uni, não apresentaram diferenças nos níveis de secreção, entre as células não estimuladas ou estimuladas com o TC “in vitro” (Fig. 4). Observou-se que os animais imunodeficientes apresentaram altas concentrações de NO, em relação aos camundongos BALB/c/Uni.

Os dados demonstraram que, os camundongos SCID são capazes de induzir a produção de IFN- γ e de NO com uma cinética similar ao dos animais imunocompetentes.

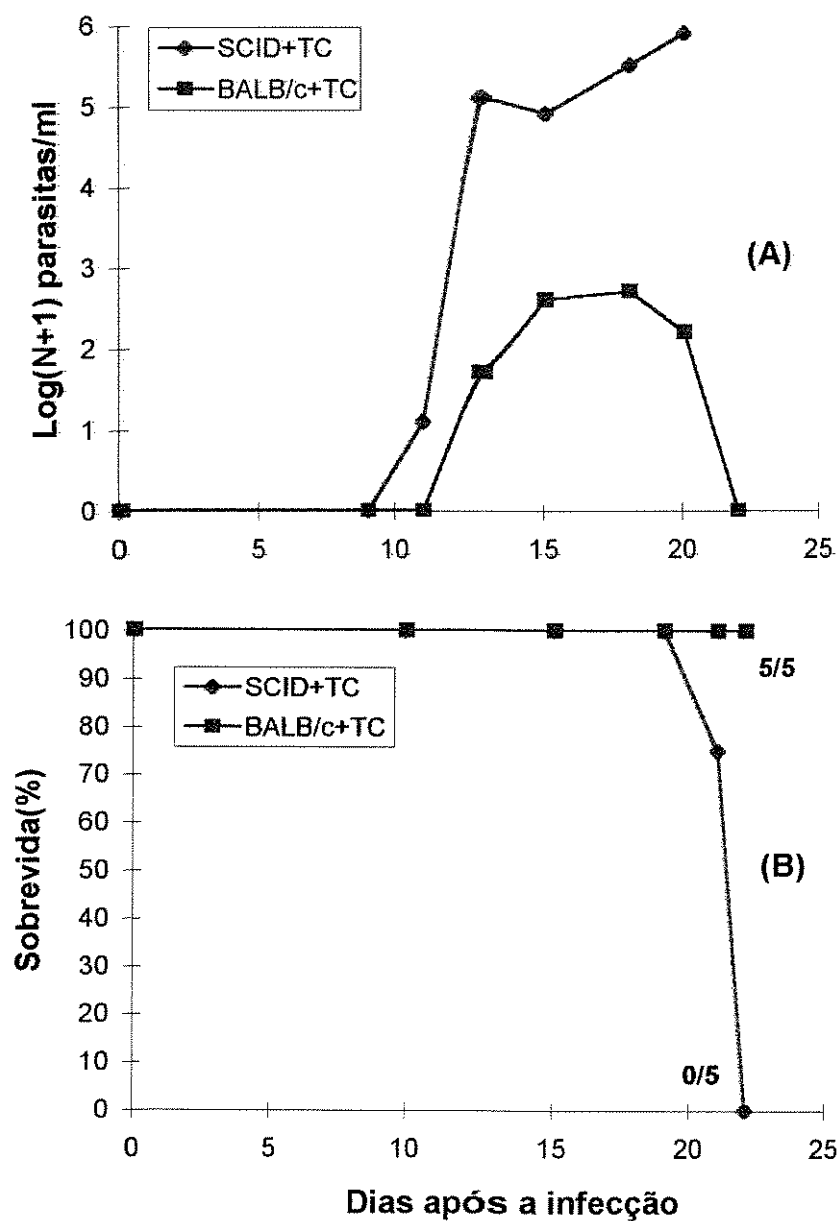


Fig.:1 (A) Perfil de Parasitemia em camundongos SCID e BALB/c/Uni infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* de cultura por animal. (B) Sobrevida de camundongos SCID e BALB/c/Uni infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal.

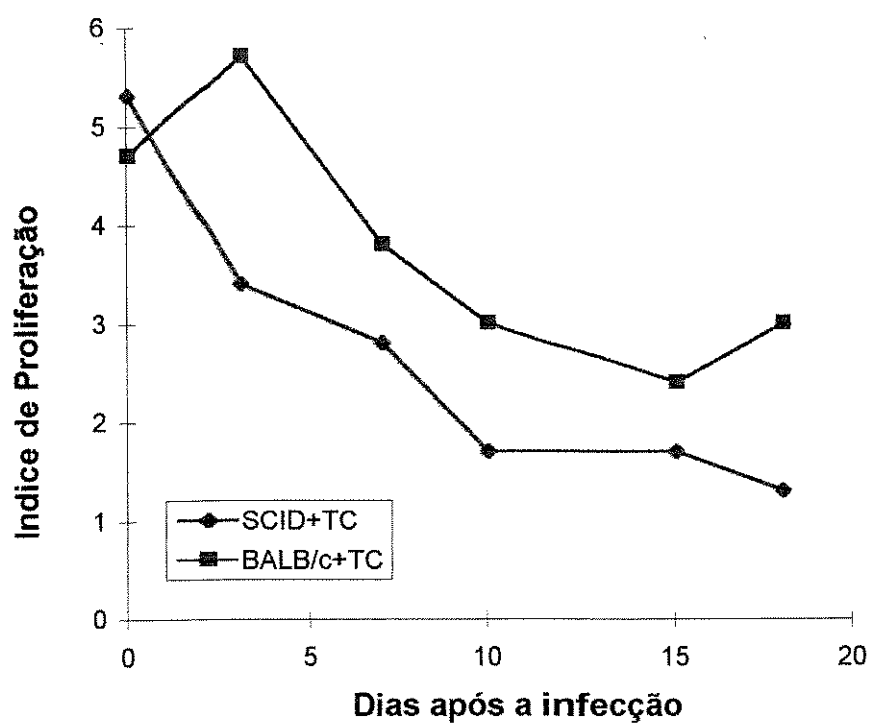


Fig.:2 Índice de Proliferação celular. As células esplênicas de camundongos SCID e BALB/c/Uni foram estimuladas “in vitro” em diferentes dias, com 10^5 /ml tripomastigótas de cultura celular.

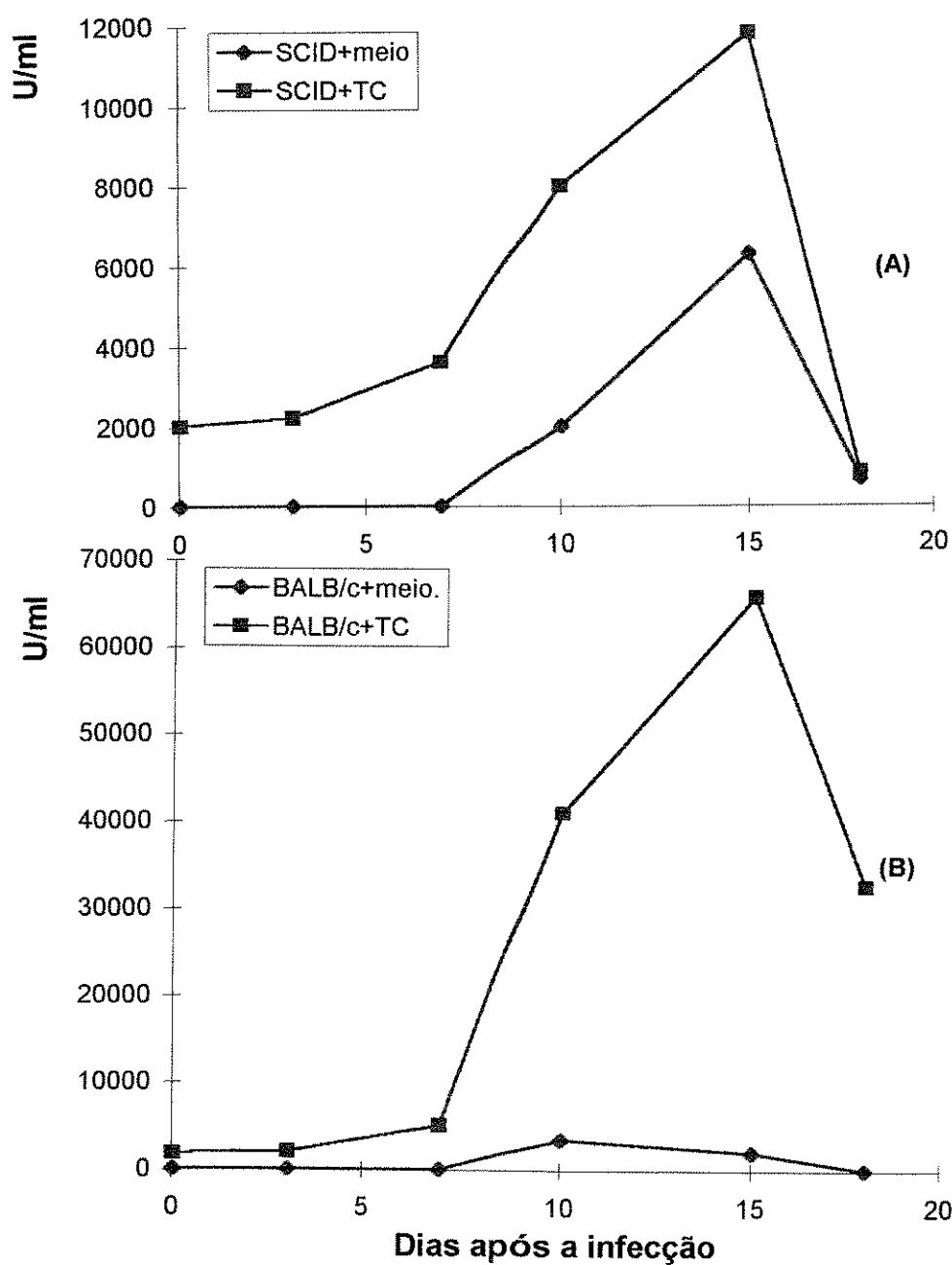


Fig.:3 Produção de IFN- γ nos camundongos SCID (A) e BALB/c/Uni (B) infectados com 10^2 forma de *Trypanosoma cruzi*. Unidades de IFN- γ foram determinadas nos sobrenadantes de células esplênicas (5×10^6 células/ml) estimuladas com tripomastigotas de cultura celular (10^5 /ml).

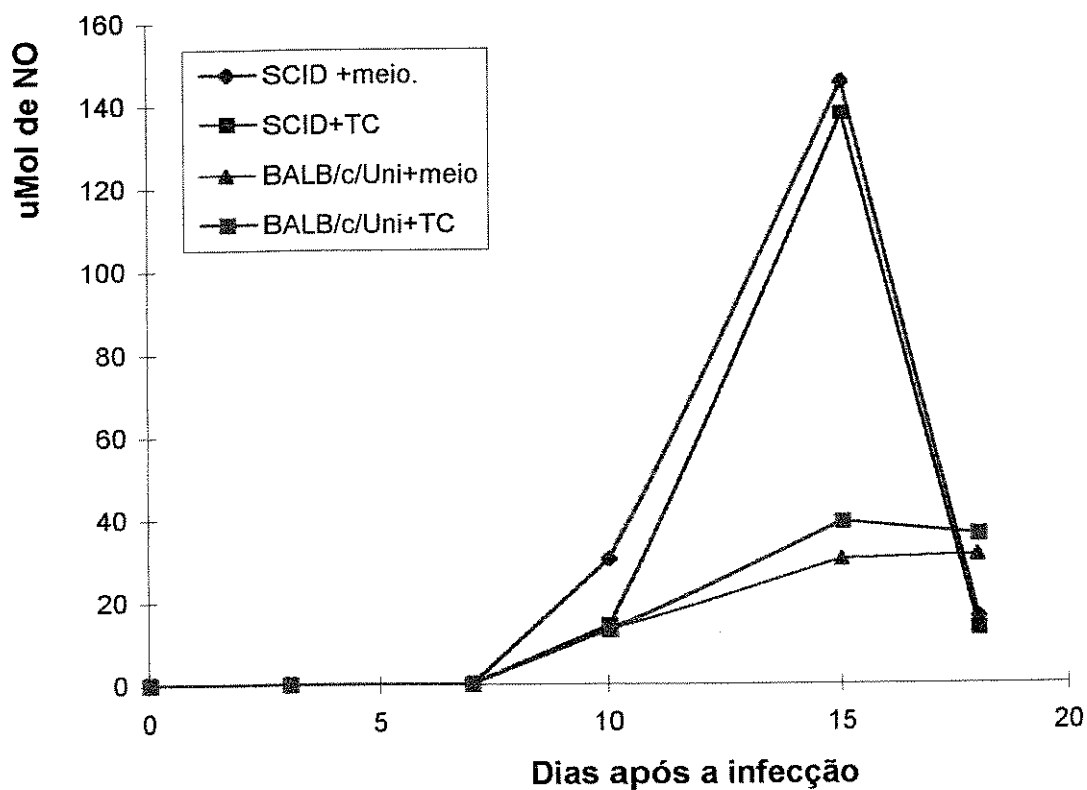


Fig.:4 Produção de NO em sobrenadantes de culturas de células esplênicas “in vitro”. As células esplênicas de camundongos SCID e BALB/c/Uni foram estimuladas com *Trypanosoma cruzi*.

4.3 Influência dos linfócitos na regulação da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*.

Os resultados obtidos por ASSIS (1997), mostraram que a transferência de 2×10^7 células esplênicas totais dois dias antes do desafio com 10^2 formas de TC foram capazes de induzir resistência à infecção nos camundongos SCID. Esta suspensão celular era constituída por 1×10^7 linfócitos B e por 9×10^6 linfócitos T totais com 6×10^6 linfócitos T $CD4^+$ e 3×10^6 linfócitos T $CD8^+$. Nos experimentos, estas relações celulares foram utilizadas como parâmetro nos estudos da ação dos linfócitos nos SCID.

O estudo das funções dos linfócitos B e T foi realizado utilizando-se o método de repopulação com diferentes concentrações de linfócitos. Para tal finalidade, grupos de animais foram reconstituídos com 1×10^6 e 1×10^7 células esplênicas de BALB/c nu/nu como fonte de linfócitos B e 5×10^6 células esplênicas enriquecidas com linfócitos T (SCID/enr.T), e grupos de animais reconstituídos com 8×10^5 ou 2×10^6 linfócitos T normais (SCID/LT) dois dias antes da infecção com 10^2 formas de TC.

Os resultados apresentados na Fig. 5 mostraram que, os linfócitos B não apresentaram a capacidade de regular a infecção, com evolução da parasitemia similar aos animais não repopulados.

O perfil de infecção dos camundongos (SCID/enr.T) ao longo infecção (Fig. 6A) mostrou uma evolução similar ao dos SCID não reconstituídos na fase inicial, com uma diferença na segunda fase da infecção, correspondente ao período da mortalidade nos camundongos SCID 19 ± 2 dias. Nesse período, os animais (SCID/enr.T) apresentaram controle da parasitemia (Fig. 6A) com 100 % de sobrevida (Fig. 7A).

Os (SCID/LT) apresentaram perfil de infecção distinto dos animais não repopulados (Fig. 6B). Observou-se uma diferença na evolução da infecção com 8×10^5 células com dois picos de parasitemia, enquanto que com 2×10^6 células, houve uma evolução com pico, seguido pelo controle da infecção.

Contudo, com relação à mortalidade, ambos os grupos 8×10^5 e 2×10^6 células, apresentaram 80 % de sobrevivência (Fig. 7B). A diferença esteve presente na mortalidade no 28º dia para o grupo que recebeu 8×10^5 células, e no 36º dia após a infecção para os animais repopulados com 2×10^6 células, quando comparados com os SCID com 100 % de mortalidade, e dia médio de mortalidade 19 ± 2 dias.

A influência da resposta inata induzida pelo parasita nos camundongos SCID, na fase inicial da estimulação dos macrófagos e células NK, e no período de secreção das citocinas no desenvolvimento da resposta adaptativa foi estudada, utilizando-se SCID previamente infectados com o parasita e transferência de linfócitos no 5º e no 10º dias após a infecção.

Os resultados, apresentados na Fig. 6C mostram que a resposta do hospedeiro no 5º dia após a infecção, foi capaz de estimular os linfócitos no sentido de regular o nível de parasitas circulantes e mortalidade. Já no 10º dia, período no qual o SCID inicia a liberação de parasitas intracelulares, não apresentou nenhum efeito regulatório no controle da infecção. Os animais reconstituídos no 5º dia após a infecção, foram capazes de controlar parcialmente a mortalidade com um dia médio de mortalidade no $28^\circ \pm 8$ dias com 40 % de mortalidade (Fig. 7C).

Após o 40º dia de infecção, os animais foram sacrificados para avaliação do número de células implantadas no baço, e a atividade funcional

das células esplênicas ao estímulo com a Con A e TC. Observou-se um aumento de celularidade nesses animais (6.5×10^7 células/baço) em relação ao SCID normal ($4.2 \pm 0.7 \times 10^6$ células/baço), porém em relação ao BALB/c/Uni ($2 \pm 0.3 \times 10^8$ células/baço), sendo que no período da análise ele foi inferior.

Funcionalmente mostrou, manutenção da capacidade proliferativa frente ao parasita, com produção de IFN- γ nos níveis compatíveis ao animal imunocompetente, e nesse período as células estimuladas não produziram NO.

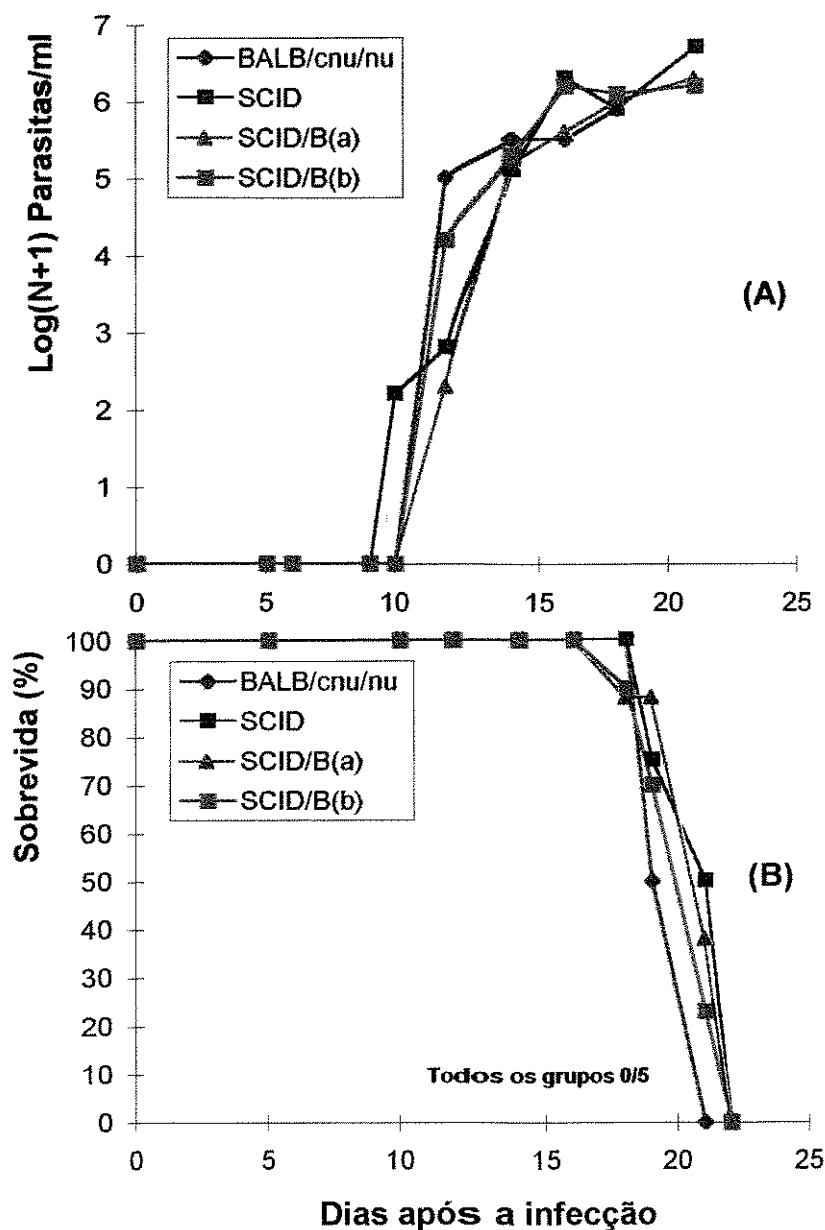


Fig.:5 (A) Influência dos linfócitos B no perfil de parasitemia em camundongos infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. BALB/c nu/nu e SCID (controles). SCID reconstituídos com 1×10^6 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(a) e 1×10^7 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(b). **(B)** Sobrevida de camundongos infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. BALB/c nu/nu e SCID (controles). SCID reconstituídos com 1×10^6 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(a) e 1×10^7 linfócitos B/animal $\Rightarrow$ SCID/B(b).

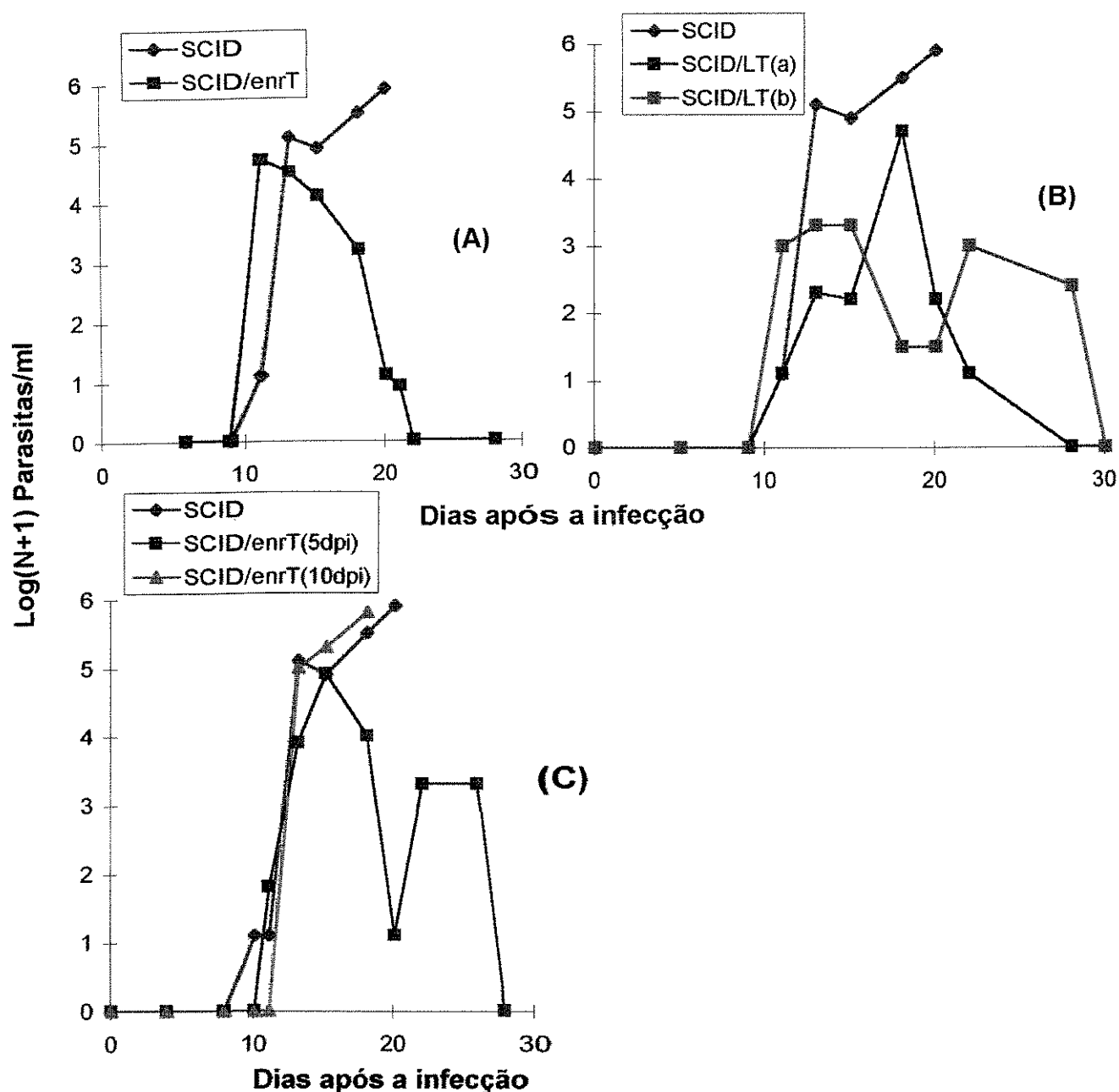


Fig.:6 Influência da reconstituição celular, dois dias antes da infecção com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. (A) SCID reconstituídos com 5×10^6 células esplênicas/animal, enriquecida com linfócitos T $\Rightarrow$ SCID/enr.T. (B) SCID reconstituídos com linfócitos T, 2×10^6 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(a) e 8×10^5 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(b). (C) Efeito da reconstituição com 5×10^6 células esplênicas/animal enriquecida com linfócitos T no 5º e 10º dpi.

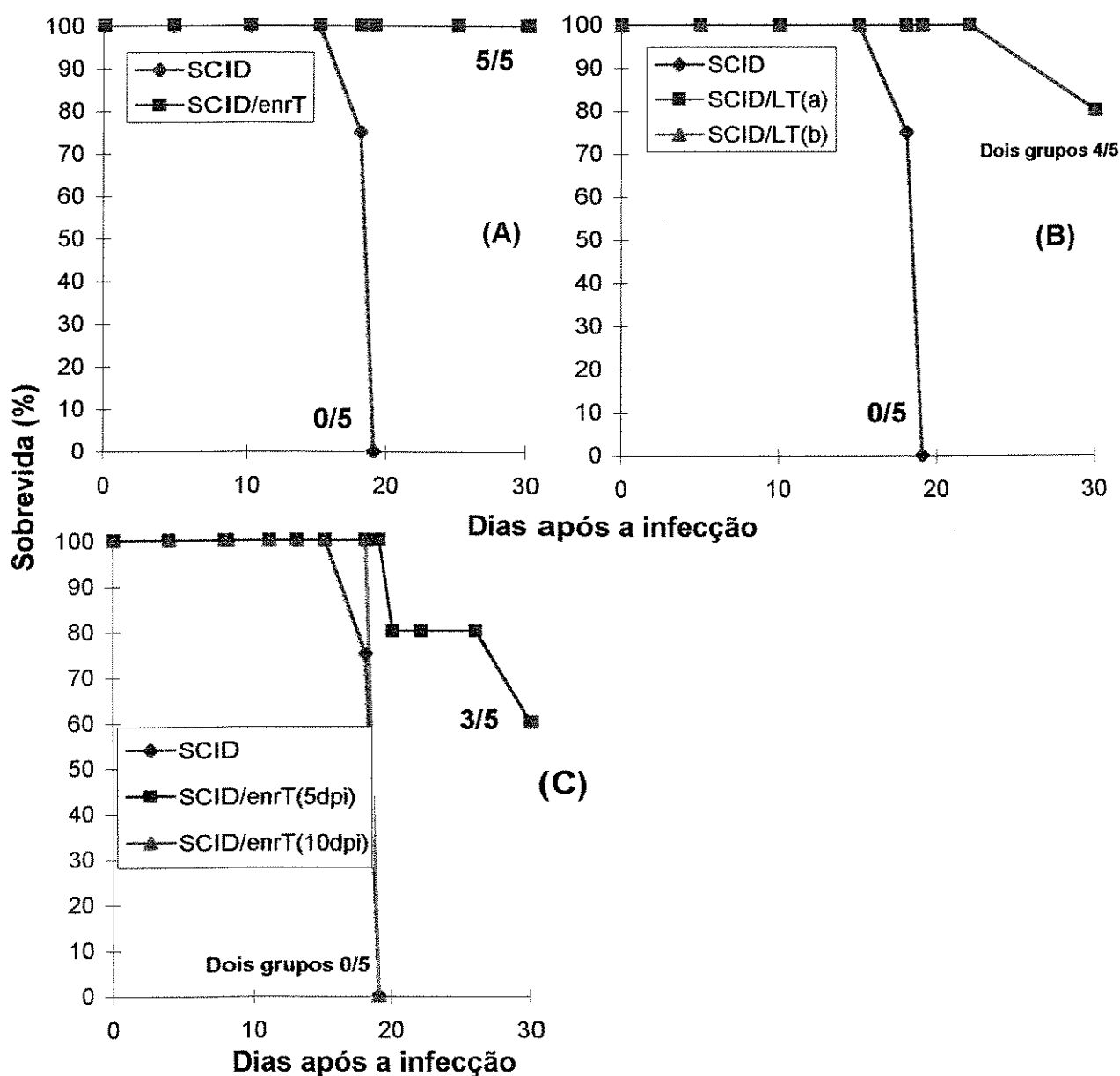


Fig.:7 Influência da reconstituição celular na sobrevivência de camundongos, dois dias antes da infecção com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi* por animal. (A) SCID reconstituídos com 5×10^6 células esplênicas/animal, enriquecida com linfócitos T $\Rightarrow$ SCID/enr.T. (B) SCID reconstituídos com linfócitos T, 2×10^6 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(a) e 8×10^5 linfócitos T/animal $\Rightarrow$ SCID/LT(b). (C) Efeito da reconstituição com 5×10^6 células esplênicas/animal enriquecida de linfócitos T no 5º e 10º dpi.

4.4 A influência das subpopulações de linfócitos T.

O estudo das subpopulações de linfócitos foi realizado utilizando-se os SCID/CD4⁺ (a) e (b) correspondendo respectivamente aos SCID implantados com 3×10^6 e 6×10^6 linfócitos T CD4⁺. Os SCID repopulados com 3×10^6 linfócitos T CD8⁺ foram obtidos conforme, a indicação descrita em materiais e métodos (item n° 3.12) (SCID/CD8⁺), e infectados com 10^2 formas de parasitas por animal.

Os resultados apresentados na Fig. 8 mostraram que, ambas as subpopulações de linfócitos T foram capazes de induzir um controle no nível de parasitas circulantes, porém apresentaram cinética distintas. Com os linfócitos T CD4⁺ verificou-se a importância da concentração de células implantadas, nos SCID/CD4⁺(a) os linfócitos implantados não foram capazes de exercer nenhum efeito regulatório no controle da infecção (Fig. 8A). No entanto, os SCID/CD4⁺(b) foram eficientes desde a fase inicial da infecção, com a manutenção de baixos níveis de parasitas por 30 dias (Fig. 8B). Os linfócitos T CD8⁺ (SCID/CD8⁺) foram menos eficientes do que os linfócitos T CD4⁺ na primeira fase, com uma queda gradual ao longo da infecção (Fig. 8C). Com relação à mortalidade, os linfócitos T CD4⁺ apresentaram maior eficiência do que os linfócitos T CD8⁺ com 30 % de mortalidade (Fig. 9B) com uma mortalidade média de 29 ± 7 dias em relação aos linfócitos T CD8⁺ com 75 % de mortalidade (Fig. 9D), e dia médio de mortalidade 23 ± 8 dias.

Os animais transplantados com linfócitos T CD4⁺ apresentaram 5% de linfócitos T CD8⁺ implantados, que poderiam influenciar a resposta do

hospedeiro na indução da resistência. Para verificar a hipótese da participação dos linfócitos T CD8⁺ na regulação da infecção, um grupo de camundongos SCID, foram inoculados com $1,5 \times 10^6$ linfócitos T CD8⁺ no 5º dia após a infecção. O resultado da infecção mostrou que, os animais apresentaram uma evolução similar ao dos SCID na primeira fase, e com uma diferença na segunda fase da infecção, com o controle do nível de parasitas circulantes (Fig. 8C) com 100 % de mortalidade no 24º dia após a infecção (Fig. 9C), sugerindo, nessas condições experimentais, uma participação dos linfócitos T CD8⁺ no controle de parasitas circulantes.

4.5 Influência da estimulação inicial dos linfócitos T CD4⁺ sobre os linfócitos T CD8⁺.

O efeito da estimulação inicial dos linfócitos T CD4⁺ foi estudado, utilizando-se animais SCID/CD4⁺(a) ou SCID/CD4⁺(b) com linfócitos T CD4⁺ implantados, infectados com 10^2 formas de parasita por animal, e no 5º dia após a infecção os animais foram repopulados com $1,5 \times 10^6$ linfócitos T CD8⁺ ou (SCID/CD4⁺/CD8⁺).

Os resultados apresentados nas Fig. 8A e 9A, evidenciam que 3×10^6 linfócitos T CD4⁺ implantados, não foram capazes de estimular os linfócitos T CD8⁺, apresentando o mesmo perfil de parasitemia e de mortalidade dos SCID não repopulados.

Entretanto no caso dos SCID/CD4⁺(b), a transferência dos linfócitos T CD8⁺ no 5º dia após a infecção, mostrou um aumento na eficiência do controle da infecção, induzindo uma alteração na parasitemia com um

controle efetivo do parasita, a partir do 15º dia após a infecção com 10 % de mortalidade (Fig. 9B).

4.6 Influência da estimulação inicial dos linfócitos T CD8⁺ sobre os linfócitos T CD4⁺.

Para o estudo, desta estimulação inicial, os SCID/CD8⁺ foram infectados e no 5º dia após a infecção, os animais foram repopulados com 1.5×10^6 linfócitos T CD4⁺ (SCID/CD8⁺/CD4⁺). Os resultados mostraram uma alteração na evolução da parasitemia com duas fases distintas, onde, na primeira fase, houve uma diminuição significativa do número de parasitas circulantes, com um período de controle total, e a segunda fase com pico de parasitemia no 25º dia após a infecção, com controle posterior em relação aos animais repopulados, apenas CD8⁺ com 40% de mortalidade com um dia médio de mortalidade 30 ± 6 dias comparativamente ao 75 % de mortalidade nos SCID/CD8⁺ com dia médio no 23 ± 8 dias (Fig. 9D).

O conjunto de resultados mostraram que, ambas as subpopulações de linfócitos apresentaram capacidade de controlar a destruição intracelular de parasitas, com eficiências distintas, sugerindo a importância da estimulação inicial dos linfócitos T CD4⁺ para a indução da função citotóxica, dos linfócitos T CD8⁺ ou ambas as subpopulações iniciam a sua ativação à partir do 5º dia após a infecção.

Com a finalidade de compreender o mecanismo de ação das duas subpopulações de linfócitos T, grupos de animais foram sacrificados no 14º e no 40º dia após a infecção, e as células esplênicas foram analisados no

sentido de observar a expansão celular e sua funcionalidade frente ao estímulo “in vitro” com o *Trypanosoma cruzi*.

O número de células implantados nesses animais apresentaram uma variação individual, tanto nos animais normais como nos animais infectados.

Os animais reconstituídos com os linfócitos T CD4⁺ ou CD8⁺ demonstraram, uma cinética de expansão celular distintas. Os animais implantados com linfócitos T CD4⁺, apresentaram um aumento no número de células em relação ao SCID não repopulados em aproximadamente quatro vezes, enquanto os animais implantados com linfócitos T CD8⁺ mantiveram níveis iguais ao SCID, e expansão no 40º dia após a infecção, sendo que aparentemente os linfócitos T CD8⁺ controlam a expansão das células T CD4⁺ “in vivo”.

Os resultados da estimulação “in vitro” das células esplênicas com o *Trypanosoma cruzi* mostraram que, os animais reconstituídos com os linfócitos T CD4⁺ apresentaram capacidade proliferativa igual ao do BALB/c/Uni, porém nos animais reconstituídos com linfócitos T CD8⁺ o índice de proliferação foi inferior aos camundongos BALB/c/Uni e similar ao SCID não reconstituídos. No 14º dia após a infecção, os linfócitos T CD4⁺ estão bloqueados, enquanto os linfócitos T CD8⁺ estão na fase de estimulação, e recuperação da capacidade proliferativa dos linfócitos T CD4⁺ quando associados com os linfócitos T CD8⁺. Este resultados sugerem que os linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ são estimulados por mecanismos distintos (Tabela II).

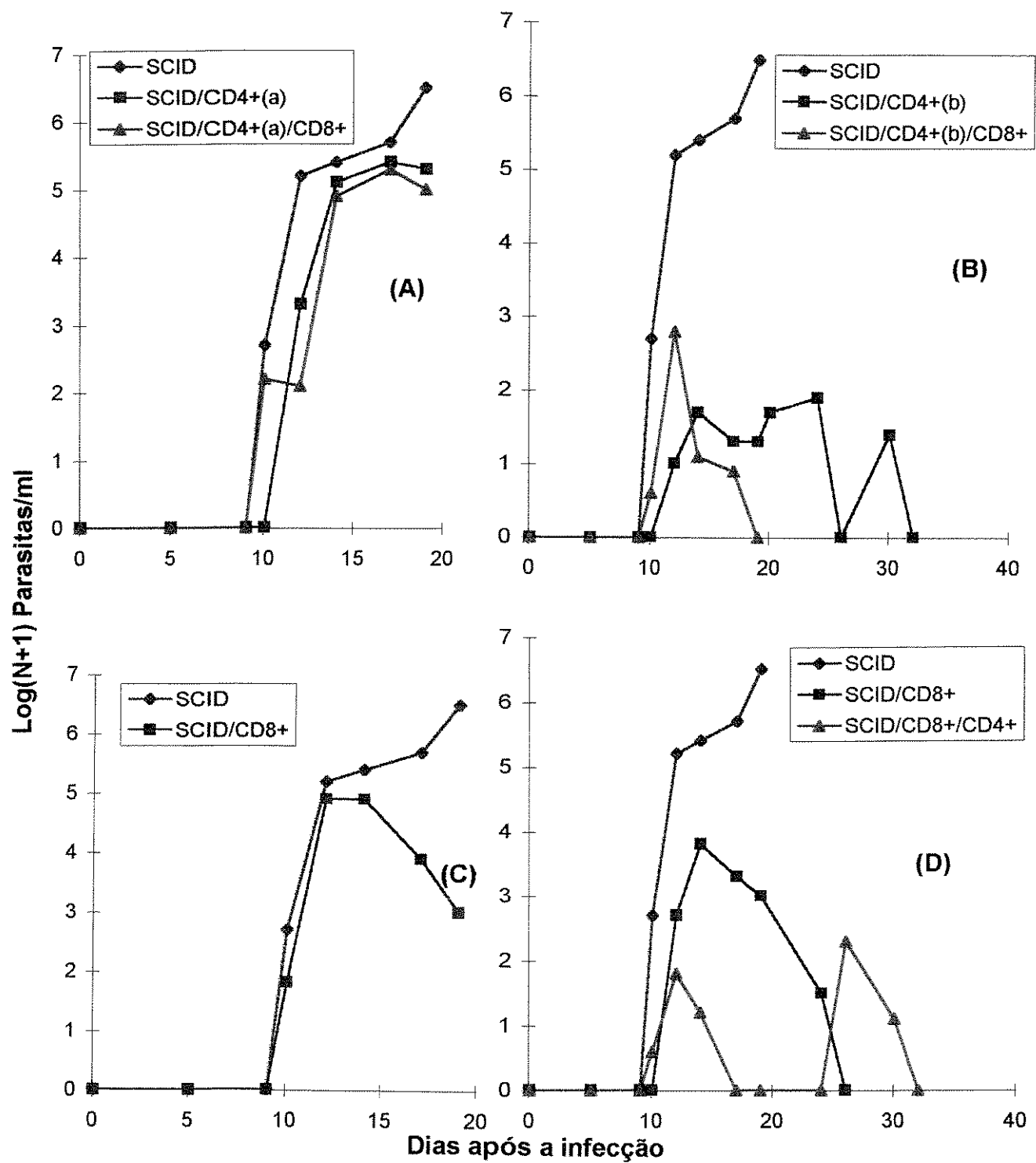


Fig.:8

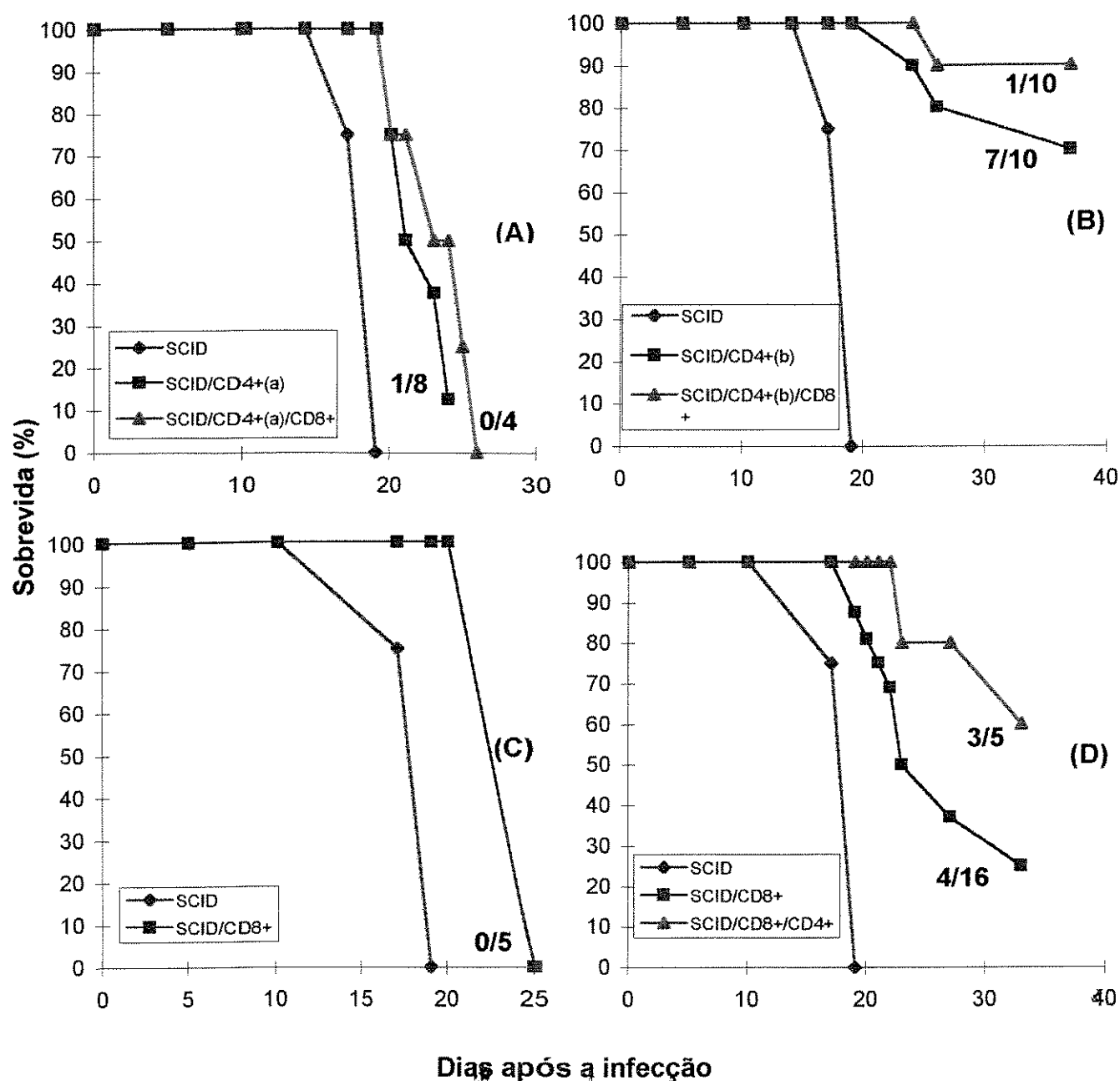


Fig.:9 Sobrevida de camundongos SCID infectados com 10^2 formas de *Trypanosoma cruzi*. (A) SCID (controle). SCID transplantados com 5×10^6 timócitos/animal $\Rightarrow$ SCID/CD4⁺(a) e repopulados no 5º dpi com 1.5×10^6 linfócitos T CD8⁺/animal $\Rightarrow$ SCID/CD4⁺(a)/CD8⁺. (B) SCID transplantados com 5×10^7 timócitos/animal $\Rightarrow$ SCID/CD4⁺(b) e repopulados no 5º dpi com 1.5×10^6 linfócitos T CD8⁺/animal $\Rightarrow$ SCID/CD4⁺(b)/CD8⁺. (C) SCID reconstituídos no 5º dpi com 1.5×10^6 linfócitos T CD8⁺/animal $\Rightarrow$ SCID/CD8⁺. (D) SCID reconstituídos com 3×10^6 linfócitos T CD8⁺/animal $\Rightarrow$ SCID/CD8⁺ e repopulados no 5º dpi com 1.5×10^6 linfócitos T CD4⁺/animal $\Rightarrow$ SCID/CD8⁺/CD4⁺.

Tabela II - Índice de Proliferação dos linfócitos T CD4⁺ e T CD8⁺ nos camundongos repopulados com subpopulações de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e estimulados “in vitro” no 14° e 40° dia após a infecção com *Trypanosoma cruzi*.

Animais	Controle	14°	40°
BALB/c/Uni	4.8 ± 0.3	2.9 ± 1.1	4.3 ± 0.3
SCID	3.7 ± 0.7	1.9 ± 0.7	
SCID/CD4 ⁺ (b)	4.5 ± 0.9	1.3 ± 0.8	3.5 ± 1.4
SCID/CD8 ⁺	2.7	4.0 ± 0.1	2.9 ± 0.5
SCID/CD4 ⁺ (b)/CD8 ⁺		4.9 ± 0.8	4.3 ± 1.3
SCID/CD8 ⁺ /CD4 ⁺		4.9 ± 0.3	2.4 ± 0.3

IP -Índice de Proliferação

Os resultados foram expressos como a média ± o desvio padrão.

A produção de $\text{INF-}\gamma$ no 14º dia após a infecção, não mostrou diferenças significativas entre os linfócitos T CD4^+ e CD8^+ , mas no 40º dia após a infecção todos os grupos de animais apresentaram os mesmos níveis de $\text{INF-}\gamma$ de animais não infectados (Tabela III).

Tabela III - Produção de $\text{INF-}\gamma$ pelas células esplênicas de camundongos SCID implantados com linfócitos T CD4^+ e T CD8^+ , e estimulados “in vitro” com *Trypanosoma cruzi* no 14º e 40º dia após infecção.

Animais	Controle	14º	40º
BALB/c/Uni	1.1 $\pm$ 0.3	19.6 $\pm$ 0.3	2.5 $\pm$ 0.4
SCID	1.6 $\pm$ 0.3	3.8 $\pm$ 1.2	
SCID/ CD4^+ (b)	1.4 $\pm$ 0.5	2.9 $\pm$ 0.9	1.2 $\pm$ 0.2
SCID/ CD8^+	1.3 $\pm$ 0.5	2.8 $\pm$ 0.5	1.2 $\pm$ 0.3
SCID/ CD4^+ (b)/ CD8^+		3.1 $\pm$ 0.5	1.8 $\pm$ 0.5
SCID/ CD8^+ / CD4^+		7.1 $\pm$ 0.4	1.9 $\pm$ 2.8

Valores das Unidades de $\text{INF-}\gamma = 10^3$ (U/ml).

Os resultados foram expressos como a média $\pm$ o desvio padrão.

Com relação a secreção de NO, os resultados mostram que, os linfócitos controlam a secreção NO, quando comparados com os SCID não repopulados. Sugerindo um equilíbrio entre a ativação do macrófago para a estimulação de linfócitos, confirmando essa hipótese a associação de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ mostraram um baixo nível de secreção de NO, no entanto, estes resultados quando comparados com os resultados dos camundongos BALB/c foram diferentes (Tabela IV).

Tabela IV - Produção de NO em μMol pelas células esplênicas de camundongos SCID, implantados com linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺, e estimulados “in vitro” com *Trypanosoma cruzi* no 14° e 40° dia após a infecção.

Animais	Secreção de NO (μMol)		
	14°dpi		40°dpi
	Meio	TC	
BALB/c/Uni	21 $\pm$ 8.0	36 $\pm$ 15	< 5
SCID	44 $\pm$ 20	93 $\pm$ 11.5	
SCID/CD4 ⁺ (b)	44 $\pm$ 1.4	52 $\pm$ 10	17 $\pm$ 1.4
SCID/CD8 ⁺	10 $\pm$ 2.8	50 $\pm$ 21	28
SCID/CD4 ⁺ (b)/CD8 ⁺	5	5	< 5
SCID/CD8 ⁺ /CD4 ⁺	9 $\pm$ 4.2	45 $\pm$ 15	25 $\pm$ 7.0

TC- Tripomastigota de cultura celular

Os valores foram expressos como a média $\pm$ o desvio padrão.

5.DISSCUSSÃO

Os camundongos SCID foram susceptíveis à infecção pelo *Trypanosoma cruzi* com a cepa Y, estoque TC (avirulenta), quando comparados com a linhagem congênica BALB/c/Uni (Fig. 1), em concordância com os resultados obtidos por ASSIS (1997), e compatíveis ainda, com a susceptibilidade observada nos camundongos atímicos, e nos knock out em RAG^{-/-} (KIERZENBAUM & PIENKOWSKI, 1979; ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1996).

As células esplênicas de camundongos SCID normais estimulados “in vitro”, com formas vivas de tripomastigotas foram capazes de induzir proliferação celular e produção de IFN- γ , tão eficientemente quanto as células esplênicas da linhagem congênica BALB/c/Uni (Tabela I).

Estes resultados, encontram apoio nos trabalhos realizados por CARDILLO *et al.*, (1996), com o sentido de elucidar, o mecanismo de defesa do hospedeiro, no período que antecede à ação dos linfócitos T. Neste estudo, utilizando os camundongos atímicos, os autores apontaram as células NK como produtoras de IFN- γ , onde os macrófagos estimulados com tripomastigotas vivos secretavam fatores que induziam, a ativação e regulação da produção de IFN- γ pelas células NK. O fator ativador das células NK, secretado pelos macrófagos estimulados com formas vivas, foi caracterizado como IL-12 (ALIBERTI *et al.*, 1996 ; FROSCH *et al.*, 1996).

Em nossos experimentos, as células esplênicas normais dos camundongos das linhagens SCID ou BALB/c/Uni estimulados com parasitas não foram capazes de induzir a produção de NO, conforme

demonstrado por outros autores, como VESPA *et al.*, (1994) e PETRAY *et al.*, (1994).

A análise funcional das células esplênicas de camundongos SCID e BALB/c/Uni infectados, mostraram uma perda na capacidade proliferativa quando estimulados “*in vitro*” com tripomastigotas vivos ao longo da infecção (Fig. 2). A supressão da resposta proliferativa das células do SCID encontra apoio nos estudos realizados com as células de animais infectados com vírus realizados por PISA *et al.*, (1993), em que as células NK ativadas podem suprimir a mielopoiese. Outro fenômeno que pode estar ocorrendo é a indução da morte celular devido a presença de altas concentrações de produtos tóxicos para as células como, NO e TNF- α .

Através de um estudo comparativo da resposta dos linfócitos ao mitógeno Con A ou lisado de parasita CUROTO DE LAFAILLE *et al.*, (1990), e HOFF *et al.*, (1993), demonstraram a presença de linfócitos antígeno específicos, mesmo quando inibidos, frente ao mitógeno Con A.

A inibição da capacidade proliferativa dos linfócitos específicos foi relacionada com a diminuição da produção da IL-2, aumento da produção de IFN- γ (VANDERKERCKHOVE *et al.*, 1994), com produtos de macrófagos ativados, como TNF- α , NO e/ou prostaglandina (ABRAHAMSOHN & COFFMAN, 1995), ou por morte celular programada, por apoptose (NUNES *et al.*, 1998).

A cinética de produção de IFN- γ foi similar em ambas as linhagens, (Fig. 3) entretanto os camundongos BALB/c/Uni à partir do sétimo dia, apresentaram uma diferenciação na produção de IFN- γ , mostrando a participação dos linfócitos T como principal fonte de IFN- γ , em concordância com os resultados obtidos por NARBORS & TARLETON, (1991).

Ao longo da infecção, as células esplênicas dos camundongos SCID, estimulados “in vitro” secretaram concentrações superiores de NO em relação ao BALB/c/Uni (Fig. 4). Esta diferença pode ser explicada pela expansão de populações celulares diferentes.

Nos camundongos BALB/c/Uni a dinâmica de secreção de NO, encontra apoio nos estudos realizados com as cepas Y e Tulahuén (VESPA *et al.*, 1994; PETRAY *et al.*, 1994), onde os autores correlacionaram o NO com o mecanismo, de controle da replicação intracelular do parasita.

A importância do mecanismo de controle da proliferação do parasita intracelular envolvendo IFN- γ e NO, foram confirmados em animais deficientes na expressão gênica da enzima NO sintase induzível, e para receptores de IFN- γ . Através da parasitemia precoce, com altos níveis de parasitas circulantes, comparativamente aos animais não deficientes. (ROTTEMBERG *et al.*, 1996; HOLSHER *et al.*, 1998).

A susceptibilidade dos camundongos SCID não está diretamente correlacionada a inibição das funções dos macrófagos, mas a um mecanismo de regulação, mediados pelos linfócitos T.

Para o estudo das funções dos linfócitos, foram utilizados alguns parâmetros estabelecidos por ASSIS (1997), a repopulação com 2×10^7 células esplênicas normais de BALB/c constituídas de 9×10^6 linfócitos B, e 9×10^6 linfócitos T totais e 6×10^6 T CD4⁺ e 3×10^6 TCD8⁺.

Os linfócitos B mostraram a ineficiência, no controle dos parasitas circulantes na fase aguda da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. Nos camundongos SCID (Fig. 5A), confirmou-se os estudos anteriores de que a ativação policlonal induz a produção de anticorpos, com baixa especificidade e como consequência a sua ineficiência, no controle da infecção (MINOPRIO *et al.*, 1988, TAKEHARA *et al.*, 1989).

Os linfócitos T induziram alterações, nos níveis de parasitas circulantes, e na mortalidade (Fig. 6B, 7B). Este resultado, encontra respaldo nos estudos de TRISCHMAN (1983), apontando o papel dos linfócitos T, na fase aguda da infecção. Com relação à concentração de linfócitos, observou-se que, baixas concentrações foram capazes de induzir, resistência à infecção. Estes resultados, estão de acordo, com os estudos realizados por VARKILA *et al.*, (1993), para indução da resistência à infecção por *Leishmania major*, em camundongos SCID.

A estimulação do macrófago e as células NK “in vivo” nos camundongos SCID, infectados com o *Trypanosoma cruzi* permite o estudo, da interação do sistema inato envolvendo citocinas pro-inflamatória com o sistema adaptativo.

Os experimentos realizados repopulando-se os animais no 5º dia após a infecção, mostraram que, a IL-12 e IFN- γ , (Fig. 7C) foram capazes de induzir uma resposta específica do tipo Th1 (SCHMITT *et al.*, 1994). Este resultados encontram respaldo nas observações de CUROTTO DE LAFAILLE *et al.*, (1990), sobre a presença de linfócitos T antígeno específicos entre o 5º e 8º dia após a infecção.

Enquanto nos camundongos reconstituídos no 10º dia após a infecção, os linfócitos não foram capazes de reverter a infecção, sugerindo que o NO secretado inibem os linfócitos Th 1, e estimulam os linfócitos Th 2 (TAYLOR-ROBINSON *et al.*, 1994).

HOLSCHER *et al.*, (1998) relatou um mecanismo independente de IFN- γ , mas dependente da IL-12, na estimulação dos linfócitos Th1 em animais knock out em receptor para IFN- γ .

A mortalidade observada nos animais repopulados, dois dias antes da infecção e no 5º dia após a infecção, esta de acordo com os estudos realizados por SPRENT *et al.*, (1991), de que a distribuição das células do doador nos órgãos linfóides secundários do receptor, está na dependência do tempo de repopulação, possibilitando a interação entre as células apresentadoras de antígeno, com os linfócitos para a indução da resposta específica.

Nos estudos de implantação de subpopulações de linfócitos T CD4⁺ (RUDOLPHI *et al.*, 1991a; SPRENT *et al.*, 1991) demonstraram implantação de 85% a 98% de linfócitos T CD4⁺ nos órgãos linfóides

secundários. RUDOLPHI *et al.*, (1991b), observaram que, a implantação dos linfócitos T CD8⁺, requer a inoculação de IL-2 recombinante ou baixa concentração de T CD4⁺.

Os linfócitos T CD4⁺ induziram resistência a infecção, com controle de parasitemia, mas com manutenção de parasitas, por um período longo de infecção, e retardamento no período de mortalidade com 70 % de sobrevivência (Fig. 8B, 9B). Estes resultados encontram apoio nos experimentos realizados por ROTEMBERG *et al.*, (1995), e TARLETON *et al.* (1996) em camundongos knock out em CD4⁺CD8⁻ e em MHC de classe I.

Os linfócitos T CD8⁺ apresentaram um controle gradativo dos parasitas circulantes, com 25 % de sobrevivência (Fig. 8D, 9D). Resultados similares foram obtidos por ROTEMBERG *et al.*, (1995).

O perfil de parasitas circulantes sugerem que, os linfócitos T CD8⁺ iniciam a sua ação citotóxica, em período posterior aos linfócitos T CD4⁺. ROTEMBERG *et al.*, (1995).

Nas condições experimentais utilizadas, o controle da infecção necessita da ação sinérgica das duas subpopulações.

No estudo da associação das duas subpopulações T CD4⁺ (6×10^6) e T CD8⁺ (1.5×10^6), ocorreu um aumento na eficiência do controle de parasitas circulantes, com 90% de sobrevivência (Fig. 8B, 9B). A associação dos linfócitos T CD8⁺ (3×10^6) com linfócitos T CD4⁺ (1.5×10^6) demonstrou uma alteração no perfil de parasitemia, com 60% de sobrevivência confirmando a necessidade das duas subpopulações, para a regulação da infecção.

Os linfócitos T CD4⁺ normais são estimulados policlonalmente “in vivo” ou “in vitro” enquanto, os linfócitos T CD8⁺ foram estimulados somente no 14º dia após a infecção, “in vivo” ou “in vitro” no período de imunossupressão dos T CD4⁺ (Tabela II). A ativação policlonal dos linfócitos T CD4⁺ foi também observada por MINOPRIO *et al.*, (1987) e a supressão por NUNES *et al.*, (1998).

A associação dos linfócitos mostrou que, os linfócitos T CD8⁺ aparentemente inibem a ativação policlonal dos linfócitos T CD4⁺, fenômeno similar, foi anteriormente descrito por (MINOPRIO *et al.*, 1987).

Nenhuma diferença significativa foi observada, na concentração de IFN- γ e de NO produzidos por ambas as células (Tabela III e IV) mostrou que, essas células regulam a secreção nos SCID minimizando a susceptibilidade, e aparentemente quando associados os linfócitos T CD8⁺ controlam a secreção de NO. Estes dados, sugerem que, as duas subpopulações de linfócitos controlam a multiplicação intracelular dos parasitas, através de mecanismos diferentes, os linfócitos T CD4⁺ ativando o macrófago através do IFN- γ (MACCABE *et al.*, 1991 GAZZINELLI *et al.*, 1992), e os linfócitos T CD8⁺ através da função citotóxica (NICKELL *et al.* 1993).

O estudo da função dos linfócitos T CD8⁺ realizados com clones isolados de animais da fase crônica (WIZEL *et al.*, 1997), mostraram “in vitro” a função citotóxica e “in vitro” a função imunoprotetora mediada por INF- γ e NO. KUMAR & TARLETON (1998), demonstraram, a atividade

citotóxica mediada por linfócitos T CD8⁺ independente de granzima B-/perfurina. Os autores sugerem dois mecanismos citolíticos alternativos; um dependente de Fas/FasL, e o outro dependente de TNF- α e INF- γ .

O conjunto dos resultados obtidos com o estoque avirulento da cepa Y de *Trypanosoma cruzi* mostra que, os linfócitos T CD4⁺ regulam a infecção ativando o macrófago através do INF- γ . Os linfócitos T CD8⁺ secretores de INF- γ , regulam a replicação dos parasitas, através da sua função citotóxica.

Os resultados sugerem ainda que, os linfócitos T CD4⁺ são essenciais para a estimulação dos linfócitos T CD8⁺ na regulação da infecção, seja no controle dos parasitas intracelulares e da mortalidade.

6 . CONCLUSÕES

- 1- Os camundongos SCID foram susceptíveis a infecção pelo *Trypanosoma cruzi* com a cepa Y, quando comparados com os camundongos imunocompetentes.
- 2- Os camundongos SCID induziram produção de IFN- γ e de NO com cinética similar ao dos camundongos BALB/c/Uni. Nos animais BALB/c/Uni à partir do sétimo dia, ocorreu uma diferenciação na produção de IFN- γ evidenciando a participação dos linfócitos T como principal fonte de IFN- γ .
- 3- Os linfócitos B não apresentaram a capacidade de controlar a parasitemia na fase aguda da infecção. No entanto os linfócitos T em baixas concentrações induziram resistência à infecção.
- 4- Os linfócitos T CD4⁺ induziram resistência à infecção com controle de parasitemia, retardando o período de mortalidade, enquanto os linfócitos T CD8⁺ apresentaram um controle parcial dos parasitas circulantes. Os linfócitos T CD8⁺ iniciam a ação citotóxica, no período posterior aos linfócitos T CD4⁺.
- 5- A associação das duas subpopulações T CD4⁺ e T CD8⁺ aumentou a eficiência no controle do número de parasitas circulantes e sobrevivência, enquanto a associação dos linfócitos T CD8⁺ com T CD4⁺ demonstrou alteração no perfil de parasitemia, confirmando a necessidade das duas subpopulações para regular a infecção.
- 6- Os linfócitos T CD4⁺ regulam a infecção ativando o macrófago através do IFN- γ , enquanto a função citotóxica é realizada através dos linfócitos T CD8⁺ secretores de IFN- γ .

7.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Referências Bibliográficas

- ABRAHAMSOHN, I. & COFFMAN, R. L. 1995. Cytokine and nitric oxide regulation of the immunosuppression in *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 155:3955-3963.
- ABRAHAMSOHN, I. & COFFMAN, R. L. 1996. *Trypanosoma cruzi*: IL-10, TNF, IFN-gama and IL-12 regulate innate and acquired immunity to infection. **Exp. Parasitol.** 84:231-244.
- ALIBERTI, J. C. S., CARDOSO, M. A. G., MARTINS, G. A. GAZZINELI, R. T., VIEIRA, L. Q. & SILVA, J. S. 1996. Interleukin-12 mediates resistance *Trypanosoma cruzi* in mice and is produced by murine macrophages in response to live trypomastigotes. **Infect. Immun.** 64: 1961-1967.
- ARAÚJO, F.G. 1989. Developement of resistance to *Trypanosoma cruzi* in mice depends on a viable population of L3T4⁺ (CD4⁺) T lymphocytes. **Infect. Immun.** 57: 2246-2248.
- ASSIS, A.M. 1997. O papel das células linfóides de camundongos BALB/c normais e do anticorpo anti-*T.cruzi* em camundongos C.B.-17 scid/scid infectados com o *Trypanosoma cruzi*. Tese de Mestrado apresentada ao Instituto de Biologia-Unicamp.
- BERGROTH, V., REITANO, S., KONTTINEN, Y.T. LALLA, M. 1980. Sensitivity and nonspecific staining of various immunoperoxidase techniques. **Histochemistry.** 68:17-22.
- BRENER, Z. 1980. Immunity to *Trypanosoma cruzi*. **Adv. in Parasitol.** 18:247-291.

- BOSMA, G. C., DAVISON, M. T., RUTTSCH, N. R., SWEET, H. O., SCHULTZ, L. D. BOSMA, M. J. BOSMA. 1989. The mouse severe combined immune deficiency (scid) is on chromosome 16. **Immunogenetics**. 29:54-57.
- CARDILLO, F., VOLTARELLI, J. C., REED, S. G., & SILVA, J. S. 1996. Regulation of *Trypanosoma cruzi* infection in mice by gamma interferon and interleukin 10: Role of NK cells. **Infect. Immun.** 64:128-134.
- CASTANOS VELEZ, E., MAERLAN S., OSORIO, M. LYDA, ABERG, F. BIBERFIELD, P., ORN, A. & ROTTENBERG M. E. 1998. *Trypanosoma cruzi* infection in tumor necrosis factor receptor p55-deficient mice. **Infect. Immun.** 66:2960-2968.
- CUNHA-NETO, E., DURANTI, M., GRUBER, A., ZINGALES, B., De MESSIAS I., BELLOTTI, G., PILLEGGI, F., PATARROYO, M.E., KALIL. 1995. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: Biological relevance of a cardiac myosin-specific epitope cross-reactive to na immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci USA**. 92: 3541-3545.
- CUROTO DE LAFAILLE, M., OLIVEIRA, B. L. C., LIMA, C. G. & ABRAHAMSOHN, I. A.1990. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance of parasite-specific T cell responses in lymphnodes during the acute phase of the infection. **Exp. Parasitol.** 70:164-174.
- DING, A. H., NATHAN, C. F. & STUEHR, D. S. 1988. Release of reactive nitrogen intermediates and reactive oxygen intermediates from mouse peritoneal macrophages: Comparasion of activantig cytokines and evidence for independent production. **J. Immunol.** 41:2407-2412.

- FLAMME L. A., KAHN, S., RUDENSKY, Y. A. & VOORHIS VAN, C. W. 1997. *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages are defective in major histocompatibility complex class II antigen presentation. **Eur. J. Immunol.** 27: 3085-3094.
- FREY, J. R., ERNST, B., SUR, H. C. D. & SPRENT, J. 1992. Thymus-grated SCID mice show transient thymopoiesis and limited depletion of V-beta-11 positive T cells. **J. Exp. Med.** 175:1067-1071.
- FROSCH, S., KRAUS, S., FLEISCHER, B. 1996. *Trypanosoma cruzi* is a potent inducer of interleukin-12 production in macrophages. **Med. Microbiol. Immunol.** 185:189-193.
- GAZZINELLI, R.T., OSWALDO, I. P., HIENY, S. L. & SHER, A. 1992. The microbicidal activity of interferon- γ -treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an L-arginine-dependent nitrogen oxide-mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor- β . **Eur. J. Immunol.** 22:2501-2506
- GORDON, B.E., DURFEE, W. J., BENNETT, M. & PAKES, S.P. 1991. Differential white blood cell counts as a preliminary screen for severe combined immunodeficient congenic mice. **Lab. Anim. Sci.** 41: 255-257.
- GREEN, L. C., WAGNER, D. A., GLOGOWSKI, J., SHIPPER, P. L., WISHNOK, J. S. & TONNENBAUM, S. R. 1982. Analysis of nitrate and nitrite, and (15N) nitrate in biological fluids. **Anal. Biochem.** 126:131-138.

- HEINZEL, F. P., M. D., SADICK, S. S. MUTHA & R. M. LOCKSLEY. 1991. Production of IFN- γ , IL-12, IL-14 and IL-10 by CD4⁺ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88:7011-7015.
- HOFF, D. F., LYNCH, R. G. & KIRCHHOFF, L. V. 1993. Kinetic analysis of antigen-specific immune responses in resistant and susceptible mice during infection with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 15:7038-7047.
- HOLSCHER, C., KOHLER, G., MULLER, U., MOSSMANN, H., SCHAUB, A. & BROMBACHER, F. 1998. Defective nitric oxide effector functions lead to extreme susceptibility of *Trypanosoma cruzi* mice deficient in gamma interferon receptor or inducible nitric oxide synthase. **Infect. Immun.** 66:1208-1215.
- HUNTER, C. A., SLIFER, T. & ARAÚJO, F. 1996. Interleukin-12-mediated resistance to *Trypanosoma cruzi* is dependent on tumor necrosis factor alpha and gamma interferon. **Infect. Immun.** 64:2381-2386.
- JULIUS, M. H., V. SIMPSON, & L. A. HERZEMBERG. 1973. A rapid method for isolation of functional thymus-derived lymphocytes. **Eur. J. Immunol.** 3: 645-649
- KIERSZENBAUM, F. & PIENKOWSKI, P. 1979. Thymus-dependent control of host defence mechanisms against *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Immun.** 24:117-123.
- KUMAR, S. & TARLETON, R. L. 1998. The relative contribution of antibody production and CD8⁺ T cell function to immune control of *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 20:207-216.

- MacCABE, R. E., MAGLER, S. G. & MULLINS, B. T. 1991. Endogenous interferon gamma, macrophage activation and murine host defense against acute infection with *Trypanosoma cruzi*. **Infect. Dis.** 163: 912-915.
- MINOPRIO, P., ELISEN, H., JOSKOWICZ, M., PEREIRA, P. & COUTINHO, A. 1987. Suppression of polyclonal antibody production in *Trypanosoma cruzi* infected mice by treatment with anti-L3T4 antibodies. **J. Immunol.** 139:545-550.
- MINOPRIO, P., BURLIN, O., PEREIRA, P., GUILBERT, B., ANDRADE, L., HONTEBEYRIE - JOSKOWICZ, M. & COUTINHO, A. 1988. Most B cells in acute *Trypanosoma cruzi* lack parasite specificity. **Scand. J. Immunol.** 28: 553-558.
- MINOPRIO, P., M. C. E. CHEIKH, E. MURPHY, M. HONTEBERIE-JOSKOWICZ, R. COFFMAN, A. COUTINHO, & O'GARRA. 1993. Xid-associated resistance to experimental Chagas' disease is IFN-gamma dependent. **J. Immunol.** 151:4200-4208.
- MOSMANN, T. R. 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J. Immunol. Meth.** 65: 55-63.
- MUNOZ-FERNANDEZ, M. A., M. A. FERNANDEZ, & M. FRESNO. 1992. Synergism between tumor necrosis factor- α and interferon- γ on macrophage activation for the killing of intracellular *Trypanosoma cruzi* through a nitric oxide-dependent mechanism. **Eur. J. Immunol.** 22:301-307.

- NABORS, G. S. & TARLETON, R. L. 1991. Differential control of IFN- γ and IL-2 production during *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 146:3591-3598.
- NICKELL, S. P., STRYKER, G. A., & AREVALDO, C. 1993. Isolation from *Trypanosoma cruzi* mice of CD8⁺, MHC-restricted cytotoxic T cells that lyse parasite-infected target cells. **J. Immunol.** 150:1446-1457.
- NUNES, P. M., ANDRADE, M. R., LOPES, F. MARCELA & Dos REIS, G. 1998. Activation-induced T cell death exacerbates *Trypanosoma cruzi* replication in macrophages cocultured with CD4⁺ T lymphocytes from infected hosts. **J. Immunol.** 160:1313-1319.
- OLIVARES FONT, E., & VRAY, B. 1995. Relationship between granulocyte - macrophage colony stimulating factor, tumour necrosis factor Alpha and *Trypanosoma cruzi* infection of murine macrophages. **Parasite Immunol.** 17:135-141.
- PLASMAN, N., J. G., GUILLET & B. VRAY. 1995. Impaired protein catabolism in *Trypanosoma cruzi*-infected macrophages: possible involvement in antigen presentation. **Immunol.** 86: 636-645.
- PANG, L. H., SANTOS, A. M. M., WIZEL, B. & TARLETON, L. R. 1998. Amastigote surface proteins of *Trypanosoma cruzi* are targets for CD8⁺CTL¹. **J. Immunol.** 160:1817-1823.
- PASSOS, L. A. C. & ALVES, D. P. 1996. Isoladores. IN: Manual para Técnicos em Bioterismo. De Luca, R.R., Alexandre, S.R., Marques, T., Souza, N.L., Merusse, J.L.B. e Neves, S.P.(eds). Segunda ed. São Paulo. 27-34.

- PETRAY, P., ROTTEMBERG, M. E., GRINSTEIN, N. S., ORN, A. 1994. Release of nitric oxide during the experimental infections with *Trypanosoma cruzi*. **Parasite Immunol.** 16:193-199.
- PISA, P., SITNICK, E., & HANSSON, M. 1993. Activated natural killer cells suppress myelopoiesis in mice with severe combined immunodeficiency. **Scand. J. Immunol.** 37:529-532.
- RANGEL, H. A., VERINAUD, L., CAMARGO, I. J. B., GILIOLI, R. & SAKURADA, J. K. 1994. *Trypanosoma cruzi*: Murine virus contaminant of the experimental infection. **Exp. Parasitol.** 78:429-431.
- REED, S.G. 1988. In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune suppression, and death in experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunol.** 140: 4342-4347.
- REED, S. G., C. E. BROWNELL, D. M. RUSSO, J. S. SILVA, K. H. GRABSTEIN, & P. H. MORRISSEY. 1994 IL-10 mediates susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Immunol.** 153:3135-3140.
- REED, S.G. 1998. Immunology of *Trypanosoma cruzi* infections. **Chem. Immunol.** 70:124-143.
- ROTTENBERG, M. E., BAKHIET, M., OLSON, T., K. RISTENSSON, K., MAK, T., WIGZELL, H., & ORN, A. 1993. Differential susceptibilities mice genomically depleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infect. Immun.** 61:5129-133.

- ROTTENBERG, M. E., RIARTE, A., SPORRONG, L., ALCER, J., PETRAY, P., RUIZ, A. M., WIGZEL, H., & ORN, A. 1995. Outcome of infection with different strains of *Trypanosoma cruzi* in mice lacking CD4 and/or CD8. **Immunol. Lett.** 45:53-60.
- ROTTENBERG, E. M., CASTANOS-VELEZ, E., MESQUITA R., LAGUARDIA, G. OSCAR., BIBERFELD P. & ORN. A. 1996. Intracellular co-localization of *Trypanosoma cruzi* and inducible nitric oxide synthase (iNOS): evidence for dual pathway of iNOS induction. **Eur. J. Immunol.** 26: 3203-3213.
- RUDOLPHI, A., SPIEß, S., CONRADT, P., CLAËSSON, M. H. & REIMANN, J. (a) 1991. CD3⁺ T cells in severe combined immune deficiency (scid) mice. I. Transferred purified CD4⁺ T cells, but not CD8⁺ T cells are engrafted in the spleen of congenic scid mice. **Eur. J. Immunol.** 21:523-533.
- RUDOLPHI, A., SPIESS, S., CONRADT, P., CLAËSSON, M. H. & REIMANN, J.(b) 1991. CD3⁺ T cells in severe combined immunodeficiency (scid) mice II. Transplantation of dm2 lymphoid cells into semi-allogeneic scid mice. **Eur. J. Immunol** 21:1591-1600.
- RUSSO, M., STAROBINAS, N., MINOPRIO, P. COUTINHO, A., & JOSKOWICZ, M. 1988. Parasitic load increases and myocardial inflammation decreases in *Trypanosoma cruzi* infected mice after inactivation of helper T cells. **Ann. Inst. Pauster Immunol.** 139:225-236.
- SANTOS LIMA, E. C., GARCIA, I., VICENTELLI, M. H., VASSALI, P., & MINOPRIO, P. 1997. Evidence for a protective role of tumor necrosis factor in the acute phase of *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **Infect.Immun.** 65:457-465.

- SCHARTON, T. M., & P. SCOTT. 1993. Natural killer cells are a source of interferon- γ that drives differentiation of CD4⁺ T cells subset and induces early resistance to *Leishmania major* in mice. **J. Exp. Med.** 178:567-577.
- SCHMITT, E., P. HOEHN, C. HUELS, S. GOEDERT, N., PALM, E. RUDE & T. GERMANN. 1994. T helper type 1 development of naive CD4⁺ T cells requires the coordinate action of interleukin-12 and interferon- γ and is inhibited by transforming growth factor- β . **Eur. J. Immunol.** 24:793-798.
- SCHMUNIS, G. A., GONZALEZ-CAPPA, S. M. TRAVERSA, O. C. & YANOUSKY, J. F. 1971. The effects of immunodepression due to neonatal thymectomy in infection with *Trypanosoma cruzi* in mice. **Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg.** 65:89-94
- SILVA, J. S., MORRISSEY, P. J., GRABSTEIN, K. H., MOLLER K. M., ANDERSON, D. & REED, S. G. 1992. Interleukin 10 and interferon gamma regulation of experimental *Trypanosoma cruzi* infection. **J. Exp. Med.** 175:169-174.
- SILVA, J. S., VESPA, R. N. G., CARDOSO, G. A. M., ALIBERTI, J. C. S. & CUNHA, Q. F. 1995. Tumor necrosis factor alpha mediates resistance to *Trypanosoma cruzi* infection in mice by inducing nitric oxide production in infected gamma interferon- activated macrophages. **Infect. Immun.** 63:4862-4867.
- SCHENKMAN, S. & EICHINGER, D. 1993. *Trypanosoma cruzi* Trans-sialidase and cell invasion. **Parasitology Today** 9: 218-222
- SCUDDER, P., DOOM, J. P., CHUENKOVA, M., MANGER I. D. & PEREIRA M. E. A. 1993. Enzymatic characterization of β -D-galactoside α 2,3-trans-sialidase from *Trypanosoma cruzi*. **J. Biol. Chem.** 268:9886-9891.

- SPRENT, J., SCHAEFER, M., HURD, M., SURCH, C. D. & RON, Y. 1991. Mature murine B and T cells transferred to SCID mice can survive indefinitely and many maintain a virgin phenotype. **J. Exp. Med.** 174: 717-728.
- TARLETON, R. L. 1990. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility and reverses vaccine-induced immunity in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.** 144:717-724.
- TARLETON, R., KOLLER, B. H., LATOUR, A. & POSTAN, M. 1992. Susceptibility of $\beta 2$ microglobulin deficient mice to *Trypanosoma cruzi* infection. **Nature.** 356:338-340.
- TARLETON, R. L., GRUSBY, M. J., POSTAN, M. GLIMCHER, L. H. 1996. *Trypanosoma cruzi* infection in MHC-deficient mice: Further evidence for the role of both class I and class II-restricted T cells immune resistance and disease. **Intern.Immunol.** 8:13-22.
- TAKEHARA, H. A., DA SILVA, A. M. M., BRODSKYN, C. I. & MOTA, I. A. 1989. A comparative study of anti- *Trypanosoma cruzi* serum obtained in acute and chronic phase of infection mice. **Immunol. Lett.** 23: 81-86.
- TAYLOR-ROBINSON, A. W., F. Y. LIEW, A SEVERN, D. XU, S. MCSORLEY, P. GARSIDE, J. PADRON, & R. S. PHILIPS. 1994. Regulation of the immune response by nitric oxide differentially produced by T-helper type 2 cells. **Eur. J. Immunol.** 24:980-984.

- TORRICO, F., H. HEREMANS, M. T. RIVERA, E. VAN MARCK, A. BILLIAU, & Y. CARLIER. 1991. Endogenous IFN- γ is required for resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Immunol.** 146:3626-3632.
- TRINCHIERI, G. 1997. Cytokines activity on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN- γ). **Cur.Opin.Immunol.** 9:17-23.
- TRISCHMANN, T.M. 1983. Non-antibody-mediated control of parasitemia in acute experimental Chagas' disease. **J.Immunol.** 130:1953-1957.
- ZHANG, L. & TARLETON, R. L. 1996. Characterization of cytokine production in murine *Trypanosoma cruzi* infection by in situ immunocytochemistry: Lack of association between susceptibility and type 2 cytokine production. **Eur. J. Immunol.** 26:102-109.
- VARKILA, R. CHATELAIN, R., LEAL, L. M. C. C. & COFFMAN, R. L. 1993. Reconstitution of C.B-17 scid mice with BALB/c T cells initiates a T helper-type-1 response and renders them capable of healing *Leishmania major* infection. **Eur. J. Immunol.** 23:262-268.
- VANDEKERCKHOVE, F., DARJI, A. RIVERA, M. CARLIER, Y., VRAY, B., BILLIAU, A. De BAETSELIER, P. 1994. Modulation of T-Cell responsiveness during *Trypanosoma cruzi* infection: Analysis in different lymphoid compartments. **Parasite Immunol.** 16:77-85.
- VESPA, G. N.R., CUNHA, F.Q., & SILVA, J.S. 1994. Nitric oxide is involved in control of *Trypanosoma cruzi*-induced parasitemia and directly kills the parasite in vitro. **Infect. Immun.** 62:5177-5182.

WIZEL, B., NUNES, M. & TARLETON, R. L. 1997. Identification of *Trypanosoma cruzi* trans-sialidase family members as targets of protective CD8⁺ TC1 responses. **J. Immunol.** 6120-6130.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. 1991. Control of Chagas' disease. **W.H.O.** 187:1.