

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 10/03/97, considerou o candidato aprovado.

1º - Examinador: _____

2º - Examinador: _____

3º - Examinador: _____

HERCILIO HIGINO DA SILVA FILHO

MON
616.334.3
S5V5C
TEC/MEH

Imunorregulação da resposta imune humoral e
celular, durante a infecção experimental de
camundongos BALB/c com as cepas Y, PF e
SC38 de *Trypanosoma cruzi*.

DIRBI/UFU



1000179159

Dissertação apresentada ao Departamento
de Patologia da Universidade Federal de
Uberlândia, para obtenção do grau de
Mestre em Imunologia e Parasitologia
Aplicadas.

Orientador: Dr. José Roberto Mineo

UBERLÂNDIA

MINAS GERAIS - BRASIL

1997

Trabalho desenvolvido no Laboratório de Imunologia do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Uberlândia, com auxílio financeiro do CNPq, e afastamento total das funções de técnico-administrativo da Universidade Federal de Santa Catarina.

Com muito amor dedico este
trabalho a minha querida esposa
Rosana e ao querido filho Davi.

A todos meus familiares, em especial a meu pai, minha mãe, irmãos e sogra, pelo apoio constante.

Ao meu avô e minha avó pelo carinho que sempre me deram.

“A ciência é uma única e o que hoje representa uma conquista abstrata, sem qualquer fundo utilitário, será amanhã uma noção aplicada e, às vezes do mais alto alcance prático”.

Carlos Chagas.

AGRADECIMENTOS

Ao Dr. José Roberto Mineo, orientador deste trabalho, por sua orientação segura, seu intelecto e sua amizade.

À Dr^a. Sônia Gonçalves, co-orientadora desse trabalho, por seu apoio técnico científico, pôr ter cedido camundongos BALB/c do biotério da Divisão Imunologia da UFSC, oriundos do Instituto Butantan, e por sua amizade.

Ao Dr. Mário Steindel, por sua cooperação e companheirismo.

Ao Dr. João Santana da Silva, pelo uso de seu laboratório, sugestões e ensinamentos científicos.

À Dr^a. Maria Fernanda de Macedo Soares do Instituto Butantan, por ter cedido os anticorpos monoclonais anti-IgE de camundongo.

À Dr^a. Julia Maria Costa Cruz, por seu auxílio, enquanto coordenadora do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

À Mestre Maria Aparecida de Sousa por ter auxiliado nos ensaios de dosagem de citocinas e por sua amizade.

A veterinária Deise Aparecida Oliveira Silva, por seu auxílio constante no Laboratório de Imunologia da UFU e por sua amizade.

Ao veterinário Guilherme Rosemberg Guimarães Queirós, por ter cedido camundongos BALB/c do biotério do laboratório de Imunologia da UFU e por sua amizade.

À pós-graduanda Janeusa Trindade de Souto, da USP de Ribeirão Preto, por ter auxiliado nos ensaios de dosagem do óxido nítrico.

À Universidade Federal de Santa Catarina, pela autorização de afastamento de minhas funções, bem como à Chefia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia e à Direção do Centro de Ciências Biológicas.

Aos professores da Divisão de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, por ter permitido meu afastamento.

Ao CNPq, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

A todos os professores do Curso de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Ao João Martins Neto, por sua amizade e apoio constante.

A todos os amigos do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia; especialmente ao Prof. Sílvio Favoretto, à bióloga Elizabeth de Oliveira Miranda; ao Antônio Tomaz Júnior (Junião) e ao Hélio Elias Júnior (Juninho).

A todos os amigos do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

I - INTRODUÇÃO	1
II - OBJETIVOS	18
III - MATERIAL E MÉTODOS	20
III.1 - ANIMAIS	21
III.2 - MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE <i>T. cruzi</i>	21
III.2.1 - Cepa PF (avirulenta)	21
III.2.2 - Cepa Y (alta virulência)	21
III.2.3 - Cepa SC38 (média virulência)	22
III.3 - INOCULAÇÕES	22
III.3.1 - Inoculações de animais com cepas de <i>T. cruzi</i> e hemácias de carneiro	22
III.3.2 - Inoculações de animais com as cepas de <i>T. cruzi</i> para dosagem de IgE, IgG1 e IgG2a e parasitemia	23
III.3.3 - Inoculações de animais com as cepas de <i>T. cruzi</i> para os ensaios biológicos	24
III.4 - ANTÍGENOS	24
III.4.1 - Hemácias de carneiro	24
III.4.2 - Cepa PF	25
III.4.3 - Cepa Y e SC38	25
III.4.4 - Biotinilação de antígenos	25
III.5 - MEIOS DE CULTURA	26
III.5.1 - Meio LIT ("Liver Infusion - Tryptose")	26
III.5.2 - Meio RPMI-1640	27
III.6 - ENSAIOS BIOLÓGICOS	27
III.6.1 - Cultivo de esplenócitos	27
III.6.2 - Estímulos antigênicos e sobrenadantes de cultura	28
III.7 - DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE ANTICORPOS	28

III.7.1 - Hemaglutinação direta	28
III.7.2 - Dosagens de anticorpos gamaglobulina total anti- <i>T. cruzi</i>	29
III.7.3 - Dosagens de anticorpos IgG1 e IgG2a anti- <i>T. cruzi</i> pelo método de ELISA	30
III.7.4 - Dosagem de IgE anti- <i>T. cruzi</i> por ELISA	31
III.8 - DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE CITOCINAS	32
III.8.1 - Dosagem de IL-4 murina por ELISA	32
III.8.2 - Dosagem de IFN- γ murino por ELISA	33
III.8.3 - Dosagem de IL-10 murina por ELISA	34
III.8.4 - Dosagem de IL-12 murina por ELISA	35
III.9 - DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO	35
III.10 - PARASITEMIA	36
III.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
IV - RESULTADOS	38
IV.1 - RESULTADO DA INDUÇÃO DA IMUNODEPRESSÃO DE ANTICORPOS ANTI-ANTÍGENOS HETERÓLOGOS POR CEPAS DE <i>T. cruzi</i>	39
IV.1.1 - Produção de anticorpos anti-He em camundongos BALB/c infectados e não infectados com as cepas <i>T. cruzi</i>	39
IV.1.2 - Determinação dos níveis de anticorpos gamaglobulina total anti- <i>T. cruzi</i>	41
IV.1.3 - Avaliação da produção de anticorpos anti- <i>T. cruzi</i> gamaglobulina total em camundongos BALB/c infectados com cepas de <i>T. cruzi</i> e/ou inoculados com He	43
IV.2 - RESULTADO DAS DOSAGENS DE ANTICORPOS IgE, IgG1 E IgG2a EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE <i>T. cruzi</i>	46

IV.3 - DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE ESPLÊNOCITOS, ORIUNDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE <i>T. cruzi</i>	51
IV.3.1 - Resultado da dosagem de IL-4	51
IV.3.2 - Resultado da dosagem de IL-10	54
IV.3.3 - Resultado da dosagem de IFN- γ	57
IV.3.4 - Resultado da dosagem de IL-12	60
IV.4 - RESULTADO DA DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE ESPLÊNOCITOS, ORIUNDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE <i>T. cruzi</i>	61
IV.5 - PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE <i>T. cruzi</i>	64
IV.6 - SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS BALB/c DURANTE OS EXPERIMENTOS	66
V - DISCUSSÃO	68
VI - CONCLUSÕES	77
VII - RESUMO	79
VIII - ABSTRACT	82
IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85

ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

ABREVIATURAS E FÓRMULAS QUÍMICAS

APC: Células apresentadoras de antígenos.

Ag: Antígeno.

BSA: Albumina de soro bovino.

Con-A: Concanavalina A.

ELISA: Ensaio imunoenzimático (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay).

He: Hemácias de carneiro.

IL: Interleucina.

GM-CFS: Fator estimulador de colônia de granulócitos e macrófagos.

LTc: Linfócito T citotóxico.

LTCD4⁺: Linfócito T auxiliar.

LTCD8⁺: Linfócito T citotóxico

LT: Linfócito T.

LTh: Linfócito T auxiliar

LTH: Linfócito T de hipersensibilidade tardia.

LIT: Meio de "Liver Infusion Triptose".

KDa: Kilo Dalton.

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio.

H₂SO₄: Ácido sulfúrico.

IFN-γ: Interferon gama.

M: Molar.

M1%: Leite mólico a 1%.

M5%: Leite mólico a 5%.

μg: Micrograma.

mg: Miligrama.

μl: Microlitro.

ml: Mililitro.

μm: Micrômetro.

μM: Micromolar.

ng: Nanograma.

NK: Células exterminadoras naturais.

NO: Óxido nítrico.

NOS: Óxido nítrico sintase.

OPD: Orto-fenil-diamina (“Ortophenylene Diamine”).

PBS: Salina tamponada com fosfato (“Phosphate buffered saline”).

SFB: Soro Fetal Bovino.

SRBC: Células vermelhas do sangue de carneiro (“Sheep Red Blood Cells”).

TNF-α: Fator de necrose tumoral alfa.

T20: Tween 20.

U: Unidade.

I - INTRODUÇÃO

INTRODUÇÃO

A doença de Chagas foi descoberta por Carlos Chagas em 1909, na cidade de Lassance, estado de Minas Gerais. Carlos Chagas estudou a morfologia e a biologia, tanto no hospedeiro vertebrado quanto no hospedeiro invertebrado (vetor), bem como aspectos da patogenia e da sintomatologia da doença (CHAGAS, 1909).

A doença de Chagas é exclusiva do continente americano, por isso é também conhecida pelo nome triponosomíase americana. É encontrada desde o sul dos Estados Unidos até o sul da Argentina e Chile, constituindo uma ameaça permanente para quase toda a população da América Latina e existindo com grande diversidade nas taxas de prevalência, formas de transmissão, características parasitárias, patologia clínica e reservatórios de vetores. Estima-se que a doença represente um problema de saúde pública em 18 países latino-americanos, sendo que 90 milhões de pessoas vivem em áreas onde o parasita está presente e, dentre estas, 18 milhões estão infectadas (WHO, 1991). No Brasil, aproximadamente, 5 milhões estão infectadas e 25 milhões vivem em áreas de risco (DIAS, 1987).

Trypanosoma cruzi é o protozoário causador da doença de Chagas, pertencendo ao Sub-filo Mastigophora, Ordem Kinetoplastina, seção Stercoraria. Esse parasita constitui o grupo de tripanossomas que possui diversas formas evolutivas que se diferenciam dentro do trato digestivo de insetos vetores, contaminando hospedeiros vertebrados através da deposição das fezes sobre a mucosa ou pele lesionada. A Ordem Kinetoplastina tem como características: um ou dois flagelos, livres ou aderentes ao corpo celular e possui uma só mitocôndria longa, que percorre todo o corpo celular a qual contém DNA em um segmento que se diferencia em uma organela típica, denominada cinetoplasto, sempre situada junto à base dos flagelos (MEHLHORN, 1988).

T. cruzi multiplica-se ativamente no interior de células de hospedeiros vertebrados. Vários estudos foram realizados em modelos de infecção natural ou experimental; os mamíferos, preferencialmente, são os mais estudados e entre eles estão: camundongos, ratos, coelhos, hamsters, cobaias, cães, tatus, gambás, macacos e

humanos. Anfíbios e aves são provavelmente refratários, embora já tenham sido encontrados, nos Estados Unidos, lagartos infectados com *T. cruzi* (BRENER, 1973).

Possue 3 formas distintas: amastigotas, epimastigotas e tripomastigotas. As formas amastigotas assumem formatos ovóides ou esferóides, são aflagelares medindo 2-4 μm de diâmetro, com núcleo arredondado e cinetoplasto menor, basiliforme e próximo ao núcleo. As epimastigotas possuem formas e dimensões variáveis; são flageladas com citoplasma abundante, o cinetoplasto é anterior, próximo ao núcleo, a membrana ondulante é curta com flagelo bem desenvolvido. As tripomastigotas podem assumir formas delgadas ou largas. As formas delgadas medem 20 μm de comprimento e 1 μm de largura, o cinetoplasto é afastado da extremidade posterior, que é longa e delgada, destacando-se a saliência do cinetoplasto; a membrana é ondulante e o flagelo é livre e curto. Essas formas delgadas são menos resistentes a anticorpos e lise pelo complemento, menos infectantes para os triatomíneos e penetram ativamente em células. As formas largas medem 15 μm de comprimento e 2-5 μm de largura, o cinetoplasto fica muito próximo da extremidade posterior do parasita, o núcleo elipsóide ou redondo, a membrana ondulante é bem visível, o flagelo longo e a movimentação é lenta. Essa forma parasitária é mais resistente à aglutinação e à lise pelo complemento e menos fagocitada pelos macrófagos, sendo mais infectante para o vetor (REY, 1991).

O *T. cruzi* possui um ciclo do tipo heteroxênico, necessitando de mais de um hospedeiro para completá-lo. Através da urina ou fezes contaminadas dos triatomíneos (hospedeiros invertebrados), que podem ser depositadas em mucosas ou pele lesionada durante o hematofagismo, formas tripomastigotas metacíclicas, oriundas das dejeções dos triatomíneos, caem na circulação sangüínea atingindo vários tecidos e invadindo vários tipos celulares, preferencialmente células do sistema fagocítico mononuclear (DIAS, 1979). No interior das células, multiplicam-se sob a forma de amastigotas, por divisão binária, passando posteriormente a formas tripomastigotas. Essas últimas são liberadas no sangue periférico, quando do rompimento da célula parasitada, podendo infectar outras células ou serem ingeridas pelo vetor. No vetor, as formas tripomastigotas passam a amastigotas e epimastigotas, sendo que estas últimas

multiplicam-se ativamente no intestino médio do hospedeiro invertebrado, passando ao intestino posterior e evoluem em formas tripomastigotas metacíclicas infectantes, fechando o ciclo (BRENER, 1979; KIRCHHOFF, 1989; LANA & TAFURI, 1991).

Os hospedeiros invertebrados são insetos hematófagos pertencentes a Família Reduviidae, Subfamília Triatominae e dos Gêneros *Panstrongylus sp.*, *Triatoma sp.* e *Rhodnius sp.* As principais características são relacionadas com o rostro, que é curto e reto, não ultrapassando as coxas anteriores e, que quando em repouso, forma um ângulo fechado com a cabeça (MORAES, 1984).

Em infecção experimental em gambás (*Didelphis marsupialis*), foi verificado um ciclo semelhante ao que ocorre no hospedeiro invertebrado. Nas criptas das glândulas anais do gambá, o parasita multiplica-se sob a forma epimastigota diferenciando-se em tripomastigotas metacíclicos infectantes (DEANE, 1984). Posteriormente, esse ciclo foi também observado em gambás, naturalmente infectados, no município de Bambuí, estado de Minas Gerais (FERNANDES, 1989).

Além da transmissão natural, outras formas de transmissão já foram observadas. A transfusão sangüínea é considerada a segunda de interesse epidemiológico por ser mais comumente encontrada em zonas urbanas, onde 70% da população do continente se localiza (DIAS, 1979; BRENER, 1984). A transmissão congênita também foi observada através de gestantes contaminadas com *T. cruzi* e que possuíam ninhos de amastigotas localizados na placenta (ARAÚJO, 1981). Outra forma de transmissão pode ocorrer através de acidentes em laboratório, pela manipulação de materiais biológicos contaminados, como: sangue de animais ou meio de cultura contendo o parasita (BRENER, 1984). De acordo com CHOCAIR (1981), os transplantes de órgãos também constituem um veículo de transmissão do parasita. A ingestão de carne crua de animais contaminados, alimentos contaminados com as fezes dos triatomíneos, amamentação por mães infectadas e canibalismo entre animais infectados, também têm sido relatados como formas de transmissão do *T. cruzi* (BRENER, 1979; NERY-GUIMARÃES, 1968; BITTENCOURT, 1988; MARCONDES, 1991). Além das formas de contágio descritas, caçadores podem ser infectados lidando com a caça, através de ferimentos nas mãos (LANA & TAFURI, 1991).

Alguns fatores podem influenciar a infecção no hospedeiro. Dentre eles: (1) a ampla variedade das cepas de *T. cruzi*, as quais possuem diferentes graus de virulência e em alguns casos com tropismo para determinados tecidos e órgãos; (2) a constituição genética do hospedeiro, sendo que algumas linhagens de animais são mais susceptíveis à infecção que outras; (3) idade, sendo os animais mais jovens menos resistentes que os adultos; sexo, onde BRENER (1961) mostrou que as fêmeas são mais resistentes à infecção pelo *T. cruzi* do que os machos; (5) temperaturas ambientais de 35-37°C diminuem o número de parasitas circulantes e temperaturas de 10-18°C ocorrem altas parasitemias; (6) deficiência nutricional de tiamina, piridoxina, vitamina A e lisina resulta em altas parasitemias; e (7) agentes imunossupressivos, tais como: corticóides, ciclofosfamida, raios gama (BRENER, 1973) e AIDS (ROCHA, 1994), que agravam a infecção pelo *T. cruzi*. Por outro lado, a administração de ciclofosfamida em doses baixas (50 mg por m² de superfície corporal) em cães, durante a fase crônica da infecção pelo *T. cruzi*, demonstrou ser capaz de controlar a miocardite pela diminuição do infiltrado inflamatório (ANDRADE, 1987).

Além da infecção natural e experimental em animais, o *T. cruzi* pode ser cultivado em meios acelulares e em meios celulares. Em meios acelulares, o *T. cruzi* pode ser facilmente cultivado, tanto em meios bifásicos como em monofásicos. Os meios monofásicos são os mais utilizados por serem de fácil manejo e de ótimo rendimento na obtenção de massa parasitária e, entre eles, estão o LIT ("Liver Infusion-Tryptose") e o N.N.N. (Neal, Novy e Nicolle), em temperatura de cultivo variando de 26-28°C. A inconveniência de se trabalhar com meios acelulares é que, com o passar do tempo, a cepa de *T. cruzi* perde suas características originais de virulência, tendendo a diminuir o número de tripomastigotas e a predominar formas epimastigotas semelhantes àsquelas encontradas no intestino do vetor (LAMBRECHT *et al*, 1966; CHIARI, 1974). BRENER (1973) também cita que o cultivo de *T. cruzi* em meios artificiais seleciona variantes "in vitro"; a passagem seguida em meio LIT pode atenuar a virulência de uma cepa, essa atenuação é também causada pelas condições nutricionais do meio, temperatura de cultivo e pH. Diversos tipos celulares podem ser usados no cultivo do *T. cruzi*, sendo as monocamadas de células Vero as de

melhor resultado e, no interior dessas células, podem ser observados formas amastigotas e nos sobrenadantes de cultura formas tripomastigotas livres, em temperatura de cultivo variando de 33-37 °C. Nesse caso, a dificuldade de se trabalhar com cultivo de células está no fato de o manejo requerer cuidados especiais, como assepsia e equipamentos como a estufa de CO₂ (DVORAK *et al*, 1976; BERTELLI *et al*, 1977).

A temperatura seleciona as formas do parasita. Tripomastigotas e amastigotas são mais resistentes à variação de temperaturas, sobrevivendo entre 37-38 °C, enquanto que as formas epimastigotas são mais sensíveis a temperaturas elevadas sobrevivendo em temperaturas de 28 °C (NEVA *et al*, 1961). CONTRERAS (1985) também ressalta a importância da constituição química do meio de LIT, dizendo que o meio pode selecionar formas do parasita; isso ocorre quando o LIT é suplementado com urina de triatomíneos e prolina, sendo, nesse caso, selecionados formas tripomastigotas metacíclicas a partir de formas epimastigotas.

Várias populações de *T. cruzi* existem na natureza, e isto tem sido demonstrado em nível biológico, farmacológico, bioquímico e imunológico. A essa heterogeneidade denominou-se variações intra-específicas e cepas como CL e Y representam bem essas variações, as quais são denominadas cepas polares (BRENER, 1977; ANDRADE, 1985). Quando isoladas, as cepas apresentam diferentes características que permitem sua individualização, como o curso da infecção no hospedeiro vertebrado, análise de componentes moleculares e de produtos metabólitos de parasitas (BRENER, 1977). Estudos posteriores, com cepas de *T. cruzi* clonadas e não clonadas, tanto “in vitro” como “in vivo”, reforçam a idéia da heterogeneidade entre essas cepas do parasita, as quais são compostas de uma variedade de subpopulações com características distintas (POSTMAN, 1983; ARAÚJO & CHIARI, 1988).

ANDRADE (1985) utilizando camundongos como modelo experimental, propôs uma classificação das cepas de *T. cruzi* com base nas características de virulência, tropismo tecidual e morfologia dos tripomastigotas sanguíneos. Essa classificação baseia-se nos biodemas. O biodema I seria representado pelas cepas Y e Peruana (alta virulência e alta mortalidade, tropismo por macrófagos e presença de formas delgadas);

o biodema II pela cepa São Felipe (baixa virulência e baixa mortalidade com tropismo pelo miocárdio e presença de formas largas); e biodema III pela cepa Colombiana (baixa virulência e baixa mortalidade com tropismo pela musculatura esquelética e presença de formas largas).

Outra forma de classificação de cepas de *T. cruzi* é feita através do estudo em gel de eletroforese de isoenzimas de diferentes isolados do parasita. Os grupos de perfis isoenzimáticos idênticos foram denominados zimodemas e divididos em grupos designados: Z1, Z2 e Z3. Os zimodemas Z1 e Z3 são encontrados em cepas de vetores e em reservatórios silvestres, sendo o Z2 encontrado em cepas de chagásicos crônicos e em animais domésticos. Recentemente, o zimodema Z1 tem sido encontrado também em pacientes chagásicos agudos (ANDRADE, 1985; MILES, 1980; WHO, 1991).

A genética molecular tem auxiliado na taxonomia do *T. cruzi*, através da análise do perfil eletroforético do DNA do cinetoplasto (kDNA) em gel de agarose após terem sido digeridos por enzimas de restrição. O kDNA digerido das cepas análogas mostra padrões similares de restrição, permitindo agrupá-las no que se denomina esquizodemas (MOREL & SIMPSON, 1980).

Estudos de diferentes isolados silvestres de *T. cruzi*, no estado de Santa Catarina, mostram a existência de 58 cepas com características moleculares e biológicas diferentes. Essas cepas apresentam curvas parasitêmicas e índices de mortalidade variados no curso da infecção em camundongos não isogênicos (STEINDEL, 1993).

O *T. cruzi* possui uma complexa superfície celular, sendo a maioria dos componentes glicoproteínas (gp) e glicolípideos. As funções dessas estruturas são de ligação e invasão da célula hospedeira, resistência a ambientes hostis no intestino do inseto e em células de mamíferos. Muitas dessas moléculas são expressas nos diferentes estágios do ciclo de vida do parasita e nas fases aguda e/ou crônica da infecção nos hospedeiros vertebrados (TAKLE & SNARY, 1993; LEGUIZAMON *et al*, 1990). A gp160 é uma glicoproteína encontrada no flagelo do *T. cruzi* e teria como principal característica a indução de reações cruzadas, promovendo autoimunidade (ENGMAM *et al*, 1989). A gp90 é a glicoproteína mais encontrada no soro de pacientes chagásicos e está presente em todos os estágios de vida do parasita, esse

componente não possui determinantes antigênicos que pudessem dar reações cruzadas, por isso é considerado um possível candidato na construção de uma vacina. Embora em experimentos com animais tenha sido observado que a proteção é parcial, quando utilizada como imunógeno, e ainda a gp90 possui como característica imunológica, a atividade anti-fagocitária (TAKLE & SNARY, 1993). A gp85 é encontrada em formas tripomastigotas sanguíneas, é um receptor para fibronectina e está relacionada com o processo de invasão celular (KATZIN *et al*, 1983; OUAISSI *et al*, 1986). A gp72 é encontrada em tripomastigotas metacíclicos. Estudos da utilização dessas glicoproteínas como vacina têm demonstrado que ela não daria proteção contra tripomastigotas sanguíneos (TAKLE & SNARY, 1993). A gp58-68 é uma molécula ligante de colágeno, relacionada com a ligação e a penetração das células do hospedeiro, a qual teria a função de proteção contra danos pela ativação da via alternativa do complemento (FERGUSON *et al*, 1985). A gp57-51 é uma glicoproteína isolada de formas epimastigotas da cepa Y e tem a propriedade de induzir potente resposta imune do tipo celular e humoral (ARNHOLDT *et al*, 1993). A gp31 e a gp37 estariam presentes na superfície de epimastigota e a função delas ainda não foi esclarecida (SCHARFSTEIN *et al*, 1983). A gp 25 é encontrada em todos os estágios de vida do parasita e em 97% das amostras de soro de pacientes chagásicos e, por esse motivo, pode ser utilizada na confecção de "kits" para diagnóstico da doença de Chagas (SCHARFSTEIN *et al*, 1985). O LPPG é um lipopeptídeofosfoglicano encontrado em formas epimastigotas, de função não bem esclarecida. Porém, uma função já observada seria a proteção à digestão enzimática no intestino do vetor (DEARBORN *et al*, 1976; PREVIATO, 1990). A GPI, um glicosilfosfatidilinositol, é encontrada em diversos estágios do parasita e teria função de ancorar as moléculas de superfície do *T. cruzi* (PREVIATO *et al*, 1996).

Em infecção experimental pelo *T. cruzi*, os animais apresentam duas fases distintas, denominadas fase aguda e fase crônica. A fase aguda é de tempo variável podendo ir até 60 dias após o inóculo. Durante esse período, o *T. cruzi* é encontrado em abundância tanto nos tecidos como na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, enquanto que na fase crônica, os parasitas são escassos e pouco detectados no sangue (BRENER, 1973). O *T. cruzi*, na fase crônica, persiste durante toda a vida

do hospedeiro e os casos de reagudização geralmente ocorrem quando o hospedeiro sofre algum processo imunossupressor (BRENER, 1979).

Na espécie humana, a fase aguda é de curta duração. Geralmente, nas primeiras semanas após a infecção, o parasita pode ser detectado no sangue através da observação pela microscopia óptica (BRENER, 1961), sendo as manifestações clínicas sintomáticas ou assintomáticas. As formas assintomáticas passam despercebidas com raras manifestações de processos infecciosos, passando para fase crônica; as formas sintomáticas ocorrem em indivíduos mais jovens e em, 50% dos casos, com manifestações locais 4 a 10 dias após a picada do vetor. O indivíduo pode apresentar o sinal Romaña (penetração do *T. cruzi* pela conjuntiva e tem como característica edema bipalpebral unilateral) ou chagoma de inoculação (edema na pele semelhante a um furúnculo sem supuração), as manifestações clínicas gerais são: febre, edema local e generalizado, poliadenia, hepatomegalia, esplenomegalia, insuficiência cardíaca, perturbações neurológicas e, em casos extremos, óbito (TAFURI, 1987).

Após a fase aguda, segue-se uma fase crônica indeterminada, de duração longa e de curso assintomático. Em um número variável de indivíduos, a fase crônica indeterminada pode passar a apresentar lesões (TEIXEIRA *et al*, 1978). A fase crônica ativa ocorre após vários anos. Durante esse período, os órgãos sofrem mudanças anatômicas e fisiológicas com intensa reação inflamatória, promovendo destruição progressiva que leva à debilidade do indivíduo. Estas são as chamadas megassíndromes, havendo aumento do tamanho de determinados órgãos, como esôfago, cólon, bexiga, duodeno e coração (ROOSI & MENGEL, 1992).

Tanto na fase aguda como na fase crônica, encontra-se, principalmente no miocárdio, um infiltrado de células mononucleares, que caracteriza um envolvimento de mecanismos imunológicos na doença de Chagas humana e experimental (SANTOS & HUDSON, 1980). A destruição de células do miocárdio inicia-se com a ruptura de pseudocistos de formas amastigotas. Antígenos do parasita podem ligar-se a células normais do miocárdio, modificando antigenicamente estas células e promovendo respostas auto-imunes. Em pacientes chagásicos crônicos, verificou-se que anticorpos ligavam-se à estrutura vascular e ao interstício de músculos estriados (anticorpos EVI). Além dos anticorpos EVI, foram demonstrados também anticorpos anti-neurônios;

esses anticorpos seriam originados de um processo de reação cruzada entre a GP160 do *T. cruzi* e os antígenos do plexo neural periférico, o SNC e o sistema de condução do músculo cardíaco, gerando auto-imunidade (COSSIO *et al*, 1974; VAN VOORHIS *et al*, 1992).

A miocardite chagásica crônica é caracterizada por um infiltrado de células mononucleares com destruição de fibras miocárdicas no foco inflamatório, com a presença ou não de parasitas na lesão. A destruição das fibras seria causada por um processo de reação cruzada da miosina cardíaca com uma proteína homóloga do *T. cruzi* denominada B13 (GONÇALVES DA COSTA *et al*, 1984; CUNHA NETO *et al*, 1995). ROSSI (1990) sugere que, para que ocorra a resposta inflamatória, se faz necessária a presença do parasita no local da lesão e que ele teria papel importante no processo de injúria da microcirculação.

A produção de anticorpos anti-*T. cruzi* tem sido freqüentemente observada em humanos e animais em infecções natural e experimental. O *T. cruzi* induz, em camundongos BALB/c, uma expressiva produção de gamaglobulinas com elevados níveis de IgM, IgG2a e IgE. A hipergamaglobulinemia tem início na fase aguda com anticorpos da classe IgM, persistindo na fase crônica até 12 semanas após a infecção, quando o nível das imunoglobulinas retorna a seus valores normais, excetuando a IgE. Os níveis de IgM sobem nas primeiras 2 semanas e os da IgG, IgA e IgE sobem gradualmente entre 3 a 6 semanas após o inóculo inicial (BOUHDIDI, 1994). A IgE anti-*T. cruzi* tem importância na doença de Chagas em humanos porque seu nível está significativamente aumentado, comparado com a IgE total, nos pacientes com a forma cardíaca (MINEO *et al*, 1996). Há controvérsias a respeito do papel desses anticorpos no controle da infecção, e o fato é que alguns autores concluem que anticorpos específicos são capazes de induzir proteção, enquanto que outros autores discordam por não terem conseguido reproduzir esses resultados (TEIXEIRA *et al*, 1975).

O efeito protetor de soros imunes estudados, contra diferentes cepas de *T. cruzi*, mostrou que a proteção é particularidade da cepa. Em estudo de soros imunes de camundongos infectados com cepas CL e Y, foi demonstrado que os animais infectados com a Y apresentavam proteção a ambos os soros, mas isso não ocorria com

os infectados com a CL. Esse estudo permitiu concluir que o soro protetor só é eficaz para algumas cepas (KRETTLI & BRENER, 1976).

A imunidade produzida por anticorpos IgM anti-*T. cruzi* no início da infecção é menos eficaz. Isotipos IgG2a, IgG2b e IgG1 produzidos mais tardiamente são mais efetivos. Durante a fase crônica, 70% dos anticorpos são do tipo IgG2a e 10% do tipo IgG1, que teriam alta avidéz. Com isso se conclui que a infecção pelo *T. cruzi* induz resposta imune humoral poli-isotípica e que a avidéz e a concentração de anticorpos têm importância crucial para determinar o curso da infecção (TAKEHARA, 1981; BOUHDIDI, 1994). A proteção por anticorpos na doença de Chagas pode ser promovida pela utilização de antígenos citosólicos de formas epimastigotas e exo-antígenos de tripomastigotas. Essas frações antigênicas induzem alta produção de IgG1, conferindo uma boa proteção à infecção pelo *T. cruzi* (CERBAN *et al*, 1991; CERBAN *et al*, 1992; GEA, 1992).

Os linfócitos Th₁ e Th₂ foram inicialmente descritos em camundongos como sub-populações dos LTCD4⁺, que têm por característica, quando estimulados, a produção de determinadas citocinas. O Th₁ produziria principalmente IFN- γ , IL-2, e linfotoxinas, enquanto o Th₂ produziria IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10. A produção dessas citocinas está intimamente ligada a sinais e estímulos entre células desencadeando respostas fisiológicas e imunológicas (MORIMOTO *et al*, 1985; MOSMANN & SAD, 1996).

Em estudos de SAD & MOSMANN (1994) ficou demonstrado que a diferenciação de clones LTh₀ requer, inicialmente, IL-2 com bipotencial de desenvolver Th₁ ou Th₂. Além da IL-2, citocinas co-estimulatórias liberadas por APC (células apresentadoras de antígenos) participam também do processo de diferenciação desses linfócitos. Assim, a presença de IL-4 e IL-10 induz o desenvolvimento de Th₂ e INF- γ e IL-12 induz o desenvolvimento de Th₁. Após a diferenciação, as subpopulações de linfócitos Th se auto-regulam através da produção de citocinas, que, dependendo do tipo celular alvo, vão ser estimulados ou inibidos. Dessa maneira, o INF- γ inibe o linfócito Th₂ e estimula o Th₁ e a IL-10 e IL-4 inibe o linfócito Th₁ e estimula o Th₂. Com o predomínio de um dos clones de linfócitos, haverá predomínio

de citocinas que vão atuar sobre diversos tipos celulares, desencadeando diversas respostas (POWRIE & COFFMAN, 1993; TRINCHIERI, 1993).

A IL-4 produzida por Th₂ está relacionada com inibição da produção de citocinas pró-inflamatórias e quimocinas por monócitos, e a IL-4 juntamente com a IL-5 são requeridas na indução da produção da IgE e IgG1 (CALLARD, 1996; PURKERSON & ISAKSON, 1992).

A IL-10 produzida por Th₂ age sinergicamente com a IL-4 inibindo macrófagos, LTH (linfócitos T de hipersensibilidade tardia) e de reativos intermediários do nitrogênio e oxigênio produzidos por macrófagos e monócitos (POWRIE & COFFMAN, 1993). Outros estudos demonstram a ação inibitória da IL-10 sobre resposta imune humoral, em que essa citocina, em níveis elevados, inibe a produção de anticorpos IgM, IgG1, IgG2a e IgG3 por LB (linfócitos B) co-estimulados com LPS (PEÇANHA *et al*, 1993).

O IFN- γ produzido por Th₁ é o mais potente ativador de macrófagos e juntamente com o TNF- α é capaz de ativar NOS (óxido nítrico sintetase), levando ao aumento da produção de NO (óxido nítrico). O NO é identificado como o principal sistema anti-microbiano em macrófagos ativados, obtido através da degradação da L-arginina em L-citrulina pela NOS. Uma vez ativado, o macrófago pode sintetizar e liberar grandes quantidades de NO por longos períodos. A produção de óxido nítrico pode ser inibida por análogos da L-arginina, ligantes de flavoproteínas e substâncias como corticosteróides, IL-4, IL-10 e TGF- β (CARDOSO *et al*, 1995).

A IL-12 é um heterodímero de cadeias p35 e p40, originalmente descrita como um fator produzido por células NK (natural killer) e LTc (linfócitos T citotóxicos). Atua no processo de seleção do Th₁ a partir de Th₀, bloqueando o desenvolvimento de Th₂. Essa citocina estimula a proliferação de Th₁ e inibe a expressão e a produção de citocinas de Th₂, principalmente IL-3 e IL-4, excetuando IL-10. Atua como estimuladora da produção de IFN- γ e IL-10, a qual inibe a produção de IL-12 (MCKIGHT *et al*, 1994; LAMONT & ADORINI, 1996). Essa citocina também regula a expressão de anticorpos isotípicos IgG1, IgG2a, IgG3 e bloqueia a secreção de IgE. Quando IFN- γ é administrado em altas doses ocorre a diminuição da secreção dos

anticorpos isotípicos acima citados e quando essa dose é baixa a secreção diminuída de IgG1 e IgE persiste, sendo estimulada a secreção de IgG2a (MORRIS *et al*, 1994; GERMANN *et al*, 1995).

Camundongos desprovidos do timo desenvolvem altas taxas de parasitemias com 100% de mortalidade, enquanto animais eutímicos utilizados como controles, apesar de desenvolver parasitemia, podem sobreviver à infecção pelo *T. cruzi* (KIERSZENBAUM, 1979). REED (1980) também demonstrou a importância de linfócitos no controle da infecção pelo *T. cruzi*, em que a transferência de linfócitos provenientes de camundongos infectados induzem proteção quando transferidos para camundongos normais.

Ambas as subpopulações de linfócitos T, $CD4^+$ e $CD8^+$ têm se mostrado importantes na mediação da proteção em camundongos infectados com cepas de *T. cruzi*. A depleção de células LTCD8⁺ resulta na inabilidade de animais resistentes em controlar a infecção por uma determinada cepa de *T. cruzi*. De forma semelhante, a depleção de LTCD4⁺ resulta em altas taxas de parasitemia e mortalidade. Em ambos os casos, fica claro o importante papel dessas células no controle da infecção durante fase aguda da infecção pelo *T. cruzi* (TARLETON, 1990). Recentes estudos “in vitro” demonstram que os receptores TCR-CD3 de LTCD4⁺, mas não o de CD8⁺, mediarão a ativação da morte celular de esplenócitos de camundongos em infecção aguda pelo *T. cruzi* (LOPES & REIS, 1996).

Estudos “in vivo” e “in vitro” têm demonstrado o envolvimento da IL-12 na resistência a infecção parasitária (GAZZINELLI *et al*, 1994) e também realçam o efeito contrário da IL-10 no sentido de agravar a infecção e o sinergismo da IL-12 com o IFN- γ e TNF- α no sentido de controle da infecção (GAZZINELLI *et al*, 1996).

A presença das citocinas IL-1, IL-2, IL-4, IL-5 e INF- γ é constante durante a infecção pelo *T. cruzi*, sendo que elas teriam grande importância no processo de controle da parasitemia e consequentemente susceptibilidade à doença de Chagas (HOLF *et al* 1993). Em experimento realizado por REED (1988), utilizando IFN- γ recombinante, foi possível verificar que esse era um potente ativador de macrófagos conferindo proteção a camundongos durante a infecção aguda pelo *T. cruzi*.

Estudos mostram que o IFN- γ e a IL-10 atuam de forma antagônica, no que se refere à infecção por determinadas cepas de *T. cruzi*; o IFN- γ parece agir no sentido de diminuir e a IL-10, no sentido de aumentar a infecção. A susceptibilidade à infecção pelo *T. cruzi* é mediada pela IL-10, pois essa citocina inibe a produção de IFN- γ durante a infecção do *T. cruzi* (SILVA *et al*, 1992; REED *et al*, 1994). Em recente trabalho, foi também demonstrado que, além da IL-10, a IL-4 atua no sentido de aumentar a suscetibilidade a infecção pelo *T. cruzi*, diminuindo os níveis de IFN- γ e estimulando o aumento da produção de IL-10 e IL-4 (OLIVEIRA *et al*, 1996). As células NK são as mais importantes na produção de IFN- γ e a depleção destas, em esplenócitos de camundongos infectados com *T. cruzi*, promove diminuição da produção de IFN- γ e aumento da produção de IL-10, agravando o processo infeccioso (CARDILLO *et al*, 1996).

Recentemente, foi verificado que GM-CSF (fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos) são reguladores da parasitemia em animais infectados com *T. cruzi* e que a administração de GM-CSF recombinante promove uma sensível diminuição da parasitemia com grande mortalidade do parasita (FONTT, 1996).

Estudo recente, abordando o papel do TNF- α em camundongos BALB/c fêmeas prenhes cronicamente infectados com cepa virulenta de *T. cruzi*, demonstrou que os animais produzem altos níveis de TNF e esta citocina induziria a proteção do feto durante o processo infeccioso (RIVERA *et al*, 1995).

A geração de NO por macrófagos ativados também ocorre durante a infecção experimental por parasitas intracelulares, inclusive o *T. cruzi*, em que a produção de NO está correlacionada com a resistência ou a suscetibilidade do animal à infecção (VESPA *et al*, 1994). Estudos recentes têm demonstrado que a adição de compostos exógenos precursores do óxido nítrico, como a citrulina ou a arginina, pode promover aumento na produção de NO por macrófagos ativados, ocasionando sensível morte de parasitas (NORRIS *et al*, 1995). O TNF- α produzido por macrófagos ativados pelo IFN- γ também potencializa a produção de NO, promovendo a morte do parasita (SILVA *et al*, 1995).

Antígenos de tripanosomatídeos induzem a supressão imunológica. O grau de virulência de clones *T. brucei brucei* é proporcional ao grau de imunossupressão promovido por esse parasita (ALBRIGHT *et al*, 1981). Estudos realizados com *T. musculi* demonstram que a virulência das cepas é, em muitos casos, fator determinante da imunossupressão observada em hospedeiros vertebrados infectados (SACKS *et al*, 1980).

A imunodeficiência observada após a infecção pelo *T. cruzi* tem sido encontrada em experimentos utilizando camundongos da linhagem BALB/c (CORSINI *et al*, 1981). Durante a fase aguda da doença de Chagas, inicia-se um processo imunossupressivo, que é linfócito T-dependente e que se agrava na fase crônica, na qual a supressão da síntese de anticorpos da classe IgG anti-antígenos heterólogos persiste (REED *et al*, 1983). Os mecanismos que envolvem essa imunossupressão ainda não são totalmente esclarecidos, porém um provável mecanismo imunossupressor talvez esteja relacionado com a diminuição da produção de IL-2 (MAJUNDER & KIERSZENBAUM, 1995). De maneira similar, também ocorre na fase crônica, com a produção por esplenócitos de substâncias que inibiriam LTH (LIEW *et al*, 1987; LIEW *et al*, 1988). Segundo REED *et al* (1984) e REED *et al* (1989), a imunossupressão pode ser parcialmente revertida pelo tratamento com citocinas. Em experimentos realizados por esses autores, ficou demonstrado que a adição de IL-2 a sobrenadantes de cultura de esplenócitos, pode reverter o processo imunossupressivo restaurando a produção de anticorpos dirigidos contra antígenos heterólogos, e que, adicionando-se também IL-1, o quadro imunossupressivo era mais facilmente revertido. Outros experimentos com cultura de esplenócitos oriundos de camundongos infectados demonstram que a diminuição da produção de IL-2 pode ser revertida parcialmente pela adição de IL-2 à cultura e isso provavelmente ocorre devido a uma redução de receptores para IL-2 (TARLETON, 1984; TARLETON, 1988).

Recentemente foi descrito um fator denominado de TIF (fator imunossupressor tripanosomal) de 30 a 100 kDa, espontaneamente liberado pelo *T. cruzi*, capaz de suprimir a expressão de IL-2 (KIERSZENBAUM, 1990).

O *T. cruzi* pode também inibir a expressão dos receptores CD3, CD4 e CD8 em linfócitos normais ou ativados por mitógenos, fazendo com que a efetuação da resposta imune frente ao parasita caia sensivelmente (SZTEIN, 1990).

Experimentos "in vitro" demonstram o envolvimento de células aderentes no processo de imunossupressão. KIERSZENBAUM (1982) demonstrou que células aderentes oriundas de esplenócitos totais, provenientes de camundongos infectados com *T. cruzi*, causavam redução significativa da resposta proliferativa de esplenócitos normais estimulados com mitógeno, quando esses dois grupos de células eram co-cultivados. Esse autor também observou que, quando as células eram tratadas com um inibidor de prostaglandinas, o processo imunossupressivo era parcialmente revertido, demonstrando que células aderentes, juntamente com prostaglandinas, mediarão a imunossupressão na fase aguda da doença de Chagas. De maneira similar também ocorre na fase crônica, com a produção de substâncias pelos esplenócitos, que inibiriam LTH (LIEW *et al*, 1987; LIEW *et al*, 1988). REED (1988) demonstrou o importante papel do IFN- γ no processo de reversão do processo imunossupressivo. Outros experimentos de dosagem de IFN- γ em animais infectados com tripanosomatídeos são ambíguos; camundongos infectados com *T. brucei* têm estimulado a produção em excesso de IFN- γ e TNF- α , podendo induzir imunossupressão, diminuindo a proliferação de LT CD4⁺ e CD8⁺ (DARH *et al*, 1996).

Pelo descrito anteriormente nesta introdução, a infecção experimental de vertebrados pelo *T. cruzi* pode ser influenciada pela particularidade da cepa utilizada. A constituição genética, a idade e o sexo do hospedeiro vertebrado podem influenciar essa infecção. Diferentes formas sangüíneas, taxa de mortalidade e curso da parasitemia têm sido observados em experimentos com animais inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi*.

A proposta do nosso trabalho foi a utilização de cepas *T. cruzi* com características de virulência variadas em infecção experimental, inoculadas em camundongos BALB/c, observando os perfis das respostas imunes humoral e celular frente a essas cepas. Para tanto, foram utilizadas as cepas PF, SC38 e Y. A cepa PF é um clone oriundo da cepa Y, originada após sucessivas passagens em meio LIT, que

tem a propriedade de proteger camundongos infectados com cepas de alta virulência. Por não ter sido observada parasitemia após seu inóculo, esta cepa foi designada avirulenta (MENEZES, 1968; RIBEIRO DOS SANTOS, 1973). A cepa SC38 foi originalmente descrita por STENDEL (1993), isolada das fezes de triatomíneos e que tem a propriedade de induzir alta parasitemia com morte nula de animais num espaço de 60 dias após o inóculo. Por ter esta característica, essa cepa foi designada de média virulência. E a cepa Y que foi originalmente isolada de xenodiagnóstico de paciente chagásico por SILVA & NUSSENZWEIG, (1953) e largamente utilizada em muitos trabalhos relacionados à atividade imunossupressiva, imune humoral e celular, essa cepa induz alta parasitemia com alta mortalidade de animais, por isso, é descrita como cepa de alta virulência.

Este trabalho foi realizado tendo como base essas características de virulência das cepa PF, SC38 e Y. Foi realizado um estudo comparativo entre elas, enfocando os aspectos da atividade imunossupressiva da resposta humoral e celular de animais infectados. Nossos estudos podem servir de orientação a trabalhos posteriores com antígenos do *T. cruzi*, fornecendo subsídios para esclarecer os mecanismos que envolvem as respostas imune do tipo humoral e celular na doença de Chagas e parasitária de modo geral.

II - OBJETIVOS

OBJETIVOS

Considerando que pouco se conhece a respeito da resposta imunossupressora promovida pelas diferentes cepas de *T. cruzi*, e que a maioria dos estudos são restritos a somente algumas delas, este trabalho teve como objetivo observar a existência de uma provável associação entre a supressão da resposta imune durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos BALB/c e a virulência determinadas por diferentes cepas de *T. cruzi*. Para avaliar o estado de imunossupressão promovida pelo *T. cruzi*, este trabalho enfocou aspectos da imunidade humoral, através da dosagem de anticorpos IgG1, IgG2a e IgE específicos para *T. cruzi*, bem como da imunidade celular, através da dosagem de citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12.

III - MATERIAL E MÉTODOS

MATERIAL E MÉTODOS

III.1 - ANIMAIS

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem BALB/c com 10 a 12 semanas de idade, do biotério do Instituto Butantan e do biotério do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Uberlândia.

III.2 - MANUTENÇÃO DAS CEPAS DE *T. cruzi*

III.2.1 - Cepa PF (avirulenta)

Obtida do Laboratório de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, foi mantida em meio de LIT ("Liver Infusion-Tryptose") a 28 °C, em estufa e repicada a cada sete dias com inóculo de aproximadamente 5×10^3 parasitas, contidos em 0,1 ml do mesmo meio.

III.2.2 - Cepa Y (alta virulência)

Obtida do Laboratório de Imunologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, foi mantida em camundongos BALB/c e em células Vero.

Essa cepa foi repicada em camundongos a cada sete dias com inóculo de 5×10^3 parasitas contidos em 0,1 ml de sangue, adicionado de uma solução de citrato de sódio (3,8%).

Em células Vero, o parasita foi repicado até o terceiro dia de cultivo. As células Vero foram multiplicadas em meio RPMI-1640 + 10% SFB (soro fetal bovino), em garrafas plásticas (COSTAR, Cambridge, USA) de 100 ml e infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e mantidas em estufa de CO₂ a 37 °C. A partir do 3° dia de cultivo, o número de parasitas aumenta, tanto intra como extra-celularmente e, portanto, antes que uma proporção significativa de parasitas se tornasse inviável, o meio foi coletado em um tubo de centrifuga estéril, centrifugado uma vez a 1000g por 10 minutos, à temperatura ambiente, o sobrenadante desprezado e o "pellet" contendo

parasitas foi ressuspenso em RPMI-1640 + 10% SFB. Posteriormente, esse meio com parasitas foi colocado em outra garrafa contendo monocamadas de células Vero não infectadas.

III.2.3 - Cepa SC38 (média virulência)

Obtida do Laboratório de Protozoologia do Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Catarina, foi mantida em camundongos BALB/c e infectada em células Vero.

Essa cepa foi repicada em camundongos a cada 25 dias com inóculo de 5×10^3 parasitas contidos em 0,1 ml de sangue adicionado a uma solução de citrato de sódio (3,8%).

Em células Vero, foi repicada até o sexto dia de cultivo. As células Vero foram cultivadas em meio RPMI-1640 + 10% SFB, em garrafas plásticas de 100 ml, infectadas com formas tripomastigotas de *T. cruzi* e mantidas em estufa de CO₂ a 37°C. Com o aumento do número de parasitas, tanto intra como extra-celularmente, após seis dias de cultivo e antes que uma proporção significativa de parasitas se tornesse inviável, o meio foi coletado em tubo de centrífuga estéril e centrifugado uma vez a 1000g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o "pellet" contendo os parasitas, foi ressuspenso em meio RPMI-1640 + 10% SFB e colocado em outra garrafa contendo uma monocamada de células Vero não infectadas.

III.3 - INOCULAÇÕES

III.3.1 - Inoculações de animais com as cepas de *T. cruzi* e hemácia de carneiro.

Foram inoculados, por via intraperitoneal, 8 grupos de 10 camundongos cada, com a finalidade de obter amostras de sangue em 7, 15, 30, 45, 60, 90 dias após os inóculos. A primeira coleta de sangue foi realizada antes dos inóculos.

Três grupos de animais foram inoculados com as diferentes cepas de *T. cruzi*; o primeiro grupo com 2×10^7 parasitas da cepa PF, contidos em 0,1 ml de solução fisiológica; o segundo grupo com 5×10^3 parasitas da cepa SC38, contidos em 0,1 ml

de sangue adicionados a uma solução de citrato de sódio (3,8%) e o terceiro grupo de animais, inoculados com 100 parasitas da cepa Y, contidos em 0,1 ml de sangue adicionado a uma solução de citrato de sódio (3,8%).

Três grupos de animais foram inoculados com as cepas de *T. cruzi*, como descrito anteriormente, e sete dias após foram inoculados com uma suspensão de hemácias de carneiro ($2,5 \times 10^8$ células) contidas em 0,1 ml de solução fisiológica.

Um grupo de 10 animais foi inoculado com uma suspensão de hemácias de carneiro ($2,5 \times 10^8$ células) contidas em 0,1 ml de solução fisiológica (grupo controle A), e outros 10 animais foram inoculados com solução fisiológica (grupo controle B). Com as amostras de soro obtidas, foram dosados anticorpos anti-hemácia de carneiro pelo método de hemaglutinação e anticorpos anti-*T. cruzi* pelo método de ELISA com anti-gama total marcado com peroxidase como anticorpos secundários.

III.3.2 - Inoculações de animais com as cepas de *T. cruzi* para dosagem de IgE, IgG1, IgG2a e parasitemia

Foram inoculados, por via intraperitoneal, 4 grupos de 10 camundongos cada, com a finalidade de obter sangue em 15, 30, 45, 60 e 90 dias após os inóculos. A primeira coleta de sangue foi realizada antes da inoculação das cepas.

O primeiro grupo de animais foi inoculado com 2×10^7 parasitas da cepa PF, contidos em 0,1 ml de solução fisiológica.

O segundo grupo de animais foi inoculado com 5×10^3 parasitas da cepa SC38, contidos em 0,1 ml de sangue adicionado a uma solução de citrato de sódio (3,8%).

O terceiro grupo de animais foi inoculado com 100 parasitas da cepa Y, contidos em 0,1 ml de sangue adicionado a uma solução de citrato de sódio (3,8%).

O quarto grupo de animais foi inoculado somente com 0,1 ml de solução fisiológica (grupo controle).

Com as amostras de soros obtidas nos diferentes grupos de animais, foram dosados os anticorpos IgE anti-*T. cruzi*, anticorpos das sub-classes IgG1 e IgG2a anti-

T. cruzi pelo método de ELISA, sendo a parasitemia também mensurada nesses animais.

III.3.3 - Inoculações de animais com as cepas de *T. cruzi* para os ensaios biológicos

Foram inoculados, por via intraperitoneal, 3 grupos de camundongos; sendo 12 animais com a cepa PF, 12 com a SC38 e 20 com a Cepa Y. Foram sacrificados por deslocamento cervical, dois animais por dia em: 07, 15, 30, 45, 60 e 90 dias após os inóculos. Dois animais não inoculados foram sacrificados no dia "0" (animais controle).

O primeiro grupo de animais foi inoculado com 2×10^7 parasitas da cepa PF, contidos em 0,1 ml de solução fisiológica.

O segundo grupo de animais foi inoculado com 5×10^3 parasitas da cepa SC38, contidos em 0,1 ml de sangue adicionado a uma solução de citrato de sódio (3,8%).

O terceiro grupo de animais foi inoculado com 100 parasitas da cepa Y, contidos em 0,1 ml de sangue adicionado a uma solução de citrato de sódio (3,8%).

Os baços foram retirados após os animais terem sido sacrificados e foram utilizados posteriormente nos ensaios biológicos.

III.4 - ANTÍGENOS

III.4.1 - Hemácias de carneiro

O sangue de carneiro foi colhido em bolsas utilizadas em banco de sangue, e, posteriormente, 10 ml foram lavados 3 vezes em solução fisiológica (0,85% de NaCl), sendo que a cada lavagem sucedeu uma centrifugação de 1000g por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a última lavagem, foi desprezado o sobrenadante, a papa de hemácias resultante foi coletada e utilizada, em variadas soluções, durante alguns ensaios desse trabalho.

III.4.2 - Cepa PF

Suspensões de parasitas da cepa PF foram cultivadas em meio LIT, 7 dias após o repique, lavadas 3 vezes em solução fisiológica a 1000g por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado e os parasitas vivos foram contados e inoculados em camundongos ou fragmentados por criólise. A criólise consistiu de 6 ciclos em nitrogênio líquido e banho-maria a 37 °C e, após o último ciclo, a solução protéica foi centrifugada a 5000g por 30 min a 4 °C, o sobrenadante coletado e o “pellet” desprezado. As proteínas do sobrenadante foram quantificadas pelo método de Lowry (LOWRY, 1951) e utilizadas em ensaios deste trabalho.

III.4.3 - Cepa Y e SC38

Suspensões de parasitas das cepas Y e SC38 foram mantidas em camundongos e cultivadas em células Vero e utilizadas como antígenos da seguinte forma: os parasitas obtidos a partir de amostras de sangue de camundongos contaminados com *T. cruzi*, por punção do plexo retrorbital, quantificados e inoculados via intraperitoneal; os parasitas cultivados em células Vero foram lavados 3 vezes em meio RPMI-1640, sem SFB e centrifugados a 1000g por 10 minutos à temperatura ambiente. Após a última lavagem, o sobrenadante foi desprezado, a massa de parasitas no “pellet” foi fragmentada por criólise e as proteínas obtidas no sobrenadante foram quantificadas pelo método de Lowry e utilizadas em ensaios deste trabalho.

III.4.4 - Biotinilação de antígenos

Foi preparada uma solução de N-hidroxissuccinimidabiotina a 10 mg/ml em dimetilsulfóxido e uma solução de antígenos solúveis de cada cepa na concentração de 1 mg/ml em tampão Borato de Sódio 0,1M pH 8,8. Sobre cada antígeno, e em separado, foi adicionado o éster de biotina, na proporção de 250 µg por miligrama de antígeno e, a seguir, as soluções foram incubadas 4 horas à temperatura ambiente sob agitação lenta, de acordo com TAKAHASHI (1995).

Após esse período de incubação da mistura das soluções contendo antígenos solúveis e biotina, foi colocado cloreto de amônio 1M, na proporção de 20 μ l para cada 250 μ g do éster de biotina e foi incubado 10 minutos à temperatura ambiente. Após essa incubação, a solução contendo antígenos marcados com biotina foi dialisada em PBS a 4 °C por 48 horas sob agitação lenta e com diversas trocas do tampão, sendo de pelo menos uma a cada 6 h. Os antígenos biotinilados de cada cepa foram aliquotados e guardados a temperatura de -20 °C.

III.5 - MEIOS DE CULTURA

III.5.1 - Meio LIT ("Liver Infusion - Tryptose")

O meio de LIT foi feito a partir da pesagem e junção de 24,0 g de NaCl com 12,4 g de KCl mais 48,0 g de Na₂HPO₄ (anidro) com 12,0 g de glicose e de 30,0 g de triptose com 30,0 g de infusão de fígado, e após a reunião desses reagentes, foi colocado um volume de água bi-destilada qsp (quantidade suficiente para) de 4000 ml. O fosfato de potássio anidro foi adicionado vagarosamente sobre a água sob agitação, para evitar a petrificação, e a infusão de fígado foi dissolvida separadamente em 900 ml de água destilada à temperatura de aproximadamente 80 °C e resfriada um pouco antes de adicionar os demais componentes. O pH foi acertado para 7,3 com HCl 10N (aproximadamente 4,5 ml), sendo o pH inicial de, aproximadamente, 7,8. Soro bovino foi acrescentado na concentração de 10% e a preparação final foi dividida em frações de 400 ml em frascos de soro de 600 ml inativadas em banho maria a 68°C por 1 hora, com agitação freqüente. Após esfriamento, foi adicionado uma solução de hemoglobina a 2% e o volume completado para 6000 ml com água destilada. O meio foi, então, pré-filtrado em membranas de 60 e 90S para clarificação. Após adicionar 100 U de penicilina e 100 μ g de estreptomicina/ml, o meio foi esterilizado por filtração em membrana EKS-SEITZ 90S ou similar de 0,22 μ m de porosidade, montada em sistema filtrante estéril e distribuído em frascos com tampa de rosca ou em Erlenmeyers esterilizados. A distribuição foi feita em capela de fluxo laminar. O meio foi estocado a 4°C ou a -20°C, de acordo com a demanda. O meio somente teve sua

utilização liberada após passar pelo teste de esterilidade e crescimento. Essa prova de esterilidade foi feita incubando-se alguns frascos contendo meio a 37°C por 3 a 4 dias, verificando-se a presença de microrganismos, o que ocorre formando uma turbidez. Os frascos com meio foram deixados à temperatura de 28°C por mais 2 dias para verificar novamente a presença de microrganismos. A prova de crescimento foi feita a 28°C, inoculando-se 1 ou 2×10^7 formas de *T. cruzi*, num volume final de 12ml em Erlenmeyers de 125 ml. Como controle, foram utilizadas duplicatas com um meio LIT já testado.

III.5.2 - Meio RPMI-1640

O meio RPMI-1640 foi feito a partir da pesagem e junção de 10,39 g de RPMI-1640 (BRL, New York, USA) com 2,0 g bicarbonato de sódio mais 0,11 g de piruvato Na com 6,0 g de glicose mais 2,38 g de hepes e de 40,0 mg de gentamicina; após serem reunidos esses reagentes foram completados para um volume final de 1000ml de água bi-destilada. A solução foi inicialmente feita com, aproximadamente, 900 ml de água bi-destilada, mantendo-se sob agitação constante em agitador magnético. Após completa dissolução dos reagentes, o pH foi acertado para 7,2-7,4 e colocado a gentamicina, completando-se o volume final para 1000 ml. O meio foi filtrado em filtro estéril de 0,22 μ m (Millipore, St. Louis, USA). O teste de esterilidade foi realizado deixando-se o frasco contendo o meio por 24 horas a 37 °C.

III.6 - ENSAIOS BIOLÓGICOS

III.6.1 - Cultivo de esplenócitos

Após o sacrifício por deslocamento cervical, os animais foram mergulhados totalmente em álcool 70%, por alguns minutos e posteriormente imobilizados em placa de isopor. Com auxílio de pinças e tesouras, os baços dos animais foram removidos e colocados em placa de Petri pequena contendo meio RPMI-1640 + 5% SFB, sendo logo após, pinçados até total ruptura do estroma; a solução contendo os esplenócitos foi colocada em um tubo plástico (COSTAR, Cambridge, USA) de 15 ml e a solução

foi homogeneizada 30 vezes. O homogeneizado foi centrifugado a 400g por 10 minutos e, após o sobrenadante ser desprezado, o “pellet” ressuspense em 12ml de tampão de lise e incubado à temperatura ambiente por 5 minutos sob agitação suave. A seguir, foram feitas 3 lavagens de 400g por 10 minutos com meio RPMI-1640 + 5% SFB. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e o “pellet” ressuspense em 1 ml de meio de RPMI-1640 + 10% SFB. Os esplenócitos contidos nesse volume foram contados em câmara de Neubauer, utilizando-se uma solução final de 1:20 de azul de trypan, sendo que somente as células não coradas foram contadas (LAFAILLE *et al*, 1990; FONSECA, 1995; COLINGAN *et al*, 1991).

Após serem contados, os esplenócitos tiveram sua concentração padronizada para 5×10^6 células por poço em um volume final de 1ml de meio RPMI-1640 + 10% SFB e, posteriormente, utilizados nos ensaios de estímulos antigênicos.

III.6.2 - Estímulos antigênicos e sobrenadantes de cultura

Os esplenócitos foram cultivados em placas de plástico para microcultura (CORNING, New York, USA) de 24 poços. Cada placa foi dividida em 3 porções, de modo que ficassem 8 poços para cada “estímulo”, a saber: 8 poços para esplenócitos estimulados com 30 μ g de antígeno de criólise de cada cepa, diluído em meio RPMI-1640 + 10% SFB; 8 para esplenócitos estimulados com 5 μ g de Con-A (Concanavalina-A) por ml de RPMI-1640 + 10% SFB; e 8 poços para esplenócitos estimulados com o meio RPMI-1640 + 10% SFB. O número de esplenócitos por poço foi de 5×10^6 , as culturas foram incubadas em estufa de CO₂ a 37 °C (LAFAILLE *et al*, 1990).

Os sobrenadantes de cultura, obtidos do cultivo dos esplenócitos de animais infectados com as cepas de *T. cruzi* 07, 15, 30 45, 60 e 90 dias após os inóculos, foram coletados em duplicatas nos tempos de: 24, 48, 72 e 96 horas pós-estímulos. Após a coleta em tubos Eppendorfs, os sobrenadantes foram centrifugados em centrífuga para Eppendorf por 5min; ao término desse período, foram aliquotados e estocados à temperatura de -70 °C.

III.7 - DETERMINAÇÃO DOS PERFIS DE ANTICORPOS

III.7.1 - Hemaglutinação direta

A hemaglutinação foi realizada em placas de microaglutinação com 96 poços, sendo o fundo de cada poço em formato de V. Os soros foram inativados previamente a 56 °C por 30 minutos e diluídos em série, na razão 2, sendo o volume final de 25 µl. A primeira diluição foi de 1:2, deixando 25 µl do soro puro no primeiro orifício e o restante para as diluições subseqüentes, sendo 1:2048 a diluição final.

Sobre cada poço, onde se encontravam as diluições das amostras de soros, foram colocados 25 µl de uma suspensão de SRBC (células vermelhas do sangue de carneiro) 2% diluída em solução fisiológica. As hemácias de carneiro foram lavadas 3 vezes em solução fisiológica. As placas foram cobertas com uma superfície plástica (filme plástico de PVC ROLOPAC), agitadas suavemente e incubadas à temperatura ambiente por 1h. A leitura foi realizada em lupa após 1h e confirmada 24 h após a incubação (CUNNINGHAM *et al*, 1978; HUDSON, 1979).

III.7.2 - Dosagem de anticorpos gamaglobulina total anti-*T. cruzi* pelo método de ELISA.

Placas plásticas de polivinilcloreto (FALCON, Franklin Lakes, USA) de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µl por poço de uma solução de antígeno solúvel de cepa Y de *T. cruzi*, na concentração de 20 µg por ml, em tampão 0,06M carbonato-bicarbonato pH 9,6 e incubadas a 4 °C durante uma noite.

Os soros teste e controle foram diluídos a partir de 1:20, na razão de 4, em PBS (0,15M pH 7,2)-T20 (Tween 20) 0,1% e bloqueados 1 hora com, 200 µl por poço, PBS-T20 0,1% + 0,5% de BSA (albumina de soro bovino). As placas foram lavadas 3 vezes em intervalos de 5 minutos, com PBS-T20 0,1%.

Duplicatas das amostras dos soros diluídos, em volumes de 50 µl, foram adicionadas a cada poço e incubadas a 37 °C por 45 minutos. Foram adicionados 50 µl do conjugado em 2 poços para controle do conjugado. As placas foram lavadas 3 vezes em intervalos de 5 minutos, com PBS-T20 0,1%.

O conjugado enzimático (IgG de coelho anti-gamaglobulina de camundongo marcada com peroxidase) foi preparado na diluição de 1:2000 em PBS-T20 0,1%, adicionado um volume de 50 µl por poço da placa e incubado a 37 °C por 45 minutos. Transcorrido o tempo de incubação, as placas foram lavadas 3 vezes em intervalos de 5 minutos, com PBS-T20 0,1%.

A solução reveladora foi adicionada 50 µl a cada poço e incubada por 10 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. Essa solução reveladora foi preparada na hora do uso, consistindo de 5 mg de OPD (orto-fenileno-diamina) em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato 0,1M pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30%.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita logo após a interrupção da atividade enzimática, em leitor de microplacas (Titertek Multiskan Plus, MKII) com filtro 492 nm.

III.7.3 - Dosagens de anticorpos IgG1 e IgG2a anti-*T. cruzi* pelo método de ELISA

Placas plásticas de polivinilcloreto (FALCON, Franklin Lakes, USA) de 96 poços foram sensibilizadas com 50 µl por poço, por uma solução de antígeno solúvel de *T. cruzi* na concentração de 20 µg/ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 e incubadas a 4°C durante toda a noite. Transcorrido o tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05% e bloqueadas com PBS-T20 0,05% + M5% (leite mólico a 5%) por 60 minutos à temperatura ambiente, num volume de 200 µl por poço.

As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05% e incubadas com "pools" dos soros testes dos dias 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias pós-inóculos das cepas, e "pools" de soros controles, os quais foram diluídos a 1:20 em PBS-T20 0,05% + M1% e bloqueados 20 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, 50 µl das amostras de soros testes e controles foram colocadas por poço na placa, incluindo-se, em cada reação, controle do conjugado e controle dos anticorpos anti-isotipos. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora, sendo lavadas após a incubação por 3 vezes com PBS-T20 0,05%, quando foram adicionados aos poços 50 µl dos anticorpos dirigidos para IgG2a e IgG1 de camundongos, produzidos em

coelhos. Após incubação a 37 °C por 1 hora, as placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05% e incubadas com 50 µl do conjugado anti-γ de coelho-peroxidase, diluídos 1:4000 em PBS-T20 0,05%, que foram adicionados a cada poço e incubados a 37 °C por 1 hora. Novamente as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T0,05% e, a seguir, 50 µl do substrato foram adicionados a cada poço e incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. O substrato enzimático foi preparado na hora do uso, consistindo de 5 mg de OPD em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30%.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita logo após a interrupção enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492 nm.

III.7.4. - Dosagem de IgE anti-*T. cruzi* por ELISA

Placas plásticas de polivinilcloreto (FALCON, Franklin Lakes, USA) de 96 poços foram sensibilizadas com um volume de 50 µl por poço, com uma solução de anticorpos monoclonais anti-IgE (HMK12) na concentração de 1 µg por ml, em tampão carbonato-bicarbonato 0,06M pH 9,6 e incubados a 4°C durante a noite. Transcorrido o tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05% e bloqueadas com PBS-T20 0,1% + M5% por 60 minutos à temperatura ambiente, num volume de 200 µl por poço.

As placas foram novamente lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05% e, a seguir, incubadas com "pools" das amostras de soros testes dos dias 7, 15, 30, 45, 60 e 90 dias pós-inóculos das cepas, e "pools" das amostras de soros controles, que foram diluídas 1:5 em PBS-T20 0,05% + M1% e incubadas 20 minutos à temperatura ambiente e 50 µl de cada amostra foram colocadas nos poços das placas, incluindo-se poços para controle do conjugado, dos antígenos biotinilados de cada cepa de *T. cruzi* e dos anticorpos monoclonais. As placas foram incubadas a 37 °C por 1 hora, sendo lavadas após a incubação por 3 vezes com PBS-T20 0,05%. Após as lavagens, 50 µl dos antígenos biotinilados de cada cepa, 2µg/ml, diluídos em PBS-T20 0,1%+M1%, foram colocados nos poços e incubados a 37 °C por 1 hora. As placas foram novamente

lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05%, adicionando-se em seguida 50µl do conjugado avidina-peroxidase, diluído 1:1000 em PBS-T20 0,05% e incubadas a 37 °C por 1 hora. As placas novamente foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05%. Adicionaram-se, então, 50µl do substrato a cada poço e as placas foram incubadas por 10 minutos à temperatura ambiente em câmara escura. O substrato enzimático foi preparado na hora do uso, consistindo de 5mg de OPD em 12,5ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30% (TAKAHASHI, 1995).

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita logo após a interrupção enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492nm.

III.8 - Determinação dos perfis de citocinas

III.8.1 - Dosagem de IL-4 murina por ELISA

Placas plásticas (CORNING, New York, USA) de 96 poços e de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IL-4 (clone BVD6) na concentração de 10 µg por ml, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 0,06 M; 50 µl dessa solução foram colocados em cada poço da placa e deixados durante a noite a 4 °C. Após esse intervalo de tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05% e, posteriormente, bloqueadas com PBS-T20 0,05% + M5% por 1 hora à temperatura ambiente, sendo utilizados 200 µl por poço. Após esse período de incubação, as placas foram lavadas 6 vezes em intervalos curtos com PBS-T20 0,05%, e, a seguir, foram adicionadas as amostras testes não diluídas e as da curva padrão, sendo 50 µl por poço. A curva foi feita com uma concentração inicial de 10 ng/ml de IL-4 recombinante e diluída com PBS-T20 0,05% e M5% em diluições seriadas com fator de diluição 2, sendo as placas incubadas durante a noite a 4 °C. Ao término da incubação, placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05%, sendo adicionado a cada poço anticorpos monoclonais anti-IL-4 biotinilados (clone 11B11), diluídos 1:5000 em PBS-T20 0,05%+M5%, 50 µl por poço. Ao término da incubação de 1 hora a 37 °C, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e adicionados 50 µl a

cada poço do conjugado avidina-peroxidase do “kit” ABC (Vectstain, Vector, Burlingame, USA), e incubadas por 1 hora a 37°C. Ao término da incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e adicionados 50 µl da substância reveladora a cada poço e incubado de 15 min à temperatura ambiente em câmara escura. O substrato enzimático foi preparado na hora do uso, consistindo de 5 mg de OPD em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30% (COLIGAN *et al*, 1991).

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita logo após a interrupção da atividade enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492 nm.

III.8.2. - Dosagem de IFN-γ murino por ELISA

Placas plásticas (CORNING, New York, USA) de 96 poços e de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IFN-γ (clone XMG-12) na concentração de 10 µg por ml diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 0,06 M, sendo que 50 µl dessa solução foram colocados em cada poço da placa e deixados durante a noite a 4°C. Após esse intervalo de tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05% e, posteriormente, bloqueadas com PBS-T20 0,05% + M5% por 1 hora à temperatura ambiente, sendo adicionados 200 µl por poço. As placas foram novamente lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05%, e, a seguir, foram adicionadas as amostras testes diluídas 1:5 e as diluições da curva padrão, sendo 50 µl por poço. A curva foi feita com uma concentração inicial de 20 U/ml de IFN-γ recombinante e diluições seriadas, com fator de diluição 2, em PBS-T20 0,05% + M5%. As placas foram incubadas durante a noite a 4°C e, ao término desta, foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05%.

Anticorpos policlonais de coelho anti-IFN-γ murino, diluídos 1:2000 em PBS-T20 0,05% + M5%, 50 µl por poço, foram adicionados a cada poço e incubados por 1 hora a 37°C. Ao término dessa incubação, as placas foram lavadas 6 vezes em PBS-T20 0,05%, sendo, a seguir, adicionado em cada poço o conjugado IgG de cabra anti-IgG de coelho marcado com peroxidase 1:4000 em PBS-soro de cabra 10%. Ao

término da incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T0,05%, sendo a seguir incubadas com 50 µl da substância reveladora por 10 a 15 min à temperatura ambiente, em câmara escura. A substância reveladora foi preparada na hora do uso, consistindo de 5 mg de OPD em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30% (COLIGAN *et al*, 1991).

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita logo após a interrupção da atividade enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492 nm.

III.8.3. - Dosagem de IL-10 murina por ELISA

Placas plásticas (CORNING, New York, USA) de 96 poços e de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpo monoclonal anti-IL-10 (clone SXA2), na concentração de 2 µg/ml, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 0,06 M, sendo que 50 µl dessa solução foram colocados em cada poço das placas, as quais foram incubadas durante uma noite a 4 °C. Após esse intervalo de tempo, as placas foram lavadas por 3 vezes com PBS-T20 0,05%, e, posteriormente, bloqueadas com PBS-T20 0,05% + M5% por 1 hora à temperatura ambiente, tendo sido adicionados 200 µl por poço. As placas foram novamente lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05%, e, a seguir, incubadas durante toda noite a 4 °C com as amostras testes não-diluídas e as diluições da curva padrão, 50 µl por poço. A curva foi feita com uma concentração inicial de 50 ng/ml de IL-10 recombinante e diluída em PBS-T20 0,05% + BSA 1% em diluições seriadas, com fator de diluição 2. Ao término da incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e adicionado a cada poço o anticorpo secundário anti-IL-10 biotinilado, diluído a 1µg/ml em PBS-T20 0,05% e M5%, 50 µl por poço. Ao término da incubação de 1 hora a 37 °C, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e adicionado a cada poço o conjugado avidina-peroxidase do “kit” ABC (Vectstain, Vector, Burlingame, USA), 50 µl por poço. Após incubação por 1 hora a 37 °C, as placas foram novamente lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e incubadas por 10 a 15 min à temperatura ambiente em câmara escura com 50 µl em cada poço da

substância reveladora. Essa substância foi preparada na hora do uso, consistindo de 5 mg de OPD em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30%.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 µl de solução de H₂SO₄ 2N. A leitura foi feita logo após a interrupção da atividade enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492 nm (COLIGAN *et al*, 1991).

III.8.4. - Dosagem de IL-12 murina por ELISA

Placas plásticas (CORNING, New York, USA) de 96 poços e de alta afinidade foram sensibilizadas com anticorpos monoclonais anti-IL-12 (clone C17.15.10), na concentração de 10 µg/ml, diluídos em tampão carbonato-bicarbonato pH 9,6 0,06 M, sendo que 50 µl dessa solução foram colocados em cada poço das placas, as quais foram incubadas durante toda a noite a 4 °C. Após esse intervalo de tempo, as placas foram lavadas 3 vezes com PBS-T20 0,05% e, posteriormente, bloqueadas com PBS-T20 0,05%+M5% por 1 hora à temperatura ambiente, 200 µl por poço. As placas foram lavadas novamente 6 vezes com PBS-T20 0,05% e, a seguir, incubadas durante toda a noite a 4 °C com 50 µl por poço das amostras testes não-diluídas e as diluições da curva padrão. A curva foi feita com uma concentração inicial de 25 ng/ml com IL-12 recombinante e diluída em PBS-T20 0,05% + BSA 1%, em diluições seriadas com fator de diluição 2. Ao término da incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e 50 µl do anticorpo monoclonal anti-IL-12 (clone C15.6) biotilado, diluído 1:500 em PBS-T20 0,05% e M5% foram adicionados a cada poço e incubados por 1 hora a 37 °C. Ao término da incubação, as placas foram lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e incubadas por 1 hora a 37 °C com conjugado avidina-peroxidase do "kit" ABC (Vectstain, Vector, Burlingame, USA), 50 µl por poço. Após incubação por 1 hora a 37 °C, as placas foram novamente lavadas 6 vezes com PBS-T20 0,05% e incubadas por 10 a 15 min à temperatura ambiente em câmara escura com 50 µl em cada poço da substância reveladora. Essa substância foi preparada no momento do uso, consistindo de 5 mg de OPD em 12,5 ml de tampão citrato-fosfato pH 5,0 e 5 µl de H₂O₂ 30%.

A reação enzimática foi interrompida pela adição de 25 μ l de solução de H_2SO_4 2N. A leitura foi feita logo após a interrupção da atividade enzimática, em leitor de microplacas com filtro 492 nm (COLIGAN *et al*, 1991).

III.9 - DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO

Placas de plástico rígido de 96 poços foram utilizadas na dosagem do NO. As amostras testes não-diluídas e as diluições da curva padrão foram adicionadas a um volume de 50 μ l por poço. A curva padrão de NO foi feita com uma concentração inicial de 200 μ M/ml e em 11 diluições seriadas subsequentes com fator de diluição 2, até a concentração final de 0,195 μ M/ml. As amostras testes e as da curva padrão foram, a seguir, incubadas com o reagente de Griess. O reagente de Griess consistiu de uma solução de 2,5 ml de NEED (naftiletilenodiamina dihidroclorato) 2 vezes concentrado + 2,5 ml de sulfanilamida 2 vezes concentrada + 2,5 ml de H_3PO_4 5% + 2,5 ml de água destilada. Os reagentes foram misturados no momento do uso, sendo retirado o ar do frasco neste período. O NEED 2 vezes concentrado consiste de uma solução de NEED 0,1% + 0,05g de NEED + 25 ml de água destilada. A sulfanilamida 2 vezes concentrada consiste de uma solução de sulfanilamida 1% em H_3PO_4 5% + 0,5 g de sulfanilamida + 25 ml de H_3PO_4 5% (COLIGAN, 1994). A reação colorimétrica ocorreu imediatamente após a colocação do reagente de Griess e a leitura foi feita em leitor de microplacas com filtro de 540 nm.

III.10 - PARASITEMIA

O número de parasitas circulantes foi determinado no período de 7 a 90 dias, sendo a primeira observação realizada no sétimo dia após a inoculação das cepas, e sucessivamente a cada dois dias. As observações foram realizadas até duas semanas após não se encontrarem mais parasitas. Para estes experimentos, 5 μ l de sangue, obtidos por punção da calda do camundongo com auxílio de ponteiras e pipeta automática de 5 μ l, foram depositados sobre uma lâmina de microscópio e coberta com uma lamínula de 22 x 22 mm de modo a se obter uma camada delgada de sangue,

ocupando homogeneamente toda a superfície da lamínula (BRENER, 1961; ARIAS *et al*, 1988).

O número de *T. cruzi* circulante pode ser determinado em 5 μ l de sangue multiplicando-se o número de parasitas observado em 100 campos, pelo fator 35, segundo BRENER (1961).

III.11 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

A partir dos títulos codificados de anticorpos anti-hemácias de carneiro e gama total anti-*T. cruzi*, foi possível calcular as médias e os desvios-padrão dentre os grupos de soros dos animais que receberam as cepas de *T. cruzi* e/ou hemácias de carneiro. O teste “t” de Student foi utilizado para verificar o grau de significância entre as médias. O teste “t” de Student foi também utilizado para determinar a significância entre as curvas das dosagens de IgE, IgG1, IgG2a, citocinas e NO ao longo do período de 90 dias.

Entre as taxas de sobrevivência dos animais, foi usado como teste estatístico a análise da diferença entre duas percentagens.

Foram consideradas significativas, para todos os testes estatísticos, as diferenças que resultaram em $p \leq 0,01$.

V - RESULTADOS

RESULTADOS

IV.1 - RESULTADO DA INDUÇÃO DA IMUNODEPRESSÃO DE ANTICORPOS ANTI-ANTÍGENOS HETERÓLOGOS POR CEPAS DE *T. cruzi*

IV.1.1 - Produção de anticorpos anti-He em camundongos BALB/c infectados e não infectados com cepas de *T. cruzi*.

Hemácias de carneiro foram utilizadas como antígenos heterólogos na avaliação da imunodeficiência, durante a infecção experimental de camundongos BALB/c pelo *T. cruzi*. Para essa finalidade, foram utilizadas cepas com características de virulência diferentes, sendo escolhidas as cepas PF, SC38 e Y.

Na Figura 1, estão representados os resultados obtidos, expressos pela média dos títulos de anticorpos anti-hemácias de carneiro por grupo de camundongos BALB/c infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. O sistema de avaliação foi o método de hemaglutinação ativa. Todos os animais receberam uma concentração igual de He, sendo que os diferentes grupos de animais receberam inóculos variados de *T. cruzi*, dependendo da particularidade da cepa. De acordo com a análise estatística, os resultados demonstraram que as três cepas de *T. cruzi* são imunossupressivas, sendo o grau de imunossupressão variável ao longo dos 90 dias pós-inoculação. As amostras de soros controles negativos, oriundos de animais inoculados com salina, e de soros de animais inoculados apenas com as cepas de *T. cruzi*, apresentam resultados nulos ou com títulos abaixo de 4, por isso, não estão mostrados na figura.

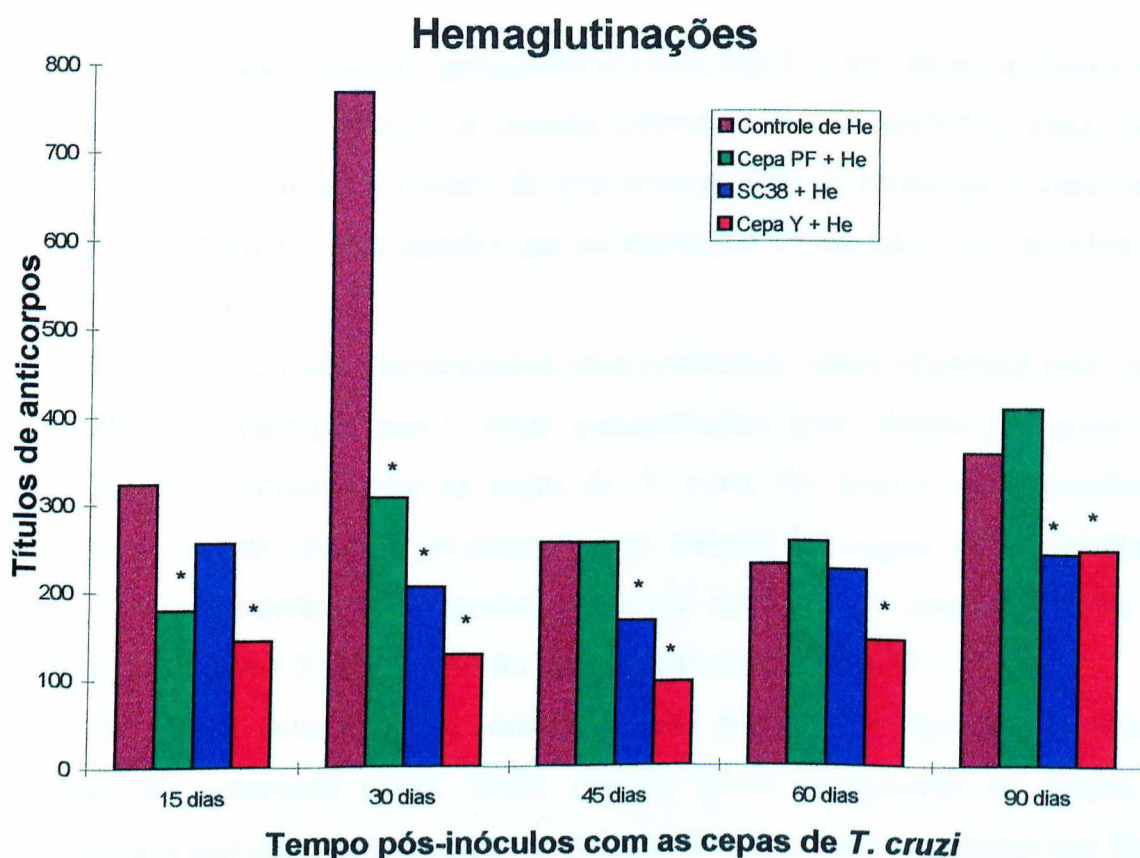


Figura 1. Títulos de anticorpos anti-hemácia de carneiro em camundongos BALB/c infectados com cepas de *T. cruzi*. O método de detecção de anticorpos foi a hemaglutinação ativa. Todos os animais receberam uma concentração de hemácias de carneiro (He) de 2×10^8 células. As colunas marrons mostram animais que só receberam He (grupo controle); as verdes mostram animais inoculados com 2×10^7 parasitas da cepa PF; as azuis mostram animais inoculados com 5000 parasitas da cepa SC38; e as vermelhas mostram animais inoculados com 100 parasitas da cepa Y. Os resultados representam a média por grupo sendo que análise estatística utilizada foi o teste “t” de Student (* $p \leq 0,01$ comparado com o grupo controle de He). Cut oof

IV.1.2 - Determinação dos níveis de anticorpos gamaglobulina total anti-*T. cruzi*.

Os perfis dos anticorpos gamaglobulina total anti-*T. cruzi* foram avaliados pelo método de ELISA, nos grupos de animais infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi* e que receberam igual inóculo de uma concentração de hemácias de carneiro de $2,5 \times 10^8$, comparados com aqueles que só receberam os inóculos com as diferentes cepas do parasita.

Na Figura 2, estão representados estes resultados, sendo expressos pela média dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* gamaglobulina total, dentro dos grupos de camundongos infectados com as cepas de *T. cruzi*. Os grupos de camundongos inoculados somente com He, ou somente com solução fisiológica, deram resultados nulos por isso não estão representados, o "cut-off" foi calculado apartir da média dos controles negativos + 3 desvios-padrão correspondendo ao título 20.

De acordo com a análise estatística, não houve diferença significativa na produção de anticorpos anti-*T. cruzi*, quando foram comparados os grupos de camundongos que receberam somente inoculação dos parasitas com aqueles que foram infectados e também receberam He.

Títulos de anticorpos anti-*T.cruzi* gamaglobulina total

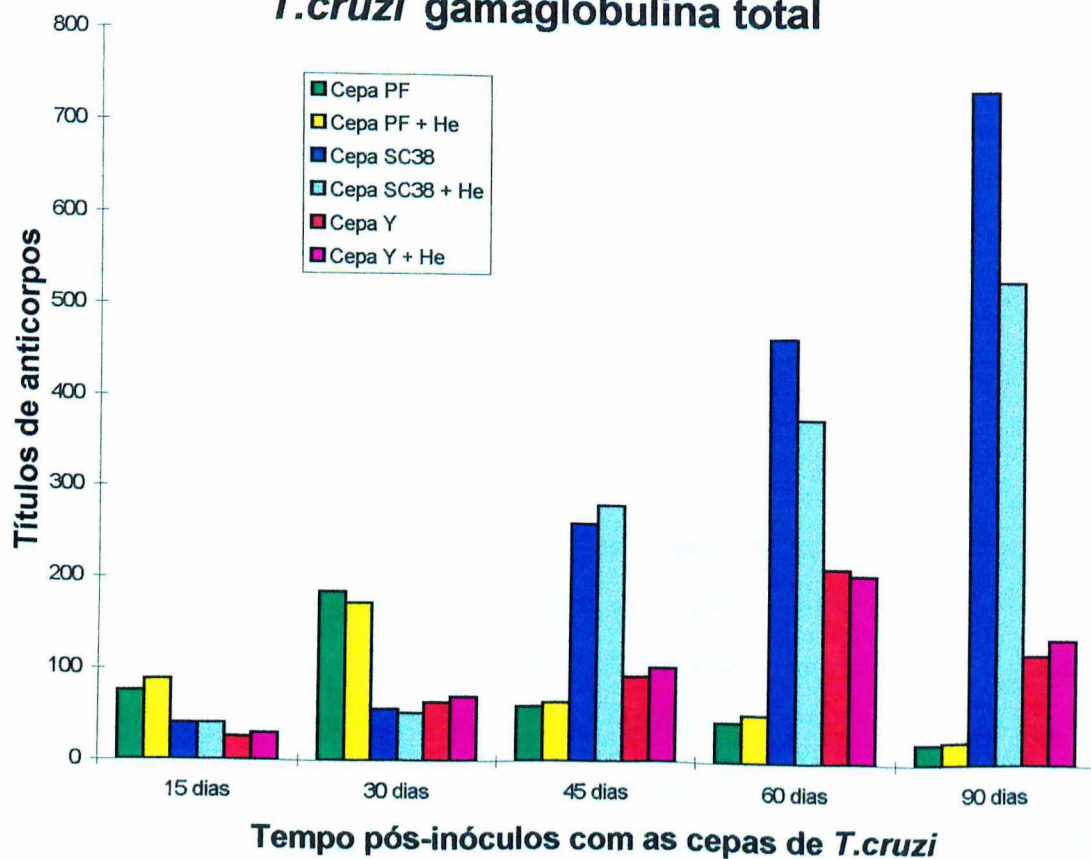


Figura 2. Determinação dos títulos de anticorpos gamaglobulina total anti-*T. cruzi*, avaliados pelo método de ELISA, em grupos de animais inoculados simultaneamente com hemácias de carneiro (He) e cepas de *T. cruzi* (colunas verde, azul escuro e vermelho) ou somente com as cepas de *T. cruzi* (colunas amarelo, azul claro e lilás). Os resultados representam as médias por grupo, as quais foram submetidas a análise estatística, utilizando-se o teste “t” de Student.

V.1.3 - Avaliação da produção de anticorpos anti-*T. cruzi* gamaglobulina total em camundongos BALB/c infectados com cepas de *T. cruzi* e/ou inoculados com He.

Nas Figuras 3 e 4, estão representados os resultados obtidos com a determinação da produção de anticorpos gamaglobulina total anti-*T. cruzi*, pelo método de ELISA, entre grupos de camundongos infectados com as diferentes cepas do parasita, dentro do grupo de animais inoculados com He ou sem He e os resultados são expressos pela média dos títulos de anticorpos anti-*T. cruzi*.

Para esta avaliação, a cepa PF de *T. cruzi*, definida como a de menor virulência, foi escolhida para se estabelecer um padrão comparativo entre as três cepas utilizadas neste trabalho.

Na Figura 3 pode ser observada uma significativa redução na produção de anticorpos anti-*T. cruzi* nos camundongos inoculados com a cepa Y e SC38, isso persiste até o trigésimo dia. A partir do quadragésimo quinto dia, ocorre uma significativa produção de anticorpos nos animais inoculados com a cepa SC38, enquanto que isto não ocorre nos animais infectados com a Y.

Na Figura 4, estão representados os títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* nos animais inoculados com He e com as cepas de *T. cruzi*. Semelhante aos resultados de produção de anticorpos representados na Figura 3, os animais infectados com a SC38 começam a elevar os títulos de anticorpos no quadragésimo quinto dia, mas, observa-se que diferentemente ocorre uma significativa elevação nos títulos de anticorpos nos animais infectados com a cepa Y.

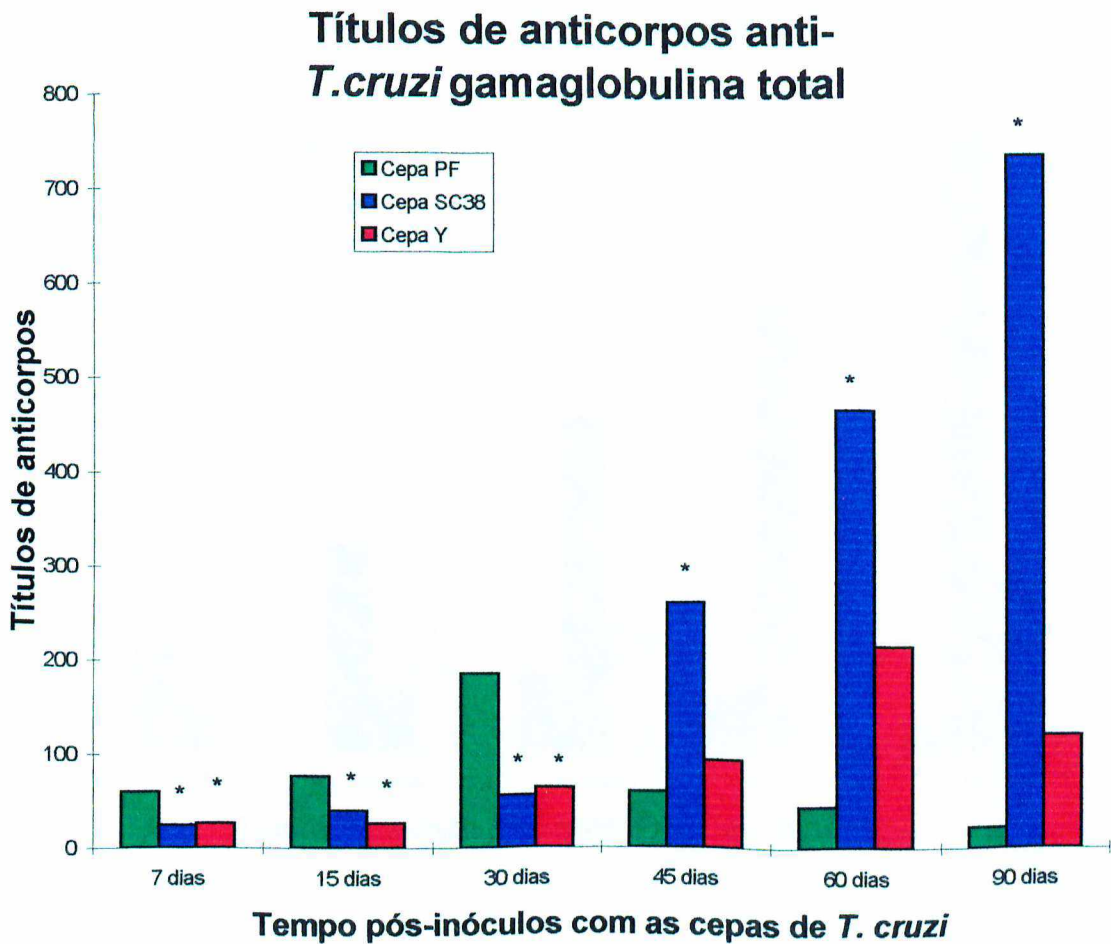


Figura 3. Títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* gamaglobulina total em soros de camundongos BALB/c inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi*; os anticorpos foram dosados pelo método de ELISA. Os resultados representam a média por grupo, sendo que a análise estatística utilizada foi o teste “t” de Student (* p≤0,01 comparado com o grupo da cepa PF).

Títulos de anticorpos anti-*T.cruzi* gamaglobulina total

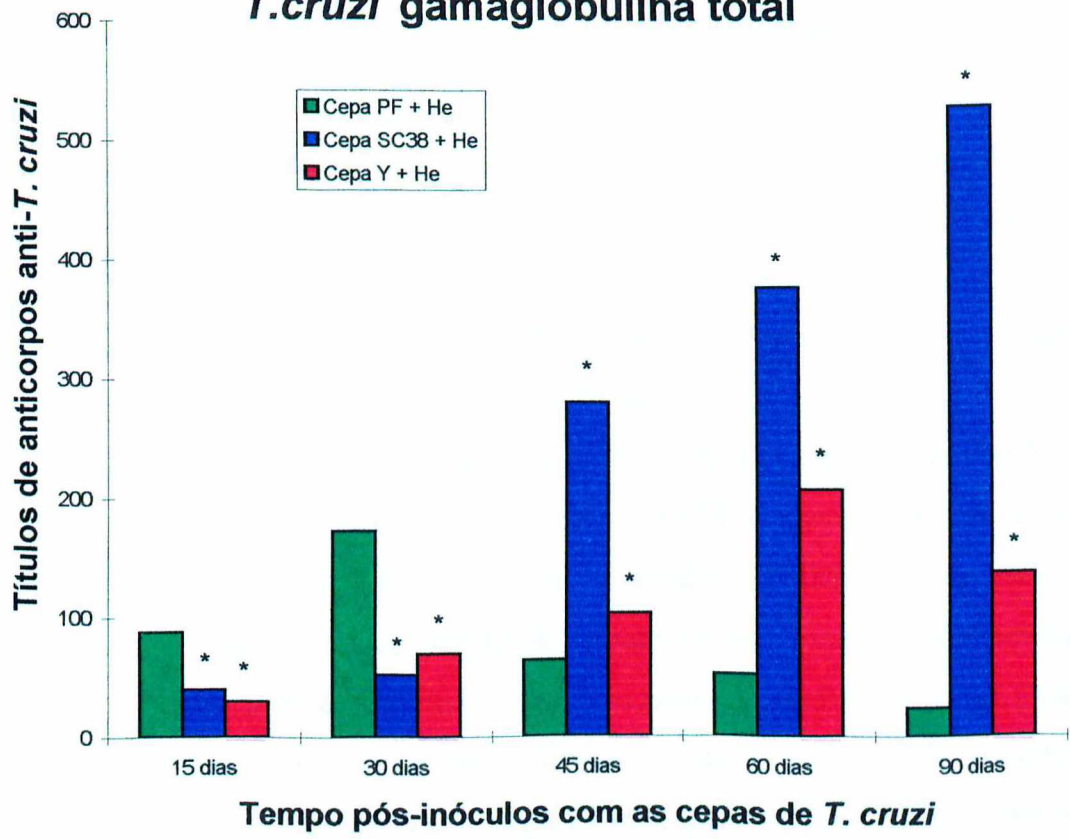


Figura 4. Títulos de anticorpos anti-*T. cruzi* gamaglobulina total em soros de camundongos BALB\c inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi* e com igual inóculo de uma solução de hemácia de carneiro; os anticorpos foram dosados pelo método de ELISA. Os resultados representam a média por grupo, sendo que a análise estatística utilizada foi o “t” de Student (* $p \leq 0,01$ comparado com o grupo de animais inoculados com a cepa PF de *T. cruzi* e hemácias de carneiro).

IV.2 - RESULTADO DAS DOSAGENS DE ANTICORPOS IgE, IgG1 E IgG2a EM CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE *T. cruzi*

As dosagens de anticorpos IgE, IgG2a e IgG1 foram realizadas com a finalidade de se verificar a cinética da produção destas moléculas durante a infecção experimental de camundongos BALB/c pelo *T. cruzi*. Como relatado na literatura, a produção desses anticorpos, especificamente de IgG2a, está relacionada com as atividades de Th₁, enquanto que a produção de IgE e IgG1, mais diretamente relacionada com as atividades de Th₂.

Os níveis de anticorpos foram determinados em “pool” de soros, avaliados pelo método de ELISA, durante os 90 dias de infecção.

A Figura 5, demonstra o perfil de anticorpos IgE específicos anti-*T. cruzi* no “pool” de soros entre grupos de camundongos BALB/c inoculados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. Os resultados estão representados em absorbâncias, sendo o “cut-off” de 0.178 equivalente as médias dos controles negativos + 3 desvios-padrão. A análise estatística da produção de IgE, entre os animais infectados com as cepas SC38 e a Y, não evidenciou diferença significativa na produção desta classe de anticorpos. O grupo de animais inoculados com a cepa PF não apresentou níveis detectáveis de IgE, sendo que média das absorbâncias apresentou valores abaixo do “cut-off”.

Na Figura 6, estão demonstrados os resultados obtidos com a dosagem de anticorpos IgG1 específicos anti-*T. cruzi* no “pool” de soros dos grupos de camundongos BALB/c inoculados com diferentes cepas do protozoário. Os resultados foram expressos em absorbância, sendo o “cut-off” de 0.149 representado pela média dos controles negativos + 3 desvios-padrão. A análise estatística destes resultados, evidenciou uma maior produção de anticorpos IgG1 no grupo Y e no SC38 quando comparado com a produção destes anticorpos pela cepa PF, mas não foi significativo no grupo da Y comparado com o SC38.

A Figura 7 representa as dosagens de anticorpos IgG2a anti-*T. cruzi* no “pool” de soros de grupos de camundongos BALB/c inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi*. Os resultados são representados pelas absorbâncias obtidas, sendo o “cut-off” de

0.156 representado pela média dos controles negativos + 3 desvios-padrão. A análise estatística do perfil de síntese deste isotipo, ao longo dos 90 dias, revelou uma maior produção de anticorpos IgG2a no grupo da cepa SC38 comparado com a da PF e Y. A produção destes anticorpos, no entanto, não foi significativamente diferente quando se compara os grupos de animais inoculados com as cepas Y e PF.

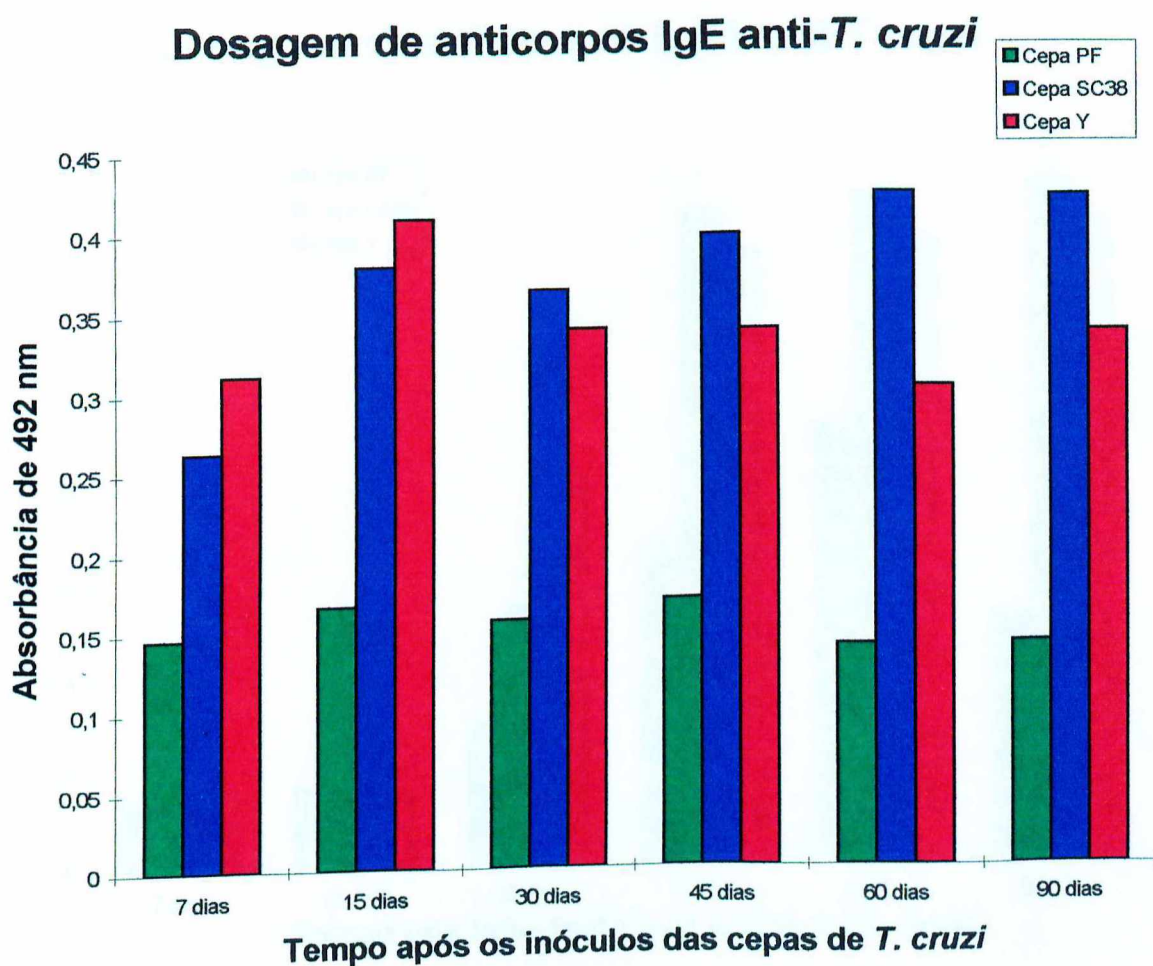


Figura 5. Dosagem de anticorpos específicos IgE anti-*T. cruzi* no “pool” de soros de grupos de camundongos BALB/c, inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi*. Os resultados representam a absorbância por “pool” de soros, sendo o “cut-off” de 0.178 representado pela média dos controles negativos + 3 desvios-padrão. A análise estatística utilizada foi “*t*” de Student entre as curvas.

Dosagens de anticorpos IgG1 anti-*T. cruzi*

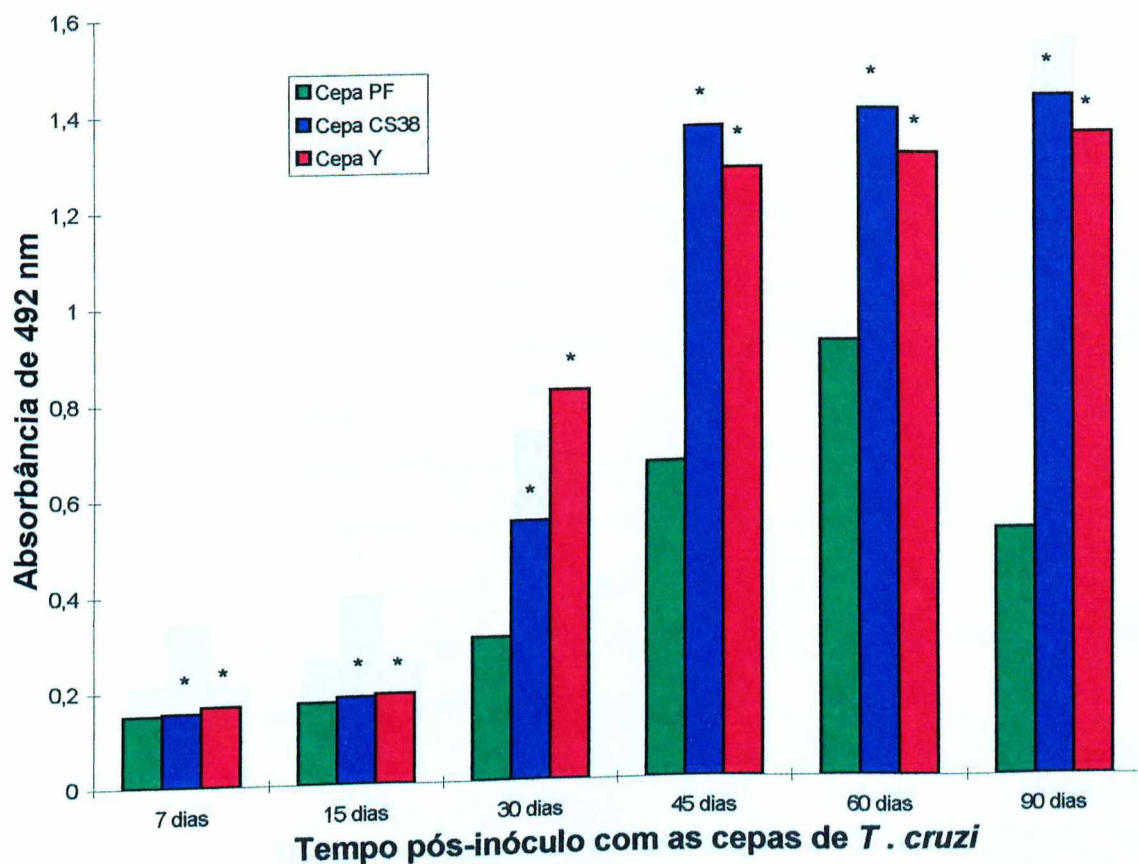


Figura 6. Dosagem de anticorpos IgG1 específicos anti-*T. cruzi* no “pool” de soros de grupos de camundongos BALB/c, inoculados com diferentes cepas de *T. cruzi*. Os resultados representam a absorbância por “pool” de soros, sendo o “cut-off” de 0.149 representado pela média dos controles negativos + 3 desvios-padrão. A análise estatística utilizada foi o teste “t” de Student entre as curvas (* $p \leq 0,01$ comparado entre os grupos de colunas da cepa Y e SC38 com a cepa PF).

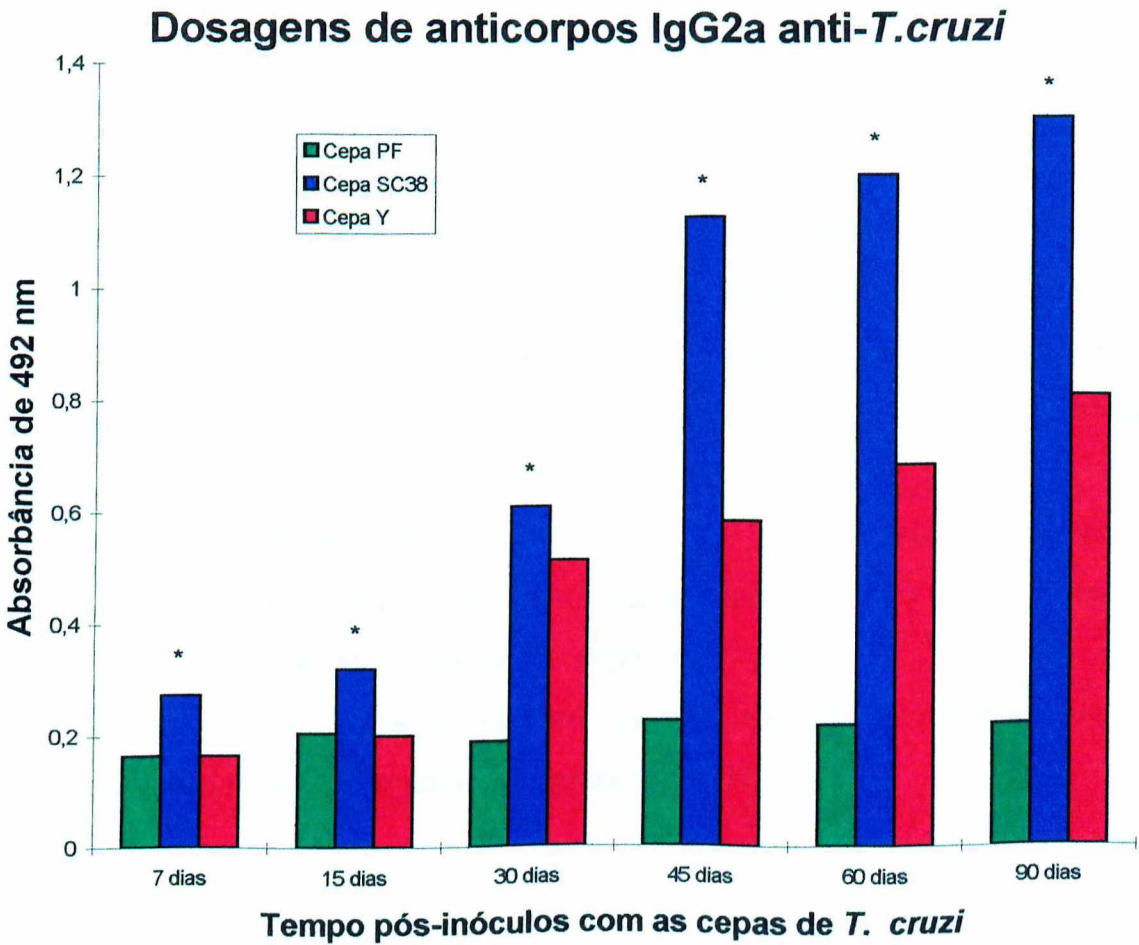


Figura 7. Dosagem de anticorpos específicos IgG2a anti-*T. cruzi* no “pool” de soros de grupos de camundongos BALB/c, inoculados com diferentes cepas de *T.cruzi*. Os resultados representam a absorbância por “pool” de soros, sendo o “cut-off” de 0.156 representado pela média dos controles negativos + 3 desvios-padrão. A análise estatística utilizada foi o teste “t” de Student entre as curvas (* $p \leq 0,01$ comparado entre os grupos de colunas).

IV.3 - DETERMINAÇÃO DO PERFIL DE CITOCINAS EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE ESPLÊNÓCITOS, ORIUNDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE *T. cruzi*

IV.3.1 - Resultados da dosagem de IL-4

Os níveis de IL-4 foram evidenciados pelo método de ELISA em sobrenadantes de cultura de esplenócitos oriundos de grupos de camundongos BALB/c, infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. Estas células foram cultivadas somente com o meio ou estimuladas com o mitógeno Con-A ou antígeno solúvel de cada cepa. A produção dessa citocina não foi expressiva no decorrer dos 90 dias. A Tabela 1 representa esses resultados.

A análise estatística da produção de IL-4 nos sobrenadantes de cultura, não mostrou significativa diferença entre as células estimuladas com a Con-A dentro dos grupos de camundongos infectados com as cepas de *T. cruzi*.

Com as células cultivadas somente em meio não foi encontrado IL-4, e no estímulo antigênico só foi encontrado no grupo da SC38.

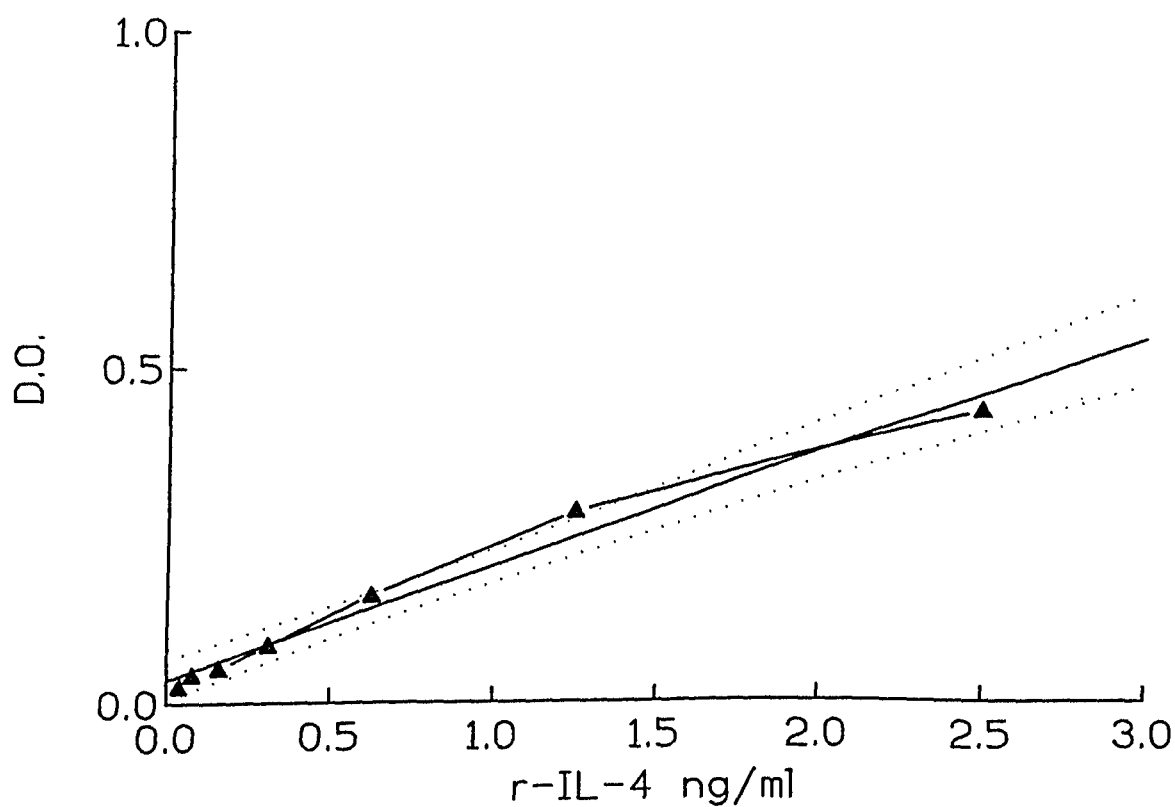


Figura 8. Curva padrão de IL-4 recombinante estabelecida pelo método de ELISA com o emprego de anticorpos monoclonais anti-IL-4. Regressão linear com $p < 0,0001$ e $r = 0,9$.

V.3.3 - Resultados da dosagem de IL-10

Os níveis de IL-10 foram evidenciados pelo método de ELISA em sobrenadantes de cultura de esplenócitos oriundos de grupos de camundongos BALB/c, infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. Estas células foram estimuladas em cultura com o mitógeno Con-A, antígeno solúvel de cada cepa ou cultivadas somente com o meio.

A Tabela 2 representa os resultados da detecção desta citocina no decorrer dos 90 dias. Observou-se níveis variáveis de produção de IL-10 quando os esplenócitos foram estimulados em cultura com o mitógeno Con-A ou antígeno solúvel de cada cepa, diferentemente dos esplenócitos cultivados somente em meio, onde sistematicamente não foi encontrado níveis detectáveis de IL-10.

A análise estatística dos resultados relativos a detecção de IL-10 nos sobrenadantes de cultura, não mostrou diferença significativa na produção desta citocina entre os grupos estimulados com o antígeno Y comparado com SC38, mas foi significativa a diferença da SC38 e Y comparados com a PF.

Nas células cultivadas em presença de Con-A, houve significativa diferença na produção de IL-10 no grupo da SC38 comparada com a da Y, mas não houve diferença quando comparada com a da PF. Em presença de Con-A, também não houve diferença significativa na produção de IL-10 quando comparados os grupos de animais inoculados com a cepa Y e a cepa PF.

A análise dos dados individualizados da produção de IL-10, no decorrer dos 90 dias, indica que no grupo Y essa citocina tem seu maior pico de produção no 7º dia após o inóculo, comparados com as cepas SC38 e PF, e após esse período ocorre uma inversão na produção de IL-10 que começa a subir no grupo SC38, tendo seu maior pico no 30º dia e mantendo esses níveis até o 90º dia, se comparado com os grupos PF e Y, e isso ocorre tanto no estímulo antigênico como no estímulo com Con-A. Com a cepa PF, a produção de IL-10 nos esplenócitos estimulados com antígeno solúvel foi fraca mais teve uma boa produção no estímulo com a Con-A, sendo a análise dos

dados individualizados se comportou semelhantemente ao grupo SC38, com pico no 30° dia e manutenção de níveis elevados até o 90° dia.

TABELA 2. Produção de IL-10 por grupos de esplenócitos (5×10^6 células por ml de meio RPMI-1640 + 10% SFB), em sobrenadantes de cultura e em duplicata, de camundongos fêmeas BALB/c infectados com as cepas de *T. cruzi* PF, SC38 e Y. As células foram estimuladas com Con-A, ou 30 µg de extrato solúvel antigênico das cepas PF ou Y ou SC38, ou cultivados apenas em meio RPMI-1640 + 10% SFB. Os esplenócitos foram utilizados em "pool" de células de dois animais, sacrificados por grupo de cepa, nos dias 7, 15, 30, 45, 60, 90 após os inóculos. No dia "0" representam os animais controles, não infectados. Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após os estímulos.

Dias	Infecção com cepa								
	Y			SC38			PF		
	IL-10 (ng/ml)			IL-10 (ng/ml)			IL-10 (ng/ml)		
	Meio	Ag	Con-A	Meio	Ag	Con-A	Meio	Ag	Con-A
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0	2,3	2,6	0	0,8	4,4	0	0	0,3
15	0	1,6	2,3	0	1,7	4,0	0	0,8	3,0
30	0	1,0	2,0	0	4,6	5,9	0	0	3,8
45	0	1,8	3,0	0	3,8	3,7	0	0	3,8
60	0	1,4	2,4	0	2,7	3,9	0	0	3,5
90	0	1,5	2,6	0	3,6	4,0	0	0	3,6

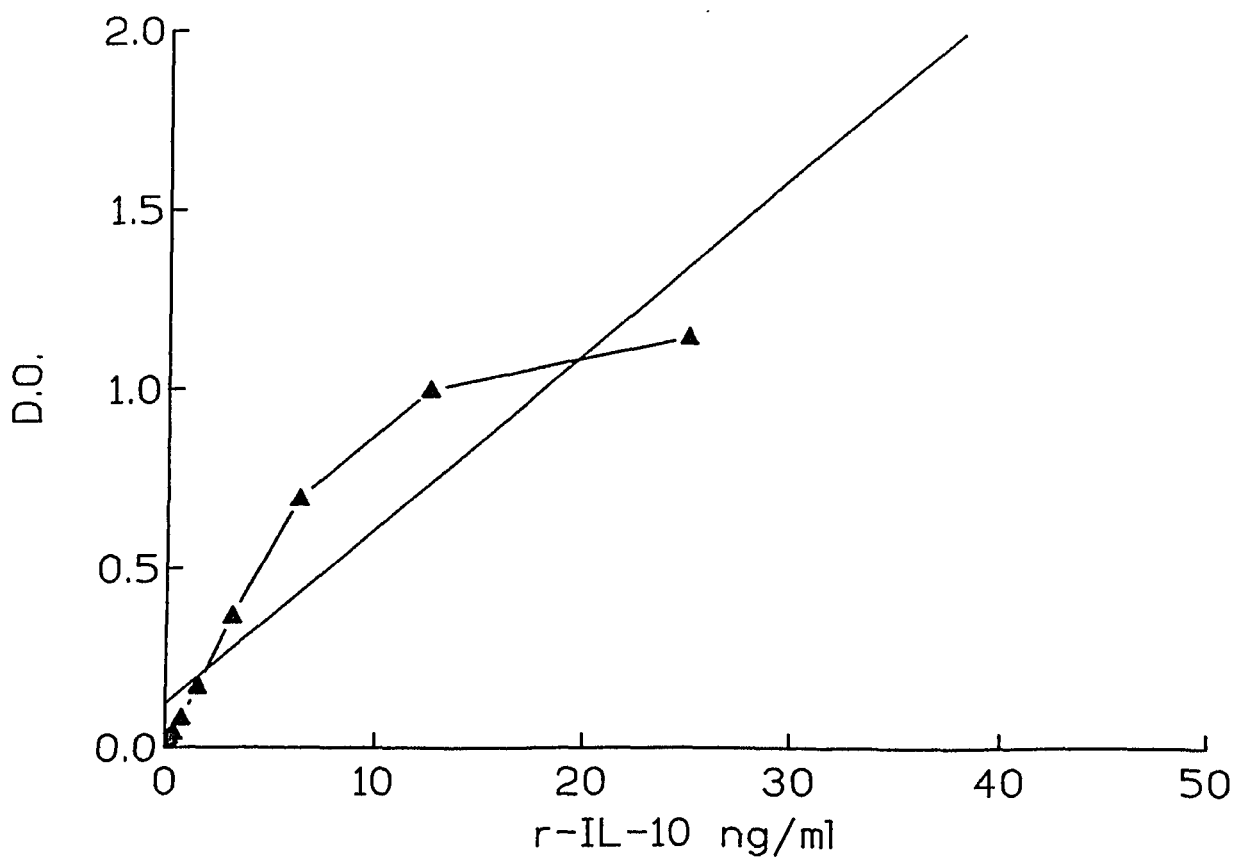


Figura 9. Curva padrão de IL-10 recombinante estabelecida pelo método de ELISA com o emprego de anticorpos monoclonais anti-IL-10. Regressão linear com $p < 0,0004$ e $r = 0,8$.

IV.3.2 - Resultados da dosagem de IFN- γ

A Tabela 3 representa os resultados da dosagem de IFN- γ no período de 0 a 90 dias, evidenciados pelo método de ELISA, em sobrenadantes de cultura de esplenócitos oriundos de grupos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. As células foram estimuladas em cultura com Con-A, ou com antígenos de cada cepa ou só com o meio.

A análise estatística da produção de IFN- γ , nos sobrenadantes de cultura, não mostrou diferença significativa nos níveis de produção desta citocina entre os grupos de esplenócitos, cultivados com meio somente ou estimulados com os antígenos solúveis de cada cepa de *T. cruzi* ou Con-A.

Na análise dos dados tomados de uma forma individualizada pode-se observar que os esplenócitos cultivados apenas com o meio apresentou uma maior produção de IFN- γ nos grupos PF e Y comparados com o grupo da SC38, isso ocorreu no 7º dia para PF e no 7º e 15º para o grupo Y, sendo que o 15º dia foi o de maior produção dessa citocina. Com o grupo SC38 e com a presença somente do meio de cultura, a produção de IFN- γ tem início no 30º dia subindo gradativamente até o 90º dia o qual é seu maior pico. Nos esplenócitos estimulados com antígeno solúvel ou Con-A houve uma homogeneidade na produção do IFN- γ nos grupos Y e SC38. Com o grupo PF durante os estímulos com o antígeno, em dados individualizados, pode ser observado uma menor produção de IFN- γ , comparado com o grupo Y e SC38.

TABELA 3. Produção de IFN- γ por grupos de esplenócitos (5×10^6 células por ml de meio RPMI-1640 + 10% SFB), em sobrenadantes de cultura e em duplicata, de camundongos fêmeas BALB/c infectados com as cepas de *T. cruzi* PF, SC38 e Y. As células foram estimuladas com Con-A, ou 30 μ g de extrato solúvel antigênico das cepas PF ou Y ou SC38, ou cultivados apenas em meio RPMI-1640 + 10% SFB. Os esplenócitos foram utilizados em "pool" de células de dois animais, sacrificados por grupo de cepa, nos dias 7, 15, 30, 45, 60, 90 após os inóculos. No dia "0" representam animais controles, não infectados. Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após os estímulos.

Dias	Infecção com cepa								
	Y ^Y			SC38 ^Y			PF ^Y		
	IFN- γ (U/ml)			IFN- γ (U/ml)			IFN- γ (U/ml)		
	Meio	Ag	Con-A	Meio	Ag	Con-A	Meio	Ag	Con-A
0	0	0	9,3	0	0	9,3	0	0	9,3
7	16,0	92,5	91,5	0	89,4	91,2	15,2	50,2	84,2
15	23,9	83,0	95,0	0	90,5	93,5	0	19,8	91,5
30	0	63,2	84,5	1,2	74,5	90,1	0	25,6	83,0
45	0	82,0	91,5	1,5	64,7	79,6	0	28,0	92,0
60	0	72,0	82,0	1,8	75,3	92,0	0	46,0	92,0
90	0	81,0	86,0	2,0	84,0	93,5	0	65,9	92,5

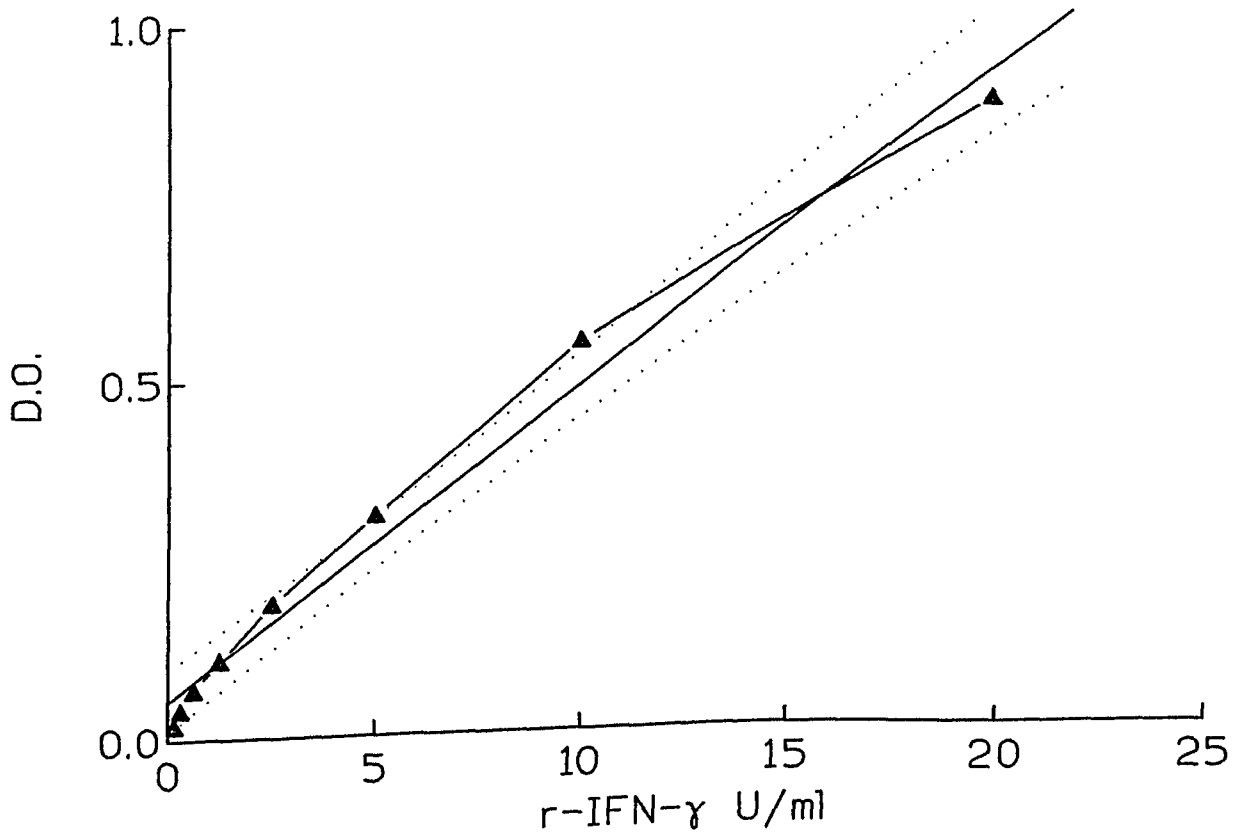


Figura 10. Curva padrão de IFN- γ recombinante estabelecida pelo método de ELISA com o emprego de anticorpos monoclonais anti- IFN- γ . Regressão linear com $p < 0,0001$ e $r = 0,9$.

IV.3.4 - Resultados da dosagem de IL-12

Embora tenha sido dosada em duplicata no sobrenadante de cultura de esplenócitos oriundos de camundongos BALB/c infectados com as cepas de *T. cruzi* PF, SC38 e Y, cultivados com os respectivos antígenos de criólise de cada cepa, com Con-A ou em meio, os resultados obtidos evidenciaram níveis não detectáveis desta citocina nas condições estabelecidas para a cultura destas células.

IV.4 - RESULTADO DA DOSAGEM DE ÓXIDO NÍTRICO EM SOBRENADANTES DE CULTURA DE ESLENÓCITOS, ORIUNDOS DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE *T. cruzi*

Na Tabela 4 são mostrados os resultados com a dosagem de NO, realizada pelo método de Griess, em sobrenadantes de cultura de esplenócitos oriundos de grupos de camundongos BALB/c infectados com as cepas de *T. cruzi*, no decorrer de 90 dias. Os esplenócitos foram estimulados em cultura com Con-A, ou com antígenos de extrato solúvel de cada cepa ou cultivados só com o meio.

Não houve produção detectável de NO no grupo PF em nenhuma das condições experimentais estabelecidas. Quando os esplenócitos não foram estimulados, os níveis de NO não foram também detectáveis no grupo SC38, no entanto, quando estimulados com antígeno solúvel, detectou-se níveis inicialmente baixos que foram uniformemente crescentes nos esplenócitos provenientes de animais com diferentes períodos pós-infecção. A análise estatística da curva durante os 90 dias, não mostrou diferença significativa da produção de NO entre os grupos Y e SC38 quando estimulados com Con-A ou antígeno.

No grupo Y, quando as células não foram estimuladas, observou-se níveis detectáveis de NO nos períodos iniciais pós-infecção, sendo particularmente elevados no 15º dia, para se tornarem não-detectáveis a partir do 30º dia pós-infecção.

Quando estimuladas com antígenos solúveis, a produção de NO no grupo Y revelou que, os níveis são maiores do sétimo ao décimo quinto dias, sendo este último com o maior pico. No grupo SC38, com o estímulo antigênico, a produção de NO tem início no sétimo dia, subindo gradativamente e tendo seu maior pico no nonagésimo dia. Com o estímulo de Con-A a produção de NO no grupo Y ocorreu do sétimo ao décimo quinto dia, sendo menos expressiva comparado com o estímulo antigênico ou só em meio, e da mesma forma com o grupo SC38, a produção de NO também foi pouco expressiva, mantendo um nível basal até o nonagésimo dia.

TABELA 4. Produção de "NO" (óxido nítrico) por grupos de esplenócitos (5×10^6 células por ml de meio RPMI-1640 + 10% SFB), em sobrenadantes de cultura e em duplicata, de camundongos fêmeas BALB/c infectados com as cepas de *T. cruzi* PF, SC38 e Y. As células foram estimuladas com Con-A, ou 30 μ g de extrato solúvel antigênico das diferentes cepas, ou cultivados apenas em meio RPMI-1640 + 10% SFB. Os esplenócitos foram utilizados em "pool" de células de dois animais, sacrificados por grupo de cepa, nos dias 7, 15, 30, 45, 60, 90 após os inóculos. No dia "0" representam os animais controles, não infectados. Os sobrenadantes foram coletados 48 horas após os estímulos.

Dias	Infecção com cepa								
	Y			SC38			PF		
	NO (μ M/ml)			NO (μ M /ml)			NO (μ M /ml)		
	Meio	Ag	Con-A	Meio	Ag	Con-A	Meio	Ag	Con-A
0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
7	0,73	6,2	8,5	0	0,5	0,5	0	0	0
15	16,2	20,0	6,3	0	1,5	1,7	0	0	0
30	0	0	0	0	3,2	1,7	0	0	0
45	0	2,3	0,6	0	3,8	0	0	0	0
60	0	1,4	0	0	3,5	0,4	0	0	0
90	0	6,4	0	0	4,0	1,0	0	0	0

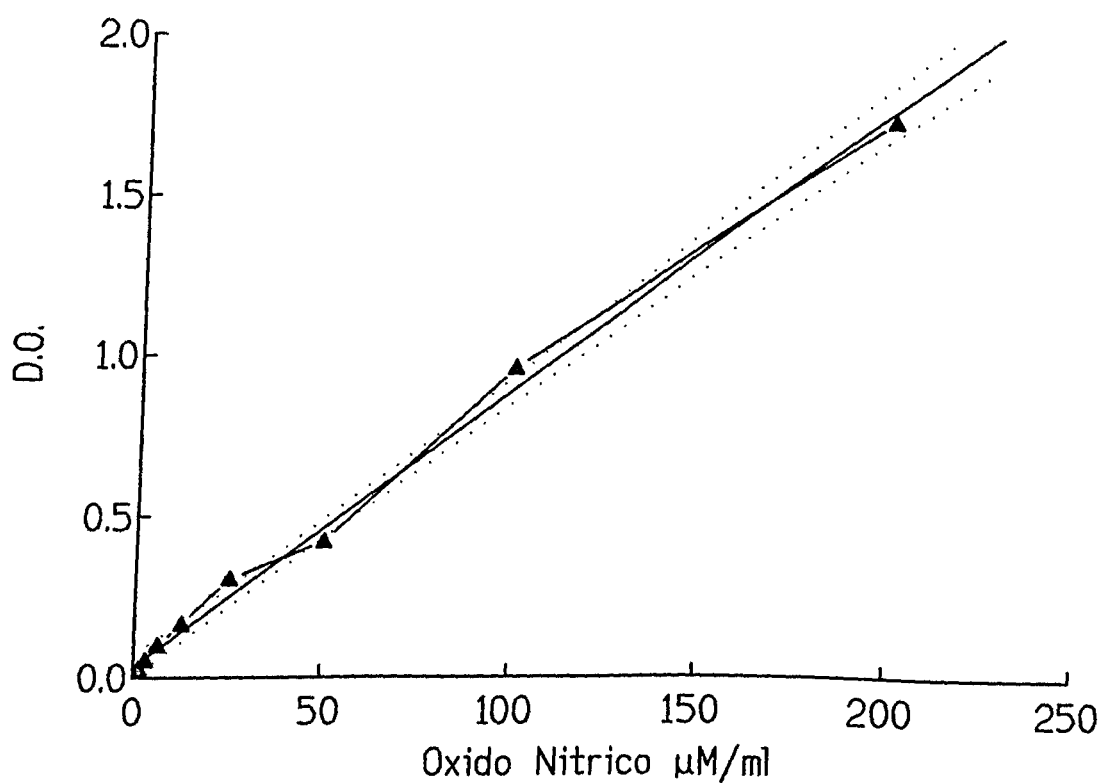


Figura 11. Curva padrão de NO estabelecida pelo método de Griess. Regressão linear com $p < 0,0001$ e $r = 0,9$.

IV.5 - PARASITEMIA DE CAMUNDONGOS BALB/c INFECTADOS COM CEPAS DE *T. cruzi*

A Figura 12 apresenta os resultados obtidos na determinação da curva de parasitemia de camundongos BALB/c utilizados nos experimentos de dosagem de IgE, IgG1 e IgG2a. Observa-se a presença evidente de um perfil diferencial relacionado ao número de parasitas circulantes, nos camundongos infectados com a cepa SC38 em relação aos infectados com a Y, no decorrer dos 90 dias. Pôde ser demonstrado que há um deslocamento no pico da parasitemia da SC38, que ocorreu no vigésimo sétimo dia após a infecção, em relação a Y, onde o pico de parasitemia ocorreu no nono dia. A cepa PF não é demonstrada porque não induziu parasitemia.

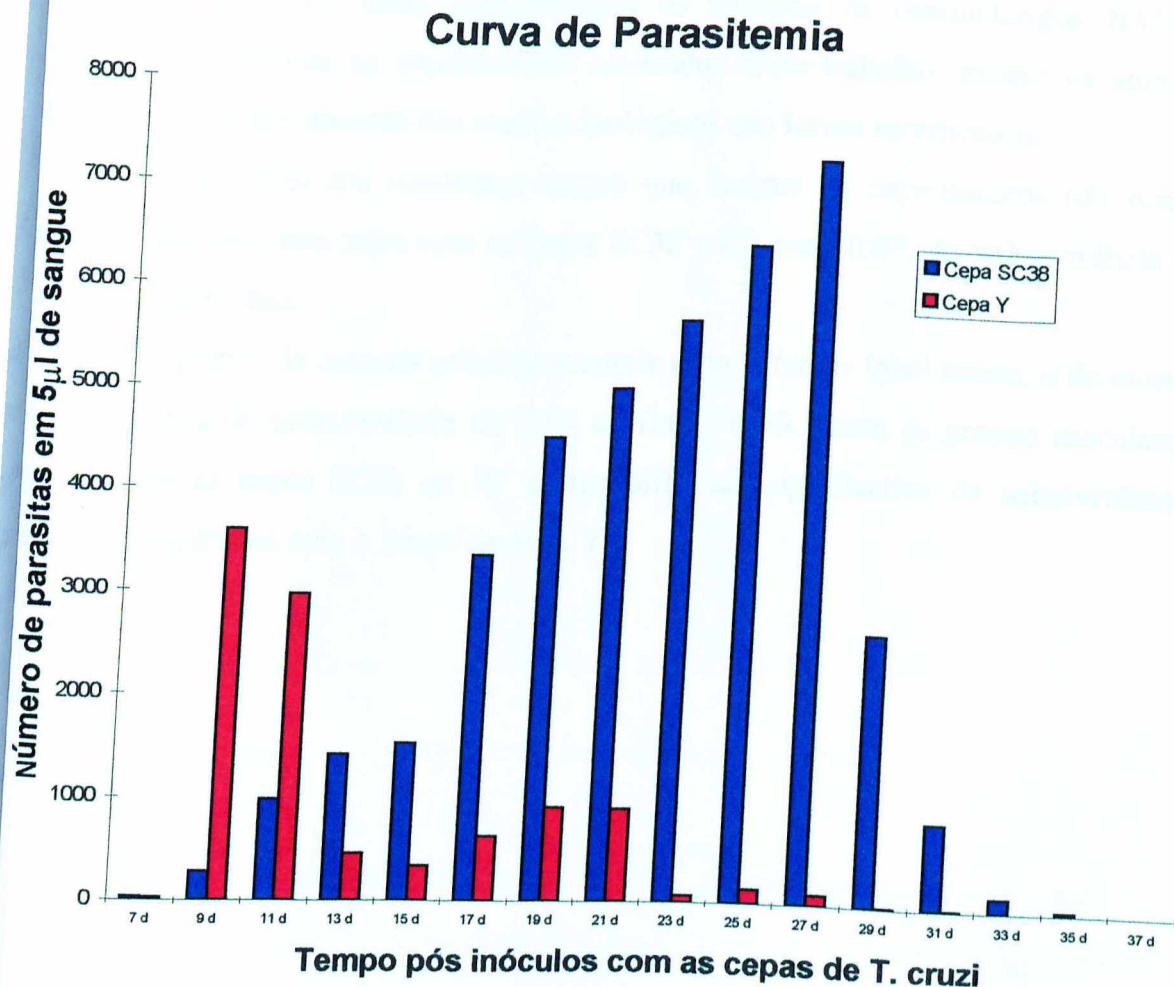


Figura 12. Curva de parasitemia de camundongos BALB/c Infectados com as cepas de *T. cruzi* Y (colunas vermelhas) e cepa SC38 (colunas azuis). Os parasitas não foram encontrados a partir do trigésimo sétimo dia, sendo que foi efetuada a parasitemia até o quadragésimo dia; nesse período, não foi encontrado a presença de parasitas tanto nos camundongos infectados com a cepa Y como nos infectados com a cepa SC38. Os resultados nulos do dia 37 até o dia 49 não estão demonstrados na figura.

V.6 - SOBREVIVÊNCIA DE CAMUNDONGOS BALB/c DURANTE OS EXPERIMENTOS

Na Figura 13, estão representados os números de camundongos BALB/c sobreviventes durante os experimentos realizados neste trabalho, exceto os animais utilizados nos experimentos dos ensaios biológicos que foram sacrificados.

A observação dos resultados mostra que durante os experimentos não houve morte de animais infectados com as cepas SC38 e PF, com 100% de sobrevivência no decorrer dos 90 dias.

Nos grupos de animais infectados com a cepa Y houve igual números de mortes com uma taxa de sobrevivência de 20% ao final de 90. Entre os grupos inoculados apenas com as cepas SC38 ou PF houve diferença significativa da sobrevivência, quando comparados com o grupo da cepa Y.

Taxa de sobrevivência de camundongos BALB/c durante os experimentos

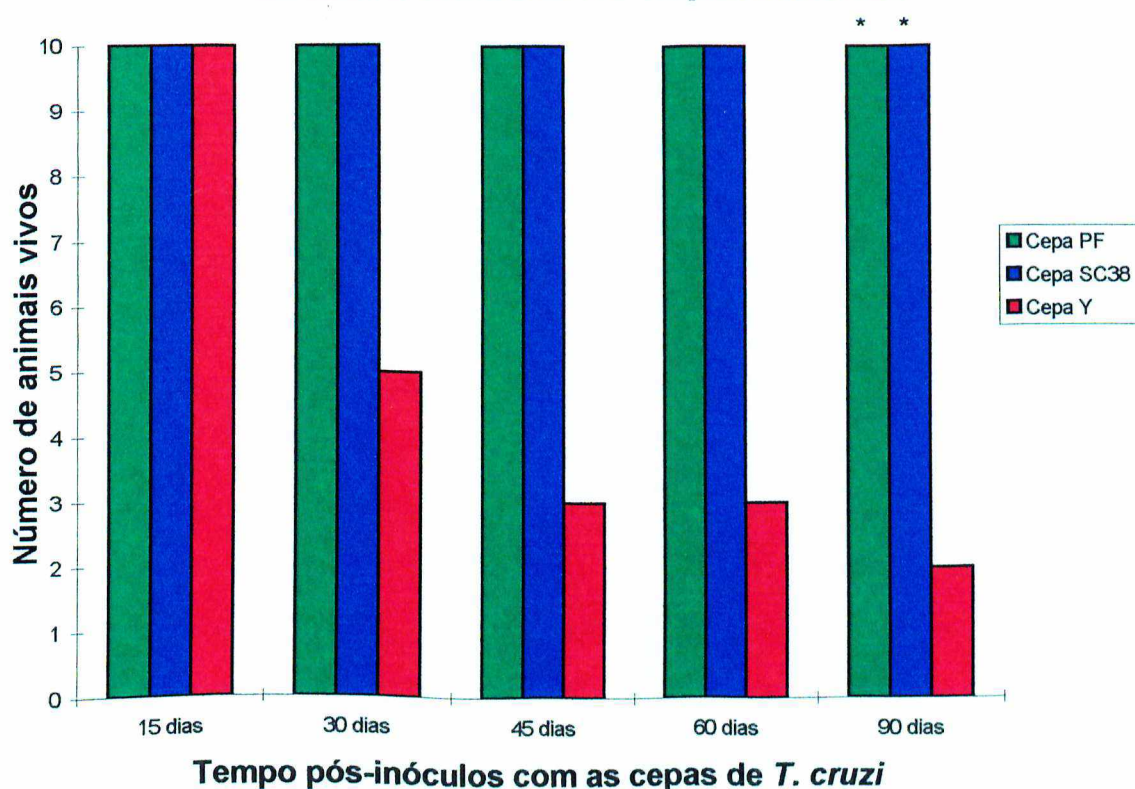


Figura 13. Número de animais sobreviventes durante os 90 dias dos experimentos de inóculos com as diferentes cepas *T. cruzi* em camundongos fêmeas BALB/c. A análise estatística utilizada foi a diferença entre duas percentagens (* $p \leq 0,01$ comparado, no nonagésimo dia, entre a coluna da cepa SC38 e PF com a coluna da cepa Y).

V - DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

No decorrer deste trabalho, procurou-se observar modificações nas respostas imunológicas desencadeadas, quando da infecção experimental de camundongos BALB/c com diferentes cepas de *T. cruzi*, dando enfoque para as características parasitárias de cada cepa. Foram utilizadas as cepas PF (avirulenta), SC38 (média virulência) e Y (alta virulência).

Trabalhos de MENEZES (1968) e RIBEIRO DOS SANTOS (1973) demonstraram que a cepa PF é uma cepa avirulenta, originada da cepa Y após sucessivas passagens em meio LIT. STEINDEL (1993), após ter isolado das fezes de triatomíneos uma cepa de *T. cruzi*, a qual foi denominada SC38, mostrou que, por suas características parasitárias, tinha média virulência. SILVA & NUSSENZWEIG (1953) obtiveram uma cepa a partir da realização do xenodiagnóstico em um paciente chagásico e pela característica de induzir alta mortalidade em camundongos brancos, foi designada de alta virulência e denominada cepa Y.

A virulência é tomada como parâmetro de atividade imunossupressiva em muitos trabalhos utilizando-se animais infectados com tripanosomatídeos. ALBRIGHT *et al.* (1981) verificaram que o grau de virulência de clones *T. brucei brucei* promovia imunossupressão. SACKS *et al.* (1980), trabalhando com *T. musculi*, obtiveram resultados similares. Com *T. cruzi*, os resultados obtidos com imunossupressão são restritos ao parasita, não tendo sido até o presente levado em consideração a diversidade das cepas.

CORSINI *et al.* (1981) demonstraram resultados de imunodeficiência em camundongos da linhagem BALB/c, observados num período de 20 dias após a infecção pela cepa Y. REED *et al.* (1984) e REED *et al.* (1989), estudando a imunossupressão induzida pelo *T. cruzi*, observaram que essa imunossupressão afetava a produção de anticorpos dirigidos a antígenos heterólogos.

Utilizando como parâmetro a produção de anticorpos para antígenos heterólogos, em particular anti-hemácias de carneiro, observou-se no presente trabalho que a característica de virulência da cepa é fator importante na determinação do

processo imunossupressivo. Dessa maneira, os camundongos infectados com a cepa Y apresentaram imunossupressão durante todo o período de 90 dias. Com a cepa SC38, a imunossupressão apresentou graus variados durante os 90 dias, não sendo imunossupressiva no décimo quinto e septuagésimo dia. Com a cepa PF, a atividade imunossupressiva ocorreu até o trigésimo dia após o inóculo.

Entre os grupos de animais que receberam inóculos das cepas do *T. cruzi* e aqueles que também foram inoculados com hemácia de carneiro não foi evidenciado disparidade na produção de anticorpos anti-*T. cruzi* gamaglobulina total.

A produção de anticorpos anti-*T. cruzi* entre os animais que receberam a Y ou SC38 com os animais que receberam PF foi comparada dentro de cada grupo com ou sem inóculo de antígeno heterólogo. Observou-se que, no grupo de animais que receberam He, houve maior produção de anticorpos anti-*T. cruzi* nos grupos Y e SC38 quando comparados com o da PF.

BOUHDIDI (1994) demonstrou que a produção de anticorpos anti-*T. cruzi* durante a infecção experimental de camundongos BALB/c, induzia hipergamaglobulinemia com elevados níveis de IgM, IgG2a e IgE. Essa produção elevada de anticorpos tem início na fase aguda com anticorpos classe IgM e persiste durante a fase crônica, quando o nível das imunoglobulinas retorna a seus valores normais, excetuando-se a IgE.

Segundo TAKEHARA (1981) e BOUHDIDI (1994) demonstraram que a imunidade produzida por anticorpos IgG2a, IgG2b e IgG1 é mais efetiva do que por IgM. Durante a fase crônica, 70% dos anticorpos são do tipo IgG2a e 10% do tipo IgG1, sendo que esses últimos teriam alta avidéz, determinando o curso da infecção.

No presente trabalho, foi enfatizada a produção dos anticorpos IgG1, IgG2a e IgE por dois motivos. O primeiro é que a presença significativa de anticorpos IgG1 e IgG2a indicam um possível mecanismo de controle da infecção, e o segundo é que a predominância de IgG1 e IgE está relacionada a atividade de linfócitos Th₂ (PURKERSON, 1992) e IgG2a, relacionada com a atividade de Th₁ (MORRIS, 1994).

Os resultados obtidos demonstram que houve produção em níveis detectáveis de IgE anti-*T. cruzi* nos animais que foram inoculados com a cepa Y ou com SC38,

indicando que ambas as cepas ativam o subclone Th_2 . Com os animais inoculados com a PF, os resultados indicaram que não houve produção de IgE em níveis detectáveis.

Os resultados da produção de IgG1, específicos anti-*T. cruzi* foram observados em todos os grupos de animais inoculados com as cepas, com maior produção desta sub-classe de anticorpos nos grupos Y e SC38. No grupo de animais inoculados com a PF, a produção de IgG1 foi significativamente menor comparada com as outras cepas. A partir desses dados, pode-se deduzir que as 3 cepas estudadas podem ativar, em graus variados, os subpopulações de linfócitos Th_2 , sendo esta ativação mais expressiva com as cepas Y e SC38.

Como sabemos, a resposta imune é a expressão de complexos mecanismos sobreponíveis, resultantes da ativação de redes de diferentes clones celulares. Portanto, uma participação direta e isolada dos anticorpos dos isotipos IgG1 e IgE no controle da infecção pelo *T. Cruzi* é discutível. Parece ser importante a presença destes anticorpos com a cepa SC38, já que, ao final dos 90 dias, 100% dos animais sobreviveram. Por outro lado, a simples presença destes anticorpos no grupo de animais inoculados com a cepa Y parece não fazer muita diferença, pois a infecção segue seu curso levando a morte 80% dos animais no período de 90 dias. Com a cepa PF, os resultados são pouco esclarecedores, embora a presença de IgG1 indique uma possível participação desses anticorpos no processo de proteção. Em trabalhos realizados por MENEZES (1968) ficou demonstrado a proteção conferida pela PF em animais infectados com a Y, embora não tenha sido estabelecido nenhuma relação a um isotipo em particular.

Os resultados referentes a dosagem de anticorpos específicos IgG2a anti-*T. cruzi*, mostram que houve maior produção de IgG2a nos animais que foram inoculados com a cepa SC38 comparados com aqueles que receberam a cepa Y ou PF. Isso indica que a cepa SC38 também induz subpopulações de linfócitos do tipo Th_1 com mais expressividade do que as cepas Y ou PF. E que, a presença de anticorpos IgG2a em maiores níveis, de acordo com os trabalhos de BOUHDIDI (1994), também indica um provável mecanismo de controle da infecção.

De acordo com MOSMANN & SAD (1996), os linfócitos Th_1 e Th_2 são subpopulações dos $LTCD4^+$ que produzem determinadas citocinas quando estimulados.

Os linfócitos Th₁ têm como perfil de secreção as citocinas IFN- γ , IL-2 e linfotoxinas, enquanto os linfócitos Th₂ apresentam o perfil secretório de IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-10.

JANKOVIC & SHER (1996) descrevem que, em geral, o parasitismo intracelular é associado a dois perfis de citocinas, a do tipo 1 as quais seriam IL-2, IFN- γ e TNF- β e, as tipo 2, que seriam IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10 e IL-13. Já em parasitas como helmintos haveria uma predominância de citocinas do tipo 2. Assim, um possível mecanismo levando ao controle da infecção parasitária passaria por forte indução da produção de citocinas do tipo 1, do tipo 2 ou de ambas.

REINER & LOCKSLEY (1995) descreveram o papel importante da seleção e apresentação antigênica, capaz de desencadear a produção de citocinas que controlariam a infecção parasitária. Este estudo demonstrou que a apresentação de antígenos via MHC classe I, especificamente na infecção por *Toxoplasma sp* ou *Listeria sp*, resulta na produção de IL-12 por macrófagos, sendo que esta citocina participaria do processo de seleção de Th1 com um controle efetivo da infecção. Em contrapartida, a infecção por *Leishmania major* resulta em apresentação via MHC classe II com produção de IL-4 e tardiamente produção de IL-12, na qual o parasita, já instalado, burlaria o sistema imune dificultando o controle da infecção parasitária.

Em outros estudos envolvendo infecções parasitárias, como o descrito por DARH (1996), ficou claro que a produção IFN- γ , em excesso, em camundongos infectados com *T. brucei* pode induzir imunossupressão, diminuindo a proliferação de LT CD4⁺ e CD8⁺.

REED (1980) demonstrou a importância da participação das populações de linfócitos durante a infecção pelo *T. cruzi*, onde linfócitos provenientes de camundongos infectados promoviam proteção quando transferidos para camundongos normais.

No presente trabalho, os experimentos não foram realizados com LTCD4⁺ isolados, mas com células esplênicas totais. No entanto, procurou-se evidenciar os produtos secretados por estes linfócitos, em particular algumas citocinas relacionadas a Th1 ou Th2. Isso foi feito com o objetivo de tentar correlacionar o grau de virulência

das cepas de *T. cruzi* com os níveis destas citocinas secretadas, procurando-se determinar o papel destas no controle da infecção parasitária.. Foram estudadas a produção de IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12.

TRINCHIERI (1993) descreveu que a presença de IL-4 e IL-10, é que induz o desenvolvimento de linfócitos Th₂ e que IFN- γ e IL-12 induz o desenvolvimento de Th₁. CALLARD, (1996) ressalta a produção de IL-4 por Th₂, na qual esta citocina estaria relacionada com a indução da produção da IgE e IgG1.

Em nossos resultados, a produção de IL-4 não foi muito expressiva. Houve produção de IL-4 em níveis detectáveis nos esplenócitos oriundos de camundongos infectados com a cepa SC38 e estimulados com antígenos da mesma cepa no trigésimo dia. Isto ocorreu próximo ao pico de parasitemia e da maior produção de IL-10, indicando neste período um maior estímulo antigênico e de citocinas indutoras para a produção de IL-4, se comparado com a Y e a PF, onde não houve nenhuma produção detectável desta citocina. Estes resultados sugerem fortemente que a infecção pela cepa SC38 está relacionada a indução de linfócitos com atividade Th₂.

Com o estímulo da Con-A a produção de IL-4 não mostrou significativa diferença, entre os grupos de camundongos infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*. POWRIE & COFFMAN (1993) descreveram que a IL-10, produzida por Th₂, atua sinérgicamente com IL-4 inibindo a ativação de macrófagos e conseqüente produção de NO.

Os resultados dos níveis de IL-10 foram mais expressivos. No presente trabalho, ficou evidenciado a produção desta citocina durante os 90 dias, a exceção dos esplenócitos cultivados somente com meio onde não foram encontrados níveis expressivos de IL-10. A produção de IL-10 nos sobrenadantes de cultura não mostrou-se diferente entre os grupos estimulados com o antígeno Y quando comparado com SC38, mas foi significativa a diferença da SC38 e Y comparados com a PF e em pontos individualizados na curva durante os 90 dias pode-se observar que a produção dessa citocina foi mais expressivo para os grupos SC38 comparados com o grupo Y e PF. Estes resultados poderiam indicar que as cepas Y e SC38 seriam mais ativadoras de Th₂ do que a PF.

Nas células cultivadas em presença de Con-A, houve maior produção de IL-10 no grupo da SC38 comparados com o da Y. Esta diferença não ocorreu comparando-se a produção desta citocina entre o grupo SC38 com o da PF e nem entre o grupo PF comparado com o Y.

CARDOSO *et al.* (1995) demonstraram que o IFN- γ é um importante ativador de macrófagos capaz de ativar NOS, levando ao aumento da produção de NO.

Sabendo da importância do IFN- γ no controle de infecção por parasitas intracelulares, foi incluída sua detecção no presente trabalho. Observou-se expressiva produção desta citocina nos esplenócitos dos animais infectados pelas diferentes cepas. Mas se compararmos entre os grupos de esplenócitos que foram cultivados com meio, pode ser evidenciado uma produção diferenciada. No sétimo dia houve produção de IFN- γ nos grupos Y e PF, mas não no SC38, no décimo quinto dia ocorre expressiva produção no grupo Y mas não no SC38 e PF, e a partir do trigésimo dia apareceram níveis de IFN- γ no grupo SC38 que forão subindo gradativamente até o nonagésimo dia. Isso demonstra que a Y e a PF produzem essa citocina no início do inóculo e que para Y inicia-se com o aumento do número de parasitas no sangue e termina quando eles começam a escassear no sangue.

Com a SC38, a produção de IFN- γ também foi observada quando ocorreu um aumento do número de parasitas no sangue, sendo que paralelamente houve uma subida nos níveis de IFN- γ , mas com pouca expressividade. Estas disparidades encontradas nos níveis de secreção desta citocina, devem ter ocorrido pela ação inibitória da IL-10 sobre a expressão de IFN- γ .

A IL-12 tem se mostrado importante no controle de infecções parasitárias. Ela atua no processo de seleção do Th₁ e bloqueia o desenvolvimento de Th₂; estimulando a produção IFN- γ e IL-10. Auxilia também no processo de expressão de anticorpos isotípicos IgG1, IgG2a e bloqueia IgE (MCKIGHT *et al.*, 1994). Esta citocina regula a resistência ao *Trypanosoma cruzi* pela indução da produção de IFN- γ em esplenócitos normais. IFN- γ , por sua vez, poderá ativar macrófagos que produzirão NO, induzindo a morte do parasita (ALIBERTI *et al.*, 1996).

Não foi possível evidenciar a produção de IL-12 nos esplenócitos utilizados no presente trabalho. Provavelmente, a produção de IL-12 em cultivo de esplenócitos totais, na proporção de 5×10^6 células por poço, estimulados com antígenos, não foi suficiente para ser detectado pelo método imunoenzimático proposto.

O NO é um importante agente microbicida produzido por macrófagos ativados que está presente durante a infecção pelo *T. cruzi*, em que a produção do NO está correlacionada com a resistência ou a suscetibilidade a infecção (VESPA *et al.*, 1994). Em contrapartida, MILLS (1991) demonstrou que o excesso de NO induz imunossupressão.

No presente trabalho, os experimentos conduzidos para a dosagem de NO, apresentou resultados que permitiram se observar diferenças relacionadas às cepas estudadas. Nos animais inoculados com a cepa PF, não houve produção de NO em nenhum dos grupos. Embora tenha sido encontrado níveis detectáveis de IFN- γ , acredita-se que isso tenha ocorrido pela ação inibitória da IL-10 sobre a produção de NO ou por um fraco estímulo da PF sobre macrófagos e consequentemente sobre produção de NO.

A análise da cinética de produção de NO no grupo Y revelou que os níveis são significativamente maiores no sétimo e décimo quinto dias quando comparados com o grupo SC38. A produção de NO no grupo SC38 começa a subir gradativamente até o nonagésimo dia. Nos esplenócitos que apresentavam somente meio, só houve produção de NO no grupo Y. Esses dados indicam que a cepa Y induz maior produção de NO do que SC38 ou a PF.

Observando-se os dados da produção de IL-10 e IFN- γ e os dados da produção de NO, pode-se inferir que há maior presença de IL-10 nos grupos da SC38 comparado com o da Y e maior presença de IFN- γ nos grupos da Y comparados com o da SC38.

Estudos mostram que o IFN- γ e a IL-10 atuam de forma antagônica durante a infecção experimental de camundongos pelo *T. cruzi*. O IFN- γ tem uma ação positiva no sentido de controle da infecção e a IL-10 age em sentido contrário exacerbando a infecção (REED *et al.*, 1994).

No presente trabalho, ficou evidente que essas duas citocinas parecem ser importantes no controle efetivo da infecção, sendo que a produção exagerada do IFN- γ é tão prejudicial quanto sua ausência, principalmente pela possibilidade de induzir a produção em excesso de NO promovendo imunossupressão. Por outro lado, a IL-10 parece modular a resposta imune frente a essas cepas de *T. cruzi*, nas quais esplenócitos oriundos de animais infectados com a cepa SC38, quando induzidos a proliferar por um mitógeno, apresentaram maior produção dessa citocina. Este fato se reflete sobre a imunossupressão que é menor nos grupos da SC38, e também sobre a taxa de sobrevivência dos animais que foi de 100% até o nonagésimo dia contra 20% dos grupos de experimento com a cepa Y.

De acordo com os resultados mostrados durante este trabalho ficou evidente que a atividade intrínseca imunossupressiva do *T. cruzi* está intimamente relacionada com a produção do NO, isto ficou facilmente observado comparando-se a produção deste no grupo Y com os grupos SC38 e PF. Outra evidente observação está relacionada a IL-10 e ao IFN- γ onde a produção dessas citocinas está claramente associada as características antigênicas de cada cepa e de controle do processo imunossupressivo. Quanto a produção dos anticorpos IgG2a, IgG1 e IgE ficou observado que esses anticorpos estão ligados as atividades de Th, e em particular para o IgG1 e IgG2a que têm papel importante no controle da infecção pelo *T. cruzi*.

01367/97

VI - CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos na realização deste trabalho, pode-se chegar às seguintes conclusões:

- 1 - A atividade imunossupressiva promovida pelo *T. cruzi* é variável entre as cepas Y, SC38 e PF, sendo este grau de imunossupressão relacionado com as características biológicas particulares de cada cepa.
- 2 - Houve maior taxa de sobrevivência nos camundongos inoculados com a cepa SC38 ou PF, comparados com aqueles que só foram inoculados com a Y. Isso indica que nos camundongos infectados com as cepas SC38 ou PF houve um maior controle da infecção comparado com a cepa Y.
- 3 - Houve maior produção de anticorpos IgG2a nos animais inoculados com a cepa SC38 o que poderia indicar uma possível participação no controle da infecção.
- 4 - Todas as 3 cepas apresentaram secreção de clones de linfócitos Th_1 bem como Th_2 , sendo que com as cepas PF e SC38 houve tendência de predominar a ativação Th_2 . Particularmente para a cepa SC38, com maior expressividade Th_2 parece ser devido a maior produção de IL-10.
- 5 - Nos camundongos BALB/c infectados com a cepa SC38, cujos esplenócitos foram estimulados com Con-A, houve maior produção de IL-10. Isto indica que esta citocina foi produzida em maior quantidade quando os esplenócitos foram induzidos a proliferar, indicando também que os linfócitos Th_2 do grupo SC38 tem um potencial maior de produzir IL-10 e que esta produção pode estar interferindo na indução da síntese de NO.

VII - RESUMO

RESUMO

Este trabalho teve o objetivo de observar a resposta imune de camundongos BALB/c desencadeada por cepas de *T. cruzi* de graus variados virulência.

A maioria dos estudos relacionados com a imunossupressão, durante a infecção experimental de camundongos, desencadeada pelo *T. cruzi* são restritos a cepas de alta virulência não levando em consideração sua diversidade na natureza. Durante a realização deste trabalho, procurou-se associar a supressão da resposta imune durante a infecção experimental pelo *T. cruzi* em camundongos BALB/c com a virulência determinadas pelas cepas Y (de alta virulência), PF (avirulenta) e SC38 (de média virulência).

Este trabalho enfoca aspectos relacionados à imunidade humoral, através da dosagem de anticorpos dirigidos contra antígenos heterólogos, dosagem de anticorpos gamaglobulina total anti-*T. cruzi*, anticorpos isotípicos IgG1, IgG2a e IgE específicos para *T. cruzi*, bem como imunidade celular, através da dosagem de citocinas IL-4, IL-10, IFN- γ e IL-12.

Os resultados obtidos sugerem que a atividade imunossupressiva promovida pelo *T. cruzi* é variável de acordo com a virulência da cepa e que o grau de imunossupressão podem estar relacionado com as características biológicas particulares de cada cepa.

As dosagens dos anticorpos isotípicos mostraram que a cepa SC38 induz produção de anticorpos IgG2a, em maior quantidade comparadas com a PF e Y, indicando um possível controle da infecção. A cepa PF mostrou que induz a produção de IgG1 embora significativamente menor que aquelas encontradas nos grupos Y e SC38, indicando uma tendência a ativar linfócitos do tipo Th₂. Os grupos Y e SC38 produziram IgE, embora sem diferença significativa entre os dois grupos.

Durante a análise da produção de citocinas dos sobrenadantes de cultura de esplenócitos, oriundos de camundongos BALB/c infectados com as diferentes cepas de *T. cruzi*, foi observada uma maior produção de IL-10 no grupo SC38, indicando uma forte tendência a ativar linfócitos do tipo Th₂. Estes resultados refletem-se com a IL4

que apresentou maior expressividade para a SC38, embora a produção desta citocina tenha sido baixa em todos os grupos

Embora a produção do IFN- γ tenha sido igual nos sobrenadantes de culturas dos esplenócitos oriundos dos camundongos inoculados com as cepas de *T. cruzi*, no decorrer dos 90 dias, foi observado que a produção desta citocina é precoce, aparecendo do sétimo ao décimo quinto dia com as cepas Y e PF nas culturas que apresentavam apenas o meio. Com a cepa SC38, o aparecimento de IFN- γ foi observado a partir do trigésimo dia sendo que a concentração desta citocina sobe gradualmente até o nonagésimo dia.

Os resultados da produção de IFN- γ refletem-se na produção de óxido nítrico (NO), onde nos esplenócitos estimulados com os antígenos solúveis da cepa Y o NO é detectado até o décimo quinto dia, enquanto que nos estimulados com antígenos da cepa SC38 a produção de NO é observada a partir do trigésimo dia subindo gradualmente até o nonagésimo. Isso demonstra um controle na produção de NO no grupo SC38.

Baseado nos dados obtidos durante este trabalho, podemos afirmar que a atividade intrínseca imunossupressiva do *T. cruzi* está intimamente relacionada com a produção do NO, podendo esta produção ser determinada pelas características biológicas individuais de cada cepa. A produção de IL-10 e de IFN- γ também são determinados pelas características individuais de cada cepa onde a IL-10 parece favorecer a sobrevivência dos camundongos, diminuindo os efeitos intrínsecos imunossupressivos induzidos pelo parasita. Além dessas citocinas, a produção expressiva, de anticorpos IgG2a e IgG1 parece ser importante no controle da infecção pelo do *T. cruzi*.

VIII - ABSTRACT

ABSTRACT

The main purpose of this investigation was to observe the immune response of Balb/c mouse strain as a result of infection with *T. cruzi* strains which present various levels of virulence. The majority of the immunosuppression studies involved in the trypanosomiasis emphasized the infection with high virulent parasite strain. In the present study it was employed parasites which present high virulence (Y strain), median virulence (SC38) and low virulence (PF).

It was determined the levels of heterologous antibodies against sheep red blood cells and specific antibodies against *T. cruzi* from isotypes IgG1, IgG2a and IgE in the serum samples. It was also studied the secretion of IL-4, IL-10, IFN- γ and IL-12 cytokines by spleen cells.

The results showed that the immunosuppressive activity is variable according to the degree of virulence of the parasites which may be related with the particular biological features of each strain.

The infection by the median virulent strain, SC38, elicited the higher production of IgG2a antibodies when compared to the other strains. These data may indicate one possible mechanism to control the infection. The low virulent strain, PF, generates production of IgG1, even though in lower level when compared with other strains. The IgE production was detected in serum samples from animals infected with the Y and SC38 strains, but without significant difference.

The higher levels of IL-10 and IL-4 were observed in the supernatants from spleen cells from animals infected with SC38 strain.

It was observed that the early production (days 7 and 15) of IFN- γ by unstimulated spleen cells was present in the animals infected with the Y and PF strains of *T. cruzi*. The production of this cytokine in the SC38 strain infected group was delayed since it was detected only by day 30 and the levels of secretion of IFN- γ were increasing homogeneously until day 90.

The nitric oxide production by spleen cells basically followed the same pattern as the one found for IFN- γ production.

Taken together, the results obtained in the present study showed that the intrinsic immunosuppressive activity that follows the *T. cruzi* infection is closely related to the level of nitric oxide production which may determine the biological feature of each strain. Also, the IL-10 and IFN- γ may act antagonistically in this immunosuppressive process. On the other hand, the production of IgG2a and IgG1 may play an important role controlling *T. cruzi* infection.

IX - REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALBRIGHT, J.W.; ALBRIGHT, J.F. Inhibition of murine humoral immune responses by substances derived from trypanosomes. **J. Immunol.** v.126, p.300-303, 1981.
- ALIBERTI, J.C.S.; CARDOSO, M.A.G.; MARTINS, G.A.; GAZZINELLI, R. T.; VIEIRA, L.Q.; SILVA JOÃO, S. Interleukin-12 Mediates Resistance to *Trypanosoma cruzi* in Mice and Is Produced by Murine Macrophages in Response to Live Trypomastigotes. **Infect. and Immun.**, v. 64, n. 6, p. 1961-1967, 1996.
- ANDRADE, S. G. Morphological and behavioural characterization of *Trypanosoma cruzi* strains. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, (Supl). v. 18, p. 39-46, 1985.
- ANDRADE, Z. A. Enhancement of Chronic *Trypanosoma cruzi* Myocarditis in dogs Treated With Low Doses of Cyclophosphamide. **Am. J. Path.**, v. 123, n. 3, 1987.
- ARAÚJO, M. O. G. Importância epidemiológica da transmissão congênita da doença de Chagas. In: **Situação e perspectivas de controle das doenças infecciosas e parasitárias**. Brasília: UnB, 1981.
- ARAÚJO, S. M.; CHIARI, E. Caracterização biológica de clones das cepas Y, CL e MR de *Trypanosoma cruzi* em camundongos C₃H isogênicos. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 83, p. 175-81, 1988.
- ARIAS, A.R.; FERRO, E.A. Quantificação of *Trypanosoma cruzi* parasitaemia by direct micromethod. **Trans. Royal Soc. Trop. Med. Hyg.**, n. 82, p. 248, 1988.
- ARNHOLDT, A.C.V.; PIUVEZAM, M.R.; RUSSO, D.M.; LIMA, A.P.C.; PEDROSA, R.C.; REED, S.G.; SCHARFSTEIN, J. Analysis and Partial Epitope Mapping of Human T Cell Responses to *Trypanosoma cruzi* Cysteinyl Proteinase. **J. Immunol.**, v. 151, n. 6, p. 3171-3179, 1993.
- BERTELLI, M.S.; GOLGHER, R.R.; BRENER, Z. Intraspecific variation in *Trypanosoma cruzi*: effect of temperature on the intracellular differentiation in tissue culture. **J. Parasitol.**, v. 63, p. 434-437, 1977.
- BITTENCOURT, A. L. Evaluation of Chagas' disease transmission through breast-feeding. **Mem. Inst. Osw. Cruz**, n. 83, p. 37-39, 1988.

- BOUHDIDI, A.E.; TRUYENS, C.; RIVERA, M.T.; BAZIN, H.; CARLIER, Y. *Trypanosoma cruzi* infection in mice induces a polyisotypic hypergammaglobulinaemia and parasite-specific response involving high IgG2a concentrations and highly avid IgG1 antibodies. *Paras. Immun.*, v. 16, p. 69-76, 1994.
- BRENER, Z. **Contribuição ao estudo da terapêutica experimental da doença de Chagas.** Belo Horizonte: UFMG, 1961, 77p. (Dissertação de Mestrado)
- BRENER, Z. Biology of *Trypanosoma cruzi*. *Ann. Rev. Microb.*, v.27, p. 347-83, 1973.
- BRENER, Z. Intraspecific variations in *Trypanosoma cruzi*: two types of parasite populations presenting distinct characteristics. *PAHO, Sci Publ.*, v. 347, p. 11-21, 1977.
- BRENER, Z. O Parasito: relações hospedeiro-parasito. In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (ed). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas.* Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 1-41, 1979.
- BRENER, Z. Laboratory acquired Chagas' disease: an endemic disease among parasitologists? In: **Genes and antigens of parasites: a laboratory manual.** 2. Ed. Rio de Janeiro: FIOCRUZ, p. 3-9, 1984.
- CALLARD, R. E.; MATTHEWS, D.J.; HIBBERT, L. IL-4 and IL-13 receptors: are they one and the same? *Immun. Tod.*, v. 17, p. 108-110, 1996.
- CARDILLO, F.; VOLTARELLI, J.C.; REED, S.G.; SILVA JOÃO, S. Regulation of *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice by Gamma Interferon and Interleukin 10: Role of NK Cells. *Infect. and Immun.*, v. 64, p. 128-134, 1996.
- CARDOSO, M.A.G.; MARTINS, G.A.; ALIBERTI, J.C.S.; SILVA JOÃO, S. Relação hospedeiro-parasita na doença de Chagas. *Med.*, Ribeirão Preto, v. 28, p. 284-303, 1995.
- CERBAN, F.; GRUPPI, A.; GEA, S.; VOTTERO- CIMA, E. IgG Isotype Profiles Induced in Mice by Two *Trypanosoma cruzi* Electronegative Antigens, *Int. Arch. Allergy Appl. Immun.*, v. 96, p. 35-40, 1991.

- CERBAN, F.; GRUPPI, A.; VOTTERO-CIMA, E. *Trypanosoma cruzi*: Involvement of IgG Isotypes in the Parasitemia Control of Mice Immunized with Parasite Exoantigens of Isoelectric Point 4.5, **Exp. Parasitol.**, v. 75, p. 137-145, 1992.
- CHAGAS, C. Nova tripanozomíase humana: estudos sobre a morfologia e o ciclo evolutivo de *Schizotrypanum cruzi* n. gen., n. sp., agente etiológico de nova entidade mórbida do homem. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz*, v. 1, fasc. 2, p. 1-62, 1909. In: PRATA, P.A. (ed). **Carlos Chagas Coletânea de Trabalhos Científicos**. Brasília, Editora UnB, p. 1-81, 1981.
- CHIARI, E. Growth and differentiation of *Trypanosoma cruzi* culture forms kept in laboratory for different periods of time. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 16, p. 81-87, 1974.
- CHOCAIR, R.R. Transplante de rim: nova modalidade de transmissão da doença de Chagas. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo. n. 23, p.280-282, 1981.
- COLIGAN, J.E.; KRUISBEEK, A.M.; MARCULIES, D.H.; SHEVACH, E.M.; STROBER, W. **Curr. Prot. in Immun.**, p. 6.8.1-6.8.3; p. 6.14.1-6.14.3; p. 2.1.3-2.1.6 ; p. 2.2.1-2.2.2., 1991
- CONTRERAS, T.V.; SALLES, J.M.; THOMAS, N.; MOREL, C.M.; GOLDENBERG, S. In vitro differentiation of *Trypanosoma cruzi* under chemically defined conditions. **Mol. Bioch. Par.**, n. 16, p. 315-327, 1985.
- CORSINI, A. C.; COSTA, M. G. Imunossupression in mice infected with *Trypanosoma cruzi*. I - Evidencies of polyclonal B cell activation in experimental infections mimicked by na extract prepared from circulating Trypomastigotes. **Rev. Inst. Med. Trop.**, São Paulo, v. 23, n. 3, p.114-121, 1981.
- COSSIO, P.M. ; DIEZ, C.; SZARFMAN, A.; KREUTZER, E.; CANDIOLO, E.; ARANA, R.M. Chagasic cardiopathy: demonstration of a serum gamma globulin factor wich reacts with endocardium and vascular structures. **Circ.**, v.49, n.1, p.13-21, 1974.
- CUNHA NETO, E.; DURANTI, M.; GRUBER, A.; ZINGALES, B.; DE MESSIAS, I.; STOLF, N.; BELLOTTI, G.; PATARROYO, M.E.; PILLEGGI, F.; KALIL, J. Autoimmunity in Chagas disease cardiopathy: biological relevance of a cardiac

- myosin-specific epitope crossreactive to an immunodominant *Trypanosoma cruzi* antigen. **Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.**, v. 92, p. 3541-3555, 1995.
- CUNNINGHAM, D.S.; KUHN, R.E.; ROWLAND, E.C. Suppression of Humoral Responses During *Trypanosoma cruzi* Infections in Mice. **Infect. and Immun.**, v. 22, p. 155-160, 1978.
- DARH, A.; BESCHIN, A.; SILEGHEM, M.; HEREMANS, H.; BRYNS, L.; BAETSELIER, P. In Vitro Simulation of Immunosuppression Caused by *Trypanosoma brucei*: Active Involvement of Gamma Interferon and Tumor Necrosis Factor in the Pathway of Suppression. **Infect. and Immun.**, v. 64, p. 1937-1943, 1996.
- DEANE, P.M.; LENZI, H.L.; JANSEN, A. *Trypanosoma cruzi*: vertebrate and invertebrate cycles in the same mammal host, the opossum *Didelphis marsupialis*, **Mem. Inst. Osw. Cruz**, v. 79, p. 513-515, 1984.
- DEARBORN, D.G.; SMITH, S.; KORN, E.D. Lipophosphoglycan of the plasma membrane of *Acanthamoeba castellanii*. Inositol and phytosphingosine content and general structural features., **J. Biol. Chem.**, n. 251, p. 2976-2982, 1976.
- DIAS, J.C.P. Mecanismos de transmissão In: BRENER, Z. & ANDRADE, Z. (ed). *Trypanosoma cruzi e Doença de Chagas*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 152-154, 1979.
- DIAS, J.C.P. Control of Chagas disease in Brasil. **Parasitology Today**, v.3, p. 336-41, 1987.
- DVORAK, J. A.; HOWE, C. L. The attraction of *Trypanosoma cruzi* to vertebrate cells "in vitro". **J. Prot.**, v. 23, p. 534-537, 1976.
- ENGMAN, D.M.; KRAUSE, K.H.; BLUMIN, J.H. A novel Ca^{2+} -binding protein in trypanosomes. **J. Biol. Chem.**, n. 264, p. 18627-18631, 1989.
- FERGUSON, M.A.J.; SNARY, D.; ALLEN, A.K. Comparative composition of cell surface glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Bioch. Bioph. Act.**, n. 842, p. 39- 51, 1985.
- FERNANDES, A.J.; DIOTAIUTI, L.; DIAS, J.C.P.; ROMANHA, A.J.; CHIARI, E. Infecção natural das glândulas anais de gambás (*Didelphis albiventris*) pelo

Trypanosoma cruzi no município de Bambuí-M.G., **Mem. Inst. Osw. cruz**, v. 84, p. 87-93, 1989.

FONTT, E.O.; HEIRMAN, C.; THIELEMANS, K.; VRAY, B. Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor: Involvement in Control of *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice. **Infect. and Immun.**, v. 64, p. 3429-3434, 1996.

FONSECA, V.R.S. **Leishmaniose Visceral no Hamster: papel da via de inoculação no desenvolvimento da resposta imune celular.** Uberlândia, UFU, 1995, 51p. (Dissertação de Mestrado)

GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HAYASHI, S.; DENKERS, E.Y.; HIENY, S.; CASPAR, P.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. Parasite-Induced IL-12 Stimulates Early IFN- γ Synthesis and Resistance During Acute Infection with *Toxoplasma gondii*. **J. Immunol.**, v. 153, p. 2533-2541, 1994.

GAZZINELLI, R.T.; WYSOCKA, M.; HIENY, S.; SCHARTON KERTEN, T.; CHEEVER, A.; MÜLLER, W.; TRINCHIERI, G.; SHER, A. In the Absence of Endogenous IL-10, Mice Acutely Infected with *Toxoplasma gondii* Succumb to a Lethal Immune Response Dependent on CD4⁺ T Cells and Accompanied by Overproduction of IL-12, IFN- γ , and TNF- α . **J. Immunol.**, v. 157, p. 798-805, 1996.

GEA, S.; GRUPPI, A.; CERBAN, F.; PISTORESE PALENCIA, M.C.; VOTTERO CIMA, E. Immune response in mice immunized with acidic antigenic fractions from *Trypanosoma cruzi* cytosol, **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 34, p. 389-394, 1992.

GERMANN, T.; BONGARTZ, M.; HENRYKA, D.; HESS, H.; SCHIMITT, E.; KOLBE, L.; KÖLSCH, E.; PODLASKI, F.J.; GATELY, M.K.; RÜDE, E. Interleukin-12 profoundly up-regulates the synthesis of antigen-specific complement-fixing IgG2a, IgG2b and IgG3 antibody subclasses *in vivo*. **Eur. J. Immunol.**, v. 25, p. 823-829, 1995.

GONÇALVES DA COSTA, S.C.; LAGRANCE, P.; HUNTREL, B.; KERR, I.; ALENCAR, A. Role of T lymphocytes in the resistance and immunopathology of

- experimental Chagas' disease. I. Immunopathological studies. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 135, p. 217-332, 1984.
- HOLF, D. F.; LUNCH, G.R.; KIRCHHOFF, L.V. Kinetic Analysis of Antigen-Specific Immune Responses in Resistant and Susceptible Mice During Infection With *Trypanosoma cruzi*. **J. Immunol.**, v. 151, n.12, 7038-7047, 1993.
- HUDSON, L.; HAY, Y.F.C. *Immunología Práctica, Edittorial Jims*, p.125, 1979.
- JANKOVIC, D.; SHER, A. Initiation and Regulation of CD4⁺ T-Cell Function in Host-Parasite Models In: Romagnani, S. (ed). **Th1 and Th2 Cells in Health and Disease**. Basel: Karger, p.51-55, v.63, 1996.
- KATZIN, A. M.; COLLI, W. Lectin receptors in *Trypanosoma cruzi* an N-acetyl-D-glucosamine-containing surface glycoprotein specific for the trypomastigote stage. **Bioch. Bioph. Act.**, v. 727, p. 403-11, 1983.
- KIERSZENBAUM, F.; PIENKOWSKI, M.M. Thymus - dependent control of host defense mechanisms agaisnt *Trypanosoma cruzi* infection. **Infect. and Immun.**, v.24, p.117-120, 1979.
- KIERSZENBAUM, F. Immunologic Defficiency During Experimental Chagas' Disease (*Trypanosoma cruzi* Infection): Role of Adhernt, Nonspecific Esterase Positive Splenic Cells, **J. Immunol.**, v. 129, n. 5, p. 2202-2205, 1982.
- KIERSZENBAUM, F.; CUNA, W.R.; BELTZ, L.S.; SZTEIN, M.B. Tripanosomal Immunossupressive factor: A secrretion product(s) of *Trypanosoma cruzi* that inhibits proliferation and IL-2 receptor expression by activated human peripheral blood monocuclear cells. **J. Immunol.**, v. 144, p. 4000-4004, 1990.
- KIRCHHOFF, L. V. Is *Trypanosoma cruzi* a new thrat to our blood suply? **Ann. Intern. Med.**, v.111, p. 773-775, 1989.
- KRETTLI, A.U.; BRENER, Z. Protective effects of specific antibodies in *Trypanosoma cruzi* infections. **J. Immunol.**, v. 116, p. 755-60, 1976.
- LAFAILLE, M.A.C.; OLIVEIRA, L.C.B.; LIMA, G.C.A.; ABRAHAMSOHN, I.A. *Trypanosoma cruzi*: Maintenance of Parasite-Specific T Cell Responses in Lymph Nodes during the Acute Phase of the Infection. **Exper. Parasitol.**, v. 70, p. 164-174, 1990.

- LAMBRECHT, F.L. Notes on de growth curve of *Trypanosoma cruzi* Chagas 1909 as determined by optical density. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v. 8, p. 249-254, 1966.
- LAMONT, A.G.; ADORINI, L. IL-12: a key cytokine in immune regulation. **Immun. Tod.**, v. 17, p. 214-217, 1996.
- LANA, M.; TAFURI, W.L. *Trypanosoma cruzi*. In: NEVES, D.P. (ed). **Paras. Hum.** 8. Ed. Atheneu, c. 10, p. 73-495, 1991.
- LEGUIZAMON, M.S.; CAMPETELLA, O.E.; REYES, M.B.; IBÁÑES, C.F.; BASOMBRIÓ, M.A.; RINCON, J.; ÖRN, A.; FRASCH, C.C. Bloodstream *Trypanosoma cruzi* parasites from mice simultaneously express antigens that are markers of acute and chronic Chagas disease., **Parasitol.**, n. 102, p. 379-385, 1990.
- LIEW, F.Y.; SCOTT, M.T.; LIU, D.S.; CROFT, S.L. Suppressive substance produced By T Cells From mice Chronically infected With *Trypanosoma cruzi*, I. Preferential Inhibition of the Induction of Delayed-Type Hypersensitivity, **J. Immunol.**, v. 139, n. 7, p. 2452-2457, 1987.
- LIEW, F.Y.; SCHMIDT, J.A.; LIU, D.S.; MILLOTT, S.M.; SCOTT, M.T.; DHALIWAL, J.S.; CROFT, S. Suppressive substance produced By T Cells From mice Chronically infected With *Trypanosoma cruzi*, II Partial Biochemical Characterization, **J. Immunol.**, v. 140, n.3, p. 969-973, 1988.
- LOPES, M.E.; DOS REIS, G.A. *Trypanosoma cruzi*-Induced Immunossuppression: Selective Triggering of CD4⁺ T-Cell Deth by the T-Cell Receptor-CD3 Pathway and Not by the CD69 or Ly-6 Activation Pathway. **Infect. and Immun.**, v. 64, p. 1559-1564, 1996.
- LOWRY, H.L.; ROSENBROUGH, N.J.; FARR, A.L.; RANDALL, R.J. Protein measurement with the folin phenol reagent. **J. biol. Chem.**, v. 193, p. 265-275, 1951.
- MARCONDES, C.B.; PINTO DIAS, J.C.; GUEDES, L.A.; FERRAZ FILHO, A.N.; RODRIGUES, V.L.C.C.; MENDONÇA, D.D. Estudo epedemiológico de fontes de alimentação sangüínea dos triatomíneos da fazenda Aroeira (Catolé do Rocha,

- Paraíba) e circunvizinhanças. **Rev. Soc. Brasil. Med. Trop.**, São Paulo, v. 24, p. 137-140, 1991.
- MAJUNDER, S.; KIERSZENBAUM, F. *Trypanosoma cruzi* Immunosuppressive Factor Decreases the Interleukin-2 mRNA Level in Cultured Normal Activated Human Lymphocytes. **Infect. and Immun.**, v. 63, p. 4546-4549, 1995.
- MCKNIGHT, A.J.; ZIMMER, G.J.; FOGELMAN, I.; WOLF, S.F.; ABBAS, A.K. Effects of IL-12 on Helper T Cell-Dependent Immune Responses In Vitro. **J. Immunol.**, vol 152, 2172-2179, 1994.
- MEHLHORN, H. **Parasitology in Focus - Facts and Trends**. Berlin: Springer-Verlag, c. 1, p. 1-12, 1988.
- MENEZES, H. Protective effect of avirulent (cultivated) strain of *Trypanosoma cruzi* against perimental infection in mice. **Rev. Inst. Med. trop.** São Paulo, v. 10, n. 1, p. 1-4, 1968.
- MILES, M.A.; LANHAM, S.M.; SOUZA, A.A.; POVOA, M.M. Further enzymic characters of *Trypanosoma cruzi* and their evaluation for strain identification. **Trans. R. Soc. Trop. Hyg.**, v. 74, p. 221-37, 1980.
- MILLS, C.D. Molecular basis of "supressor" macrophages - Arginine metabolism via nitric oxide synthetase pathway. **J. Immunol.**, v. 146, p. 2719-2723; 1991.
- MINEO, J.R.; ROCHA, A.; COSTA CRUZ, J. M., DA SILVA ARNALDO, M.; SILVA, D.A.O.; GONÇALVES PIRES, M.R.F.; LOPES, E.R.; CHAPADEIRO, E. Total and specific anti-*Trypanosoma cruzi* immunoglobulin E in pericardial fluid samples from patients with chronic Chagas disease, **Trans. Royal Soc. Trop. Hyg.**, v. 90, p. 578-581, 1996.
- MORAES, R.G.; LEITE, I.C.; GOULARDT, E.G.; **Parasitologia & Micologia Humana**. Editora Cultura Médica, 3ª Ed, p. 111-128; p. 345-353, 1984.
- MOREL, C.; SIMPSON, L. Characterization of pathogenic trypanosomatidae by restriction endonuclease fingerprinting of kinetoplast DNA minicircles. **Am. J. Top. Med. Hyg.**, v. 29, p. 1070-1074, 1980.

- MORIMOTO, C.; LETVIN, N. L.; BOYD, A.W.; HAGAN, M.; BROWN, H. M.; KORNACKI, M.M.; SCHLOSSMAN, S.F. The isolation and characterization of the human helper inducer T cell subset. **J. Immunol.**, v. 134, p. 3762-3769, 1985.
- MOSMANN, T.R.; SAD, S. The expanding universe of T-cell subsets: Th1, Th2 and more, **Immun. Tod.**, v. 17, p. 138-146, 1996.
- MORRIS, C. S.; MADDEN, K. B.; ADAMOVICZ, J. J.; GAUSE, W. C.; HUBARD, B. R.; GATELY, M. K.; FINKELMAM, F.D. Effects of IL-12 on in Vivo Cytokine Gene Expression and Ig Isotype Selection. **J. Immunol.**, v. 152, p. 1047-1056, 1994.
- NEVA, F.A.; MALONE, M.F.; MYERS, B.R. Factors influencing the intracellular growth of *Trypanosoma cruzi* in vitro. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.10, p.140-154, 1961.
- NERY-GUIMARÃES, F. Um surto epidêmico de Chagas de provável transmissão digestiva, ocorrido em Teutonia (Estrêla-Rio Grande do Sul). **Hosp.**, n.73, p. 1767-1804, 1968.
- NORRIS, K.A.; SCHRIMPF, J.E.; FLYNN, J.L.; MORRIS, S.M. Enhancement of Macrophage Microbicidal Activity: Supplemental Arginine and Citrulline Augment Nitric Oxide Production in Murine Peritoneal Macrophages and Promote Intracellular Killing of *Trypanosoma cruzi*. **Infect. and Immun.**, v. 63, p. 2793-2796, 1995.
- OLIVEIRA, L.C.B.; LAFAILLE, M.A.C.; LIMA, G.M.C.A.; ABRAHAMSOHN, I.A. Antigen-Specific IL-4 -Secreting CD4⁺ Lymphocytes Increase *in vivo* Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* Infection. **Cellul. Immunol.**, v. 170, p. 1-12, 1996.
- OUAÏSSI, M.A.; CORNETT, J.; CAPRON, A. Identification and isolation of *Trypanosoma cruzi* trypomastigote cell surface protein with properties expected of a fibronectin receptor. **Mol. Bioch. Paras.**, n. 19, 201-211, 1986.
- PEÇANHA, L. M. T.; SNAPPER, C. M.; LEES, A.; YAMAGUCHI, H.; MOND, J. J. IL-10 Inhibits T Cell-Independent but not T Cell-Dependent Responses in Vitro, **J. Immunol.**, v. 150, n. 8, p. 3215-3223, 1993.

- POSTMAN, M.; DVORAK, J. A.; McDANIEL, J. P. Studies of *Trypanoma cruzi* clones in inbred mice. I: A compararison of curse of infection of C3H/HEN-mice with two clones isolated from a common souce. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 32, p. 497-506, 1983.
- POWRIE, F.; COFFMAN, R. L. Cytokine regulation of T-cell function: potential for therapeutic intervention., **Immun. Tod.**, v. 14, p. 270-274, 1993.
- PREVIATO, J.O.; GORIN, P.A.; MAZUREK, M.; XAVIER, M.T.; FOURNET, B.; WIERUSZESK, J.M.; MENDONCA PREVIATO, L. Primary structure of the oligosaccharide chain of lipopeptidophosphoglycan of epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, **J. Biol. Chem.**, n. 265, p. 2518-2526, 1990.
- PREVIATO, J.O.; JONES,C.; XAVIER, M.T.; WAIT, R.; TRAVASSOS, L.R.; PARODI, A.J.; MENDONCA PREVIATO, L. Structural characterization of the major glycosylphosphatidylinositol membrane-anchored glycoprotein from epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi* Y-strain. **J. Biol. Chem.**, n. 270, p. 7241-7250, 1995.
- PURKERSON, J.M.; ISAKSON,P.C. Interleukin 5 (IL-5) Provides a Signal That Is Required in Addition to IL-4 for Isotype Switching to Immunoglobulin (Ig) G1 and IgE, **J. Exp. Med.**, v. 175, p. 973-982, 1992.
- REED, S.G. Adotive transfer of resistance to acute *Trypanosoma cruzi* infection with T-lymphocyte-enriched spleen cells. **Infect. and Immun.**, v. 28, p. 404-408, 1980.
- REED, S. G.; ROTERS, S.B.; GOIDL, E.A. Spleen cell-mediated suppression of IgG production to a non-parasite antigen during chronic *Trypanosoma cruzi* infection in mice. **J. Immunol.**, v. 131, p. 1978-1982, 1983.
- REED, S.G.; INVERSO, J. A.; ROTERS, S. B. Heterologous antibody responses in mice chronic *T.cruzi* infection: depressed T helper function restored with supernatants containing interleukin-2. **J. Immunol**, v.133, p. 1558-1563, 1984.
- REED, S.G. In vivo administration of recombinant IFN- γ induces macrophage activation, and prevents acute disease, immune supression, and death in experimental *Trypanosoma Cruzi* Infections. **J. Immunol.**, v.140, p. 4342-4347, n°12, 1988.

- REED, S.G.; PIHL, D.L.; GRASBSTEIN, K.H. Immune deficiency in chronic *Trypanosoma cruzi* infection Recombinant IL-1 Restores Th Function for Antibody Production, **J. Immunol.**, v. 142, p. 2067-2071, n. 6, 1989.
- REED, S.G.; ROWNELL, C.E.; RUSSO, D.M.; SILVA, J.S.; GRABSTEIN, K.H.; MORRISSEY, P.J. IL-10 Mediates Susceptibility to *Trypanosoma cruzi* infection, **J. Immunol.**, vol. 153, 3135-3140, 1994.
- REINER, S.L.; LOCKSLEY, R.M. The regulation of immunity to *Leishmania major*. **Annu. Rev. Immunol.** v.13, p.151-177, 1995.
- REY, L. **Parasitologia**, Rio de Janeiro, 2ª Ed., Guanabara Koogan, p.55-169, 1991.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R. Contribuição ao estudo da imunidade na fase aguda da Doença de Chagas experimental. **Rev. Pat. Trop.**, v. 2, p. 433-463, 1973.
- RIBEIRO DOS SANTOS, R.; HUDSON, L. *Trypanosoma cruzi*: immunological consequences of parasite modification of host cells. **Clin. Exp. Immunol.** v.40, p. 36-48, 1980.
- RIVERA, M.T.; ARAUJO, S.M.; LUCAS, R.; DEMAN, J.; TRUYENS, C.; DEFRESNE, M.P.; BAETSELIER, P.; CARLIER, Y. High Tumor Necrosis Factor Alpha (TNF- α) Production in *Trypanosoma cruzi*-Infected Pregnant Mice and Increased TNF- α Gene Transcription in Their Offspring. **Infect. and Immun.**, v. 63, p. 591-595, 1995.
- ROCHA, A.; DE MENESES, A.C.; DA SILVA, A.M.; FERREIRA, M.S.; NISHIOKA, S.A.; BURGARELLI, M.K.; ALMEIDA, E.; TURCATO JUNIOR, G.; METZ, K.; LOPES, E.R. Pathology of patients with Chagas' disease and acquired immunodeficiency syndrome. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v. 50, n.3, 261-268, 1994.
- ROSSI, M. A. Myocardial damage in *Trypanosoma cruzi* myocarditis: a role for macrophages. **Canad. J. Cardiol.**, v.6, p.293-298, 1990.
- ROOSI, M. A.; MENGEL, J. O. Patogênese da miocardite chagásica crônica: papel de fatores autoimunes e microvasculares. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.34, n.6, p.1-8, 1992.

- SACKS, D.L.; SELKIRK, M.; OGILVIE, B.M.; ASKONAS, B.A. Intrinsic immunosuppressive activity of different Trypanosome strains varies with parasite virulence, *Nat.*, v. 283, p. 476-478, 1980.
- SAD, S.; MOSMANN, T.R. Single IL-2-Secreting Precursor CD4 T Cell Can Develop into Either Th1 or Th2 Cytokine Secretion Phenotype, *J. Immunol.*, v. 153, p. 3514-3522, 1994.
- SCHARFSTEIN, J.; RODRIGUEZ, M.M.; ALVES, C.A.; DE SOUZA, W.; PREVIATO, J.O.; MENDONÇA PREVIATO, L. *Trypanosoma cruzi*: description of a highly purified surface antigen defined by human antibodies, *J. Immunol.*, v.131, p. 972-981, 1983.
- SCHARFSTEIN, J.; LUQUETTI, A.; MURTA, A.C. Chagas' disease: serodiagnosis with purified gp25 antigen. *Am. J. Trop. Med. Hyg.*, v. 34, p. 1153-1160, 1985.
- SILVA, L.H.P.; NUSSENZWEIG, V. Sobre uma cêpa de *T. cruzi* altamente virulenta para o camundongo branco. *Folia Clin. Biol. São Paulo*, v. 20, p. 191-208, 1953.
- SILVA JOÃO, S.; MORRISSEY, P.J.; GRABSTEIN, K.H.; MOHLER, K.M.; ANDERSON, D.; REED, S.G. Interleukin 10 and Interferon γ Regulation of Experimental *trypanosoma cruzi* Infection. *J. Exp. Med.*, v. 175, p. 169-174, 1992.
- SILVA JOÃO, S.; VESPA, G.N.R., CARDOSO, M.A.G.; ALIBERT, J.C.S.; CUNHA, F.Q. Tumor Necrosis Factor Alpha Mediates Resistance to *Trypanosoma cruzi* Infection in Mice by Inducing Nitric Oxide Production in Infected Gamma Interferon-Activated Macrophages. *Infect. and Immun.*, v. 63, p. 4862-4867, 1995.
- STEINDEL, M. **Caracterização de cepas de *Trypanosoma cruzi* e *Tripanosoma rangeli* isoladas de reservatórios e vetores silvestres naturalmente infectados de Santa Catarina.** Belo Horizonte, UFMG, 1993. 164p. (Tese de Doutorado)
- SZTEIN, M.B.; CUNA, W.R.; KIERSZENBAUM, F. *Trypanosoma cruzi* inhibits the expression of CD3, CD4, CD8, and IL-2R by mitogen-activated helper and cytotoxic human lymphocytes. *J. Immunol.*, v. 144, p. 3558-3562, 1990.
- TAFURI, W.L. Patogenia da doença de Chagas. *Rev. Inst. Med. Trop.* n. 29, p. 194-199, 1987.

- TAKLE, G.B.; SNARY, D. South American trypanosomiasis (Chagas' disease). In: WARREN, K.S. (ed). **Immunol. and Mol. Biol. of Par. Infect.**. Cambridge: Blackwell, p. 213-235, 1993.
- TAKEHARA, H.A.; PERINI, A.; DA SILVA, M.H.; MOTA, I. *Trypanosoma cruzi*: role of different antibody classes in protection against infection in mice. **Exp. Parasitol.**, v.52, p.717-724, 1990.
- TAKAHASHI, N.S.H. **Potencial de linfócitos de camundongos geneticamente selecionados de acordo com a intensidade da resposta humoral**. São Paulo, USP, 1995, 99 p. (Tese de Doutorado)
- TARLETON, R. L.; KUHN, R. E. Restoration of in vitro immune responses of spleen cells from mice infected with *Trypanosoma cruzi* by supernatants containing interleukin 2. **J. Immunol.**, n. 3, v. 133, p. 1570-1575, 1984.
- TARLETON, R.L. *Trypanosoma cruzi* induced supression of IL-2 production. I. Evidence for the presence of IL-2 producing cells; II. Evidence for a role for suppressor cells. **J. Immunol.**, v. 140, p.2763-73, 1988.
- TARLETON, R. L. Depletion of CD8⁺ T cells increases susceptibility in infected inbred mice with the in vivo primary antibody response to sheep red blood cells. **Exp. Parasitol.**, v.52, n.2, p.233-242, 1981, 1990.
- TEIXEIRA, A.R.L.; SANTOS-BUCH, C.A. Immunology of experimental Chagas' disease: delayed hypersensitivity to *Trypanosoma cruzi* antigen. **Immunol.**, v.28, p.401-10, 1975.
- TEIXEIRA, A.R.L.; TEIXEIRA, G.; MACEDO, V.; PRATA, A. Acquired cell-mediated immunodepression in acute Chagas' disease. **J. Clin. Invest.**, v. 62, p. 1131-1141, 1978.
- TRINCHIERI, G. Interleukin-12 and its role in the geration of Th1 cells. **Immunol. Tod.**, v.14, p. 335-337, 1993.
- VAN VOORHIS, W.C.; CENTRON, M.S.; BARRET, L.K.; EISEN, H. E.; BASILIO, F.P.; MORAES, A.Q.; SOUZA, A.Q.; PAES, J.N. A surface antigen of *Trypanosoma cruzi* that antigenically mimics nervosus tissue in gut. **Mem. Inst. Osw. cruz**, v.87, p.18-19, 1992.

VESPA, G.N.R.; CUNHA, F.Q.; SILVA JOÃO, S. Nitric Oxide Is Involved in Control of *Trypanosoma cruzi*-Induced Parasitemia and Directly Kills the Parasite In Vitro.

Infect. and Immun., v. 62, p. 5177-5182, 1994.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Control of Chagas' disease. **Tech.**

Rep. Ser. n. 811, 102 p. 1991.